

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

INCREMENTO EN LA ACTIVIDAD ALCOHOLICA DE AmyA DE *Thermotoga maritima*  
MEDIANTE  
MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA

TESIS

ESTUDIANTE DE BIOTECNOLOGIA DAVID YETLANEZI SALGADO RINQUEY

Tutoras: Dra. Gloria Saab Rincon

Dra. Carla García Morales

# ÍNDICE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO .....	1
ÍNDICE.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
Lista de abreviaturas .....	8
Resumen.....	9
Introducción .....	10
Alquil glicósidos.....	10
Glicosil hidrolasas y transferasas .....	11
AmyA.....	13
Estructura de $\alpha$ -amilasa .....	14
Mecanismo de acción.....	17
Hidrólisis.....	17
Transglicosilación .....	18
Alcoholólisis.....	20
Almidón .....	21
<i>Thermotoga maritima</i> .....	22
Mutación y mutación sitio dirigida.....	23
Mega primer.....	24
Antecedentes .....	25
Justificación .....	27
Objetivos .....	28
Objetivos generales.....	28
Objetivos particulares .....	28
Metodología.....	28
Identificación de aminoácidos para mutagénesis.....	28
Diseño de Oligonucleótidos mutagénicos.....	29
Construcción de Megaprimer (mutagénesis sitio dirigida) .....	30
Construcción de genes mutantes.....	33

Digestión y Ligación enzimática .....	34
Trasformación bacteriana .....	36
Verificación de clonas por medio de PCR de colonia .....	36
Expresión de las variantes enzimáticas de $\alpha$ -amilasa .....	38
Obtención del extracto proteico .....	39
Determinación de la actividad específica.....	42
Reacción de hidrólisis y alcoholólisis.....	43
Análisis de los sustratos y productos por TLC .....	44
Análisis por HPLC de las reacciones de síntesis de butil glucósido con AMYA .....	44
Curva Michaelis-Menten .....	44
Resultados .....	46
Caracterización bioquímica de las variantes proteicas .....	58
Reacción de alcoholólisis e hidrólisis por TLC .....	61
Discusión de resultados.....	68
Conclusiones .....	72
Perspectivas .....	74
Bibliografía .....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del metil glucósido.....	11
Figura 2 Sitio de corte de $\alpha$ -amilasa .....	13
Figura 3. Estructura de la $\alpha$ -amilasa.....	15
Figura 4. Mecanismo de la $\alpha$ -amilasa en la reacción de hidrólisis.....	18
Figura 5. Mecanismo de $\alpha$ -amilasa en la reacción de transglicosilación.....	19
Figura 6. Mecanismo de $\alpha$ -amilasa en la reacción de alcoholólisis. ....	20
Figura 7 Componentes del almidón .....	22
Figura 8. Oligonucleótido mutagénico I121F. ....	30
Figura 9. PCR Mega primer I126F.....	31
Figura 10. Sitio de corte de las enzimas de restricción <i>HindIII</i> y <i>NdeI</i> .....	35
Figura 11. Reacción del ácido 3,5-dinitrosalisílico .....	42
Figura 12 Modelo 3D de la mutación I126F .....	46
Figura 13. Gel de electroforesis Megaprimer .....	47
Figura 14. Gel de agarosa que demuestra la síntesis del gen completo de la amilasa.....	48
Figura 15. Fragmentos liberados por la digestión enzimática del vector pETT22 .....	49
Figura 16. Representación de las mutaciones dentro del plásmido con AmyA.....	49
Figura 17. Electroforesis en gel de PCR de colonia .....	50
Figura 18. Cromatograma de la secuenciación de AmyA-Wt.....	51
Figura 19. Cromatograma de la secuenciación de AmyA-F.....	51
Figura 20. Cromatograma de la secuenciación de AmyA-Q.....	52
Figura 21. Cromatograma de la secuenciación de AmyA-FQ.....	52
Figura 22. Gel de SDS PAGE mostrando etapas de purificación .....	53
Figura 23. Corridas de las 4 amilasas variantes de amilasa .....	54
Figura 24. Geles SDS PAGE de amilasas purificadas.....	55
Figura 25. Método de Bradford.....	56
Figura 26. Curva estándar para método de Bradford .....	57
Figura 27. Curva Michaelis-Menten AmyA-Wt .....	59
Figura 28. Curva Michaelis-Menten AmyA-Q.....	59
Figura 29. Curva Michaelis-Menten AmyA-F.....	60
Figura 30. Curva Michaelis-Menten AmyA-FQ.....	60
Figura 31. Cromatografía de capa fina en sílica gel de las amilasas AmyA-Wt y AmyA-F.....	62
Figura 32. Cromatografía de capa fina en sílica gel de las amilasas AmyA-Q y AmyA-FQ.....	63
Figura 33. Cromatograma de corrida en HPLC de las 4 variantes de Amilasa .....	64
Figura 34. Eventos de alcoholólisis de las 4 variantes de amilasa .....	66
Figura 35. Prueba de azúcares reductores de las 4 variantes de amilasa.....	66
Figura 36. Eficiencia de la reacción de alcoholólisis sobre la reacción de hidrólisis.....	67
Figura 37. Acomodo espacial aminoácidos-sustrato.....	71
Figura 38 Neotrealosa .....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aminoácidos conservados en $\alpha$ -amilasa .....	16
Tabla 2. Condiciones PCR Megaprimer .....	30
Tabla 3. Condiciones Termociclador .....	31
Tabla 4. Relaciones Nanodrop.....	32
Tabla 5. Condiciones PCR para completar el gen de la amilasa .....	33
Tabla 6 Condiciones del termociclador para completar el gen de la amilasa.....	34
Tabla 7. Condiciones para PCR de colonia .....	37
Tabla 8. Condiciones de termociclador para PCR de colonia.....	37
Tabla 9. Especificaciones de gel SDS PAGE. ....	40
Tabla 10. Curva patrón para la cuantificación de proteína por el método de Bradford.....	41
Tabla 11. Curva patrón para la reacción con DNS.....	43
Tabla 16. Cuantificación por Bradford. ....	57
Tabla 17. Proteínas obtenidas.....	58
Tabla 18 Parámetros cinéticos. ....	61
Tabla 15 Resultados condensados. ....	65

## Lista de abreviaturas

<b>AmyA-Wt</b>	$\alpha$ -amilasa de <i>Thermotoga maritima</i>
<b>AmyA-Q</b>	$\alpha$ -amilasa de <i>Thermotoga maritima</i> con cambio de histidina por glutamina
<b>AmyA-F</b>	$\alpha$ -amilasa de <i>Thermotoga maritima</i> con cambio de isoleucina por fenilalanina
<b>AmyA-FQ</b>	$\alpha$ -amilasa de <i>Thermotoga maritima</i> con inserción de fenilalanina y glutamina
<b>DNS</b>	Acido 3,5-dinitrosalicílico
<b>EDTA</b>	Acido etilen diamino tetracético
<b>FPLC</b>	Fast Protein Liquid Chromatography
<b>G1</b>	Glucosa
<b>G2</b>	Maltosa
<b>G3</b>	Maltotriosa
<b>G4</b>	Maltotetraosa
<b>G5</b>	Maltopentosa
<b>G6</b>	Maltohexaosa
<b>G7</b>	Maltoheptaosa
<b>G8</b>	Maltooctaosa
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
<b>TAE</b>	Amortiguador Tris Acetato EDTA
<b>TLC</b>	Cromatografía de capa fina
<b>Tris</b>	Amortiguador Tris (hidroximetil) aminometano

## Resumen

En el presente trabajo se generó la mutación Ile126Phe y se investigó el efecto que tenía sobre la actividad alcohólica de la  $\alpha$ -amilasa de *Thermotoga maritima* (AmyA-F). Este cambio fue propuesto a través de un algoritmo creado por el alumno de doctorado Rodrigo Alejandro Arreola Barroso, donde a partir de la comparación de mapas de contacto dentro de un grupo de enzimas transglicosídicas contra un grupo de enzimas puramente hidrolíticas, se pretende identificar, en base a frecuencias, los aminoácidos clave que otorgan sus características a cada grupo de enzimas.

Este mismo cambio también fue introducido en una mutante de la amilasa previamente construida dentro del laboratorio en donde se cambió la histidina en la posición 222 por una glutamina (AmyA-Q) y que ya presenta un incremento del 20% en la actividad de alcoholisis con respecto a la amilasa silvestre.

Se evaluaron los efectos producidos por la mutación al comparar las enzimas con las AmyA- Wt y AmyA-Q en pruebas de hidrólisis y alcoholisis, determinando al mismo tiempo parámetros cinéticos como  $k_{cat}$  y  $K_m$  que nos ayudaran a comprender mejor el alcance del cambio introducido.

Se determinó que la presencia de la fenilalanina tanto en la amilasa silvestre como en la amilasa con el cambio de glutamina tiene un impacto al evaluar velocidades iniciales haciendo a las enzimas más eficientes para la hidrólisis. Sin embargo, al evaluar los resultados donde los experimentos alcanzaban el equilibrio al dejar la enzima reaccionando 24 horas se observa que la fenilalanina no presenta diferencia notable en el perfil de productos al equilibrio de las dos actividades evaluadas. Sin embargo, tiene un efecto relevante al ser evaluada en AmyA-Q, ya que su rendimiento hidrolítico se ve aumentado, mientras que se observa una disminución en el rendimiento de la actividad alcohólica alrededor del 6%, revirtiendo el efecto que la glutamina había aportado en el contexto de la enzima silvestre.

## Introducción

### Alquil glicósidos

Los alquil glicósidos son glico conjugados que poseen un grupo glucósido polar (extremo glicona) unido por un enlace glicosídico a un grupo alcohol no polar (extremo aglicón), otorgándoles propiedades tensoactivas (surfactantes), es decir, interactúan con las fases de distinta naturaleza dentro de una emulsión, reduciendo la tensión interfacial de esas dos sustancias<sup>1</sup>. Por esta razón, los alquil glicósidos son utilizados como emulsificadores. Esta estructura química anfifílica o anfipática también comprende moléculas como los esteroides, carotenoides, fosfolípidos<sup>1</sup> etc. Los alquil glicósidos al ser poco tóxicos son altamente utilizables, teniendo relevancia en la rama industrial farmacéutica, química, de detergentes y de alimentos como espumantes, humectantes y antimicrobianos.

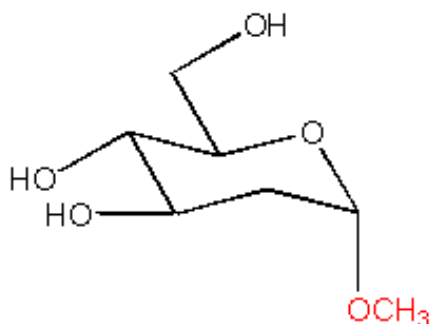
Tanto el grupo polar como el grupo no polar de estos componentes pueden variar en cuanto a su longitud se refiere, siendo que pueden ser utilizados para el extremo glicona desde monosacáridos como la glucosa hasta oligosacáridos como la maltoheptaosa, siendo el nombre de este último alquil maltoheptaósido. De manera que el sufijo “alquil” cambiará dependiendo del alcohol empleado; por ejemplo, si se es utilizado butanol como medio de la transglicosilación, el compuesto resultante será el butil glucósido o butil maltósido ya sea que se utilice glucosa o maltosa respectivamente para el extremo glicona<sup>1</sup> (Figura 1).

La síntesis de estos glicósidos involucra la formación de un carbocatión por la pérdida de un grupo hidroxilo en forma de agua que es estabilizado por el oxígeno del alcohol presente en la reacción, añadiendo el grupo -R con el que iba acompañado este último oxígeno<sup>2</sup>. La síntesis química de estos compuestos suele ser difícil por la gran cantidad de grupos -OH en la molécula de glucosa que pueden ser remplazados por el grupo -OR además del -OH anomérico. Para evitar esta sustitución al azar se deben de proteger los grupos que se desea permanezcan inmutables y alquilar al grupo correcto. Además, dependiendo de la naturaleza de la molécula deseada, un paso adicional conllevaría a desproteger al resto de estos grupos. Como por ejemplo el método de Koenigs-Knorr para la creación de  $\beta$ -glicósidos emplea HBr para el tratamiento del pentaacetato, seguido de la adición del alcohol en presencia de óxido de plata. La reacción da lugar a la formación de bromuro de piranosilo para que posteriormente se dé la sustitución nucleofílica<sup>3</sup>. Estos



pasos además de alargar el proceso de síntesis, producen grandes mermas, elevando los costos para su producción.

Las enzimas, tienen la ventaja de ser quimio, estéreo y regio-selectivas, generando una cantidad mínima o nula de productos secundarios, por lo que su implementación en una síntesis tan compleja como la de alquil glicósidos resulta muy atractiva. Por eso el desarrollo de metodologías que involucren enzimas presentan un campo de oportunidad para la síntesis de estos compuestos.



**Figura 1. Estructura del metil glucósido**

Estructura del metil glucósido, su formación está dada por la sustitución del grupo hidroxilo del carbono anomérico de la glucosa por una molécula de alcohol (-OR-), unidos por un enlace glicosídico. Se representa en color rojo el extremo hidrofóbico aglicón y de color negro el extremo hidrofílico glicona.

---

## Glicosil hidrolasas y transferasas

Las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.x), son enzimas que rompen enlaces glicosídicos entre cadenas de carbohidratos (e. g.  $\alpha$ -amilasa, isoamilasa), al contrario de las glicosil transferasas cuya función es formar estos enlaces (e. g. ciclodextrinas glucano transferasas). Siendo así que estas dos clases de enzimas están implicadas en un amplio espectro de procesos biológicos dentro del metabolismo.

Se ha reportado que algunas de estas enzimas, tanto hidrolasas como transferasas, en adición a la reacción principal, pueden llevar a cabo una reacción secundaria inversa a esta, como la de algunas  $\alpha$ -amilasas que catalizan la transglicosilación del enlace  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4)

aunque sea débilmente, o como la ciclo dextrina glucano transferasa (CGTase) que cataliza la transferencia entre glúcidos formando nuevos enlaces glicosídicos  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4). Además también se ha observado que algunas  $\alpha$ -amilasas catalizan la hidrólisis del enlace  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6)<sup>4,5,6</sup>o como bien la neopullunasa puede catalizar la hidrólisis y la transglicosilación de los enlaces glicosídicos  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) y  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6) con un único sitio activo utilizando el mismo mecanismo.<sup>4</sup> Este efecto es debido a que las glicosil transferasas y las glicosil hidrolasas poseen un sitio catalítico similar y que tienen sitios de unión secundarios que son a menudo, pero no siempre sitios de unión a carbohidratos<sup>7</sup>. Siendo así que la línea divisora entre las glicosil transferasas y las glicosil hidrolasas no siempre es clara. El estudio de enzimas como la neopullunasa, ha mostrado que variando residuos de aminoácidos que son constitutivos del sitio activo, ha generado un único centro activo de la enzima que participa tanto en la reacción de transglicosilación como en la hidrólisis de los enlaces glicosídicos  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) y  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6)<sup>8</sup>.

Debido a que estas enzimas han evolucionado de un número limitado de ancestros, existen pocas diferencias en cuanto a su sustrato, variando éstos por pequeños detalles estereoquímicos. Siendo así que también comparten algunas similitudes estructurales como por ejemplo un dominio catalítico conformado por un barril TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> presente en enzimas como  $\alpha$ -amilasa, glucano transferasa, isoamilasa, etc.<sup>4</sup>

Además de las estructuras conservadas, se ha observado que algunas de estas enzimas, incluida la  $\alpha$ -amilasa, también comparten en los sitios catalíticos los residuos Asp-206, Glu-230 y Asp-297<sup>9</sup> y que al mutarlos ya sea cambiándolos por su forma amina o por residuos cargados positivamente como Histidinas, éstas enzimas pierden su actividad<sup>4,10,11</sup>.

Existen dos grupos dentro de las enzimas glicosil hidrolasas, las que retienen la configuración anomérica al momento de hidrolizar el enlace glicosídico del sustrato (e. g.  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -galactosidasa, invertasa) y aquellas que invierten la configuración anomérica al hidrolizarlo (e. g.  $\beta$ -Amilasa, Glucoamilasa)<sup>12</sup>.

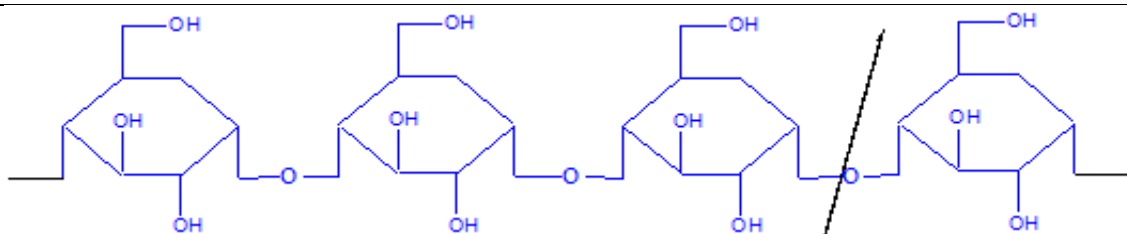
La cristalografía de rayos X y la comparación de secuencias por alineamiento entre diferentes enzimas ha permitido determinar estructuras proteicas entre diferentes organismos, revelando así similitudes entre ellas como la función que realizan, aspectos filogenéticos, estructuras conservadas<sup>13</sup>, mecanismos catalíticos, sitios de unión al sustrato, etc. Pudiéndose utilizar esta información para fines de clasificación y predictivos. Por ejemplo, conociendo la secuencia primaria de una proteína se podría determinar su estructura tridimensional al ser comparada con otra secuencia proteica homóloga<sup>14</sup>. Esto a menudo agrupa varias proteínas en una familia, prediciendo la actividad y el sustrato que utilicen<sup>7,15</sup>.

Con el fin de explorar la síntesis de alquil glicósidos a partir de enzimas, en el laboratorio de Ingeniería de Proteínas del IBT de la UNAM se ha preferido investigar a las glicosil hidrolasas sobre las glicosil transferasas (cuya función natural es transferir glúcidos a otras moléculas) debido a que además de utilizar un sustrato abundante y barato, no requieren el empleo de cofactores tan costosos. De manera que lo que se persigue es alcanzar un incremento en la actividad alcoholítica de AmyA para poder desarrollar un proceso enzimático competitivo que permita abastecer las demandas industriales que crecen día con día.

Además se ha optado por la utilización de la endoglicosidasa AmyA por la disponibilidad que representa su sustrato (almidón) en la naturaleza, con respecto a las exoglicosidasas que ocupan sustratos un tanto menos disponibles como celobiosa o lactosa.

## AmyA

Las  $\alpha$ -amilasas son enzimas que se encuentran en una gran variedad de microorganismos como arqueas y bacterias <sup>16</sup> y llevan a cabo la digestión del almidón hidrolizando enlaces glicosídicos  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4)<sup>17</sup> (Figura 2) dejando dextrinas lineales y ramificadas como productos ( $\alpha$ -anoméricos).



**Figura 2 Sitio de corte de  $\alpha$ -amilasa**

Se muestra la hidrólisis del enlace glicosídico  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) entre dos glucosas pertenecientes al almidón por  $\alpha$ -amilasa. El mecanismo de acción de  $\alpha$ -amilasa conserva la configuración anomérica del carbono 1 y lo deja activado para seguir reaccionando.

---

Las glicosil hidrolasas hacen uso de un mecanismo de doble desplazamiento donde se forma en un primer paso un complejo covalente enzima-sustrato seguida por un

desplazamiento del nucleófilo de la proteína por una molécula de agua mediante una catálisis básica<sup>18</sup> (Figura 3).

La enzima  $\alpha$ -amilasa, como se ha descrito anteriormente, posee una reacción secundaria en donde puede transferir un glúcido de bajo peso molecular a otro aceptor distinto al agua como por ejemplo carbohidratos (transglicosilación), alcoholes (alcoholólisis)<sup>17</sup> u otras moléculas activadas produciendo enlaces  $\alpha$ -glucosídicos y requiriendo para su actividad la presencia de calcio. Es a través de la reacción de alcoholólisis donde son sintetizados los alquil glicósidos, utilizando aceptores tales como el butanol o cualquier otro alcohol alifático. La capacidad de transferencia a alcoholes, abre la puerta para la producción de alquil glicósidos a partir de almidón.

Se han identificado tres amilasas en *Thermotoga maritima*; una citoplasmática y dos que se secretan al medio y que como muchas de sus proteínas son termo-resistentes. En el presente proyecto nos enfocamos en la amilasa denominada AmyA, la cual ya se ha demostrado que es estable en medios que contienen alcohol<sup>19</sup> a diferencia de otras amilasas como la que poseen los hongos.

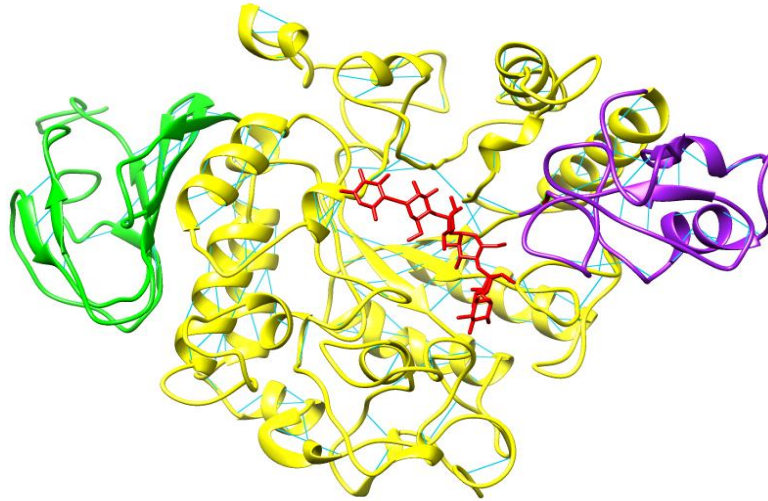
## Estructura de $\alpha$ -amilasa

La enzima  $\alpha$ -amilasa contiene un dominio catalítico N-terminal que posee una estructura de barril TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (dominio A) seguido de un dominio en forma de llave griega que consta de láminas  $\beta$  dobladas que participan en la unión al sustrato (dominio C) y de una asa de tamaño variable (dependiendo de la amilasa) que se encuentra entre la tercera hebra- $\beta$  y la tercera hélice  $\alpha$  (dominio B) que participa en la unión al sustrato y al  $\text{Ca}^{2+}$  estructural<sup>20</sup>, siendo completamente afuncionales en ausencia de éste<sup>21</sup>.

El dominio C tiene 100 residuos de aminoácidos de longitud y esta doblada como una lámina  $\beta$  antiparalela y aunque no está determinada aún su actividad, mutaciones en esta zona han causado inactivaciones de la enzima  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus stearothermophilus*<sup>20</sup>, sugiriendo que el dominio está implicado en la actividad de  $\alpha$ -amilasa<sup>20</sup>. El dominio B es el que presentan mayor variabilidad dentro de las amilasas.

Las enzimas  $\alpha$ -amilasa contiene de 5 a 11 subsitios de unión a glucosa conformados entre el dominio A y el dominio B<sup>17</sup>. Presumiblemente las diferencias de afinidades entre estos dominios determina el perfil de productos de estas enzimas. Así, las endoenzimas como es el caso de  $\alpha$ -amilasa, requieren llenar varios de los subsitios después del sitio de corte lo que les permite crear productos de menor peso molecular, pero no glucosa, como sería el

caso de las exoglicosidasas. Así también, el mecanismo combinado de hidrólisis y transferencia presente en algunas de estas enzimas les permite generar otra vez productos de mayor tamaño a partir de los fragmentos pequeños, logrando así una hidrólisis más eficiente del almidón<sup>17</sup>.



**Figura 3. Estructura de la  $\alpha$ -amilasa**

Estructura proteica de  $\alpha$ -amilasa, se muestra en amarillo el dominio A que consta de un barril TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. El dominio C representado en verde consta de una llave griega conformada de láminas  $\beta$ , el dominio B está ilustrado en morado e interrumpe el barril TIM del dominio A entre la 3ª hebra- $\beta$  y la 3ª hélice- $\alpha$

---

AmyA tiene aminoácidos altamente conservados, los cuales se encuentran localizados en el barril TIM en cuatro regiones<sup>22,17</sup> (Tabla1).

**Tabla 1. Aminoácidos conservados en  $\alpha$ -amilasa**

Regiones	Aminoácidos	Función
Región 1	Asp100	El Asp100 participa en la estabilización del sitio catalítico
	Asn104	Interactúa con el ion de calcio necesario para la activación de la enzima ubicado en el dominio B
	His105	Estabiliza el carboxilo terminal de la tercer lámina $\beta$ con el resto del barril TIM
Región 2	Asp231	Nucleófilo catalítico
	Lys234	Participan en la unión del extremo no reductor de la cadena de polisacáridos
	His235	
Región 3	Glu261	Residuo que participa en la actividad catalítica.
Región 4	Asp328	Involucrado en la estabilización de intermediarios.

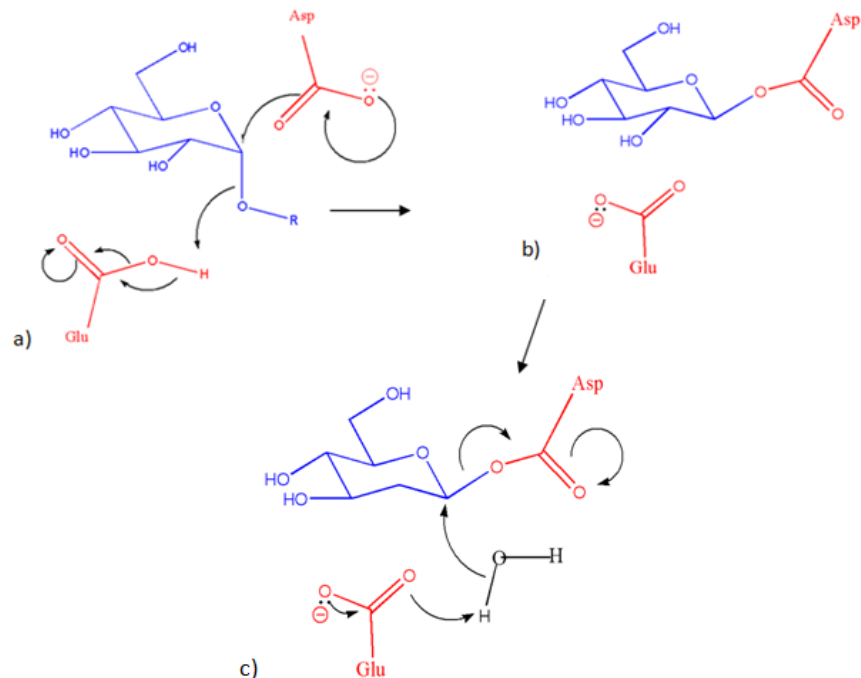
Estas 4 regiones son encontradas a lo largo de la familia 13 de las enzimas glicosil hidrolasas en la estructura en forma de barril  $(\beta/\alpha)_8$  o barril TIM.

## Mecanismo de acción

### Hidrólisis

La  $\alpha$ -amilasa hidroliza el enlace glicosídico que se da entre el carbón 1 (C1) y el carbón 4 (C4) de dos glucosas contiguas en un polímero como el almidón. Se puede explicar la reacción de hidrólisis por la sustitución nucleofílica entre el carbón anomérico, C1, y el nucleófilo formando un complejo sustrato-enzima con la configuración invertida del carbono anomérico (Figura 4).

El mecanismo utiliza un residuo (generalmente aspartato) nucleofílico que actúa como base substrayendo un protón para romper el enlace  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) entre las glucosas y es el residuo que forma el enlace transitorio enzima-sustrato en una sustitución nucleofílica, separando el centro activo del resto del polímero. El residuo de glutamato actúa como ácido/base, inicialmente actúa como ácido al donar su protón al fragmento de polímero saliente durante la formación del enlace covalente enzima sustrato. Posteriormente actúa como base al abstraer un protón de una molécula de agua que adquiere así carácter nucleofílico, atacando el enlace enzima-sustrato y liberando así al resto de la cadena de carbohidratos de la enzima y restaurando a la enzima a su forma original para un nuevo ciclo <sup>14</sup> (Figura 4).



**Figura 4. Mecanismo de la  $\alpha$ -amilasa en la reacción de hidrólisis.**

Se muestra la reacción de hidrólisis de la enzima amilasa por medio del mecanismo de doble desplazamiento. En un primer paso el ácido glutámico actúa como ácido al donar su protón para la ruptura del enlace  $\alpha$  ( $1 \rightarrow 4$ ) entre la glucosa y el resto del polímero representado por la letra R, en este paso es liberado R-OH (A) a la par el ácido aspártico forma el intermediario enzima-sustrato (B). El ácido glutámico actúa como base al recuperar un hidrógeno de una molécula de agua; ésta molécula sin su protón será el nucleófilo que libere al residuo de glucosa de la enzima dejando al ácido aspártico con una carga negativa, restaurando así a la enzima (C).

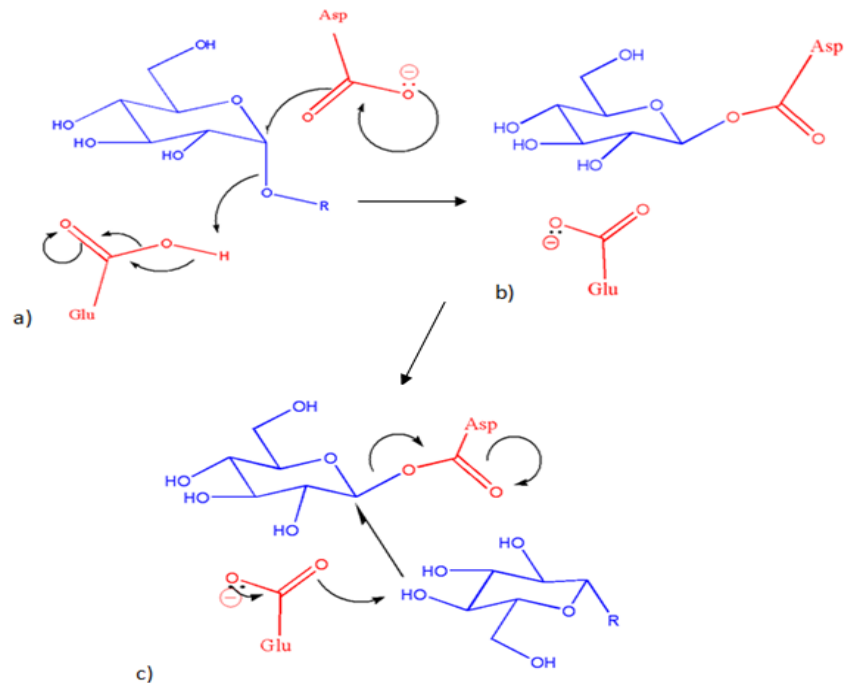
## Transglicosilación

La transglicosilación consiste en la transferencia de una glucosa a otro sacárido, siendo utilizado este último como aceptor en lugar de agua, para la formación de un nuevo enlace glicosídico  $\alpha$  ( $1 \rightarrow 4$ ). Esta reacción en las amilasas sigue el mecanismo de desplazamiento realizado entre los residuos carboxilos de dos aminoácidos.

El mecanismo de reacción, hasta la formación del complejo covalente enzima-sustrato es el mismo descrito previamente en la reacción de hidrólisis. Posteriormente, el glutamato extrae el protón de un carbohidrato en lugar de una molécula de agua, otorgándole el carácter nucleofílico para que pueda realizar una sustitución nucleofílica liberando el



aspartato del residuo glicosídico y formando así el enlace  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) entre la glucosa que participó en la formación del complejo enzima-sustrato y la molécula glicosídica entrante, dejando a la enzima libre<sup>12</sup> (Figura 5).



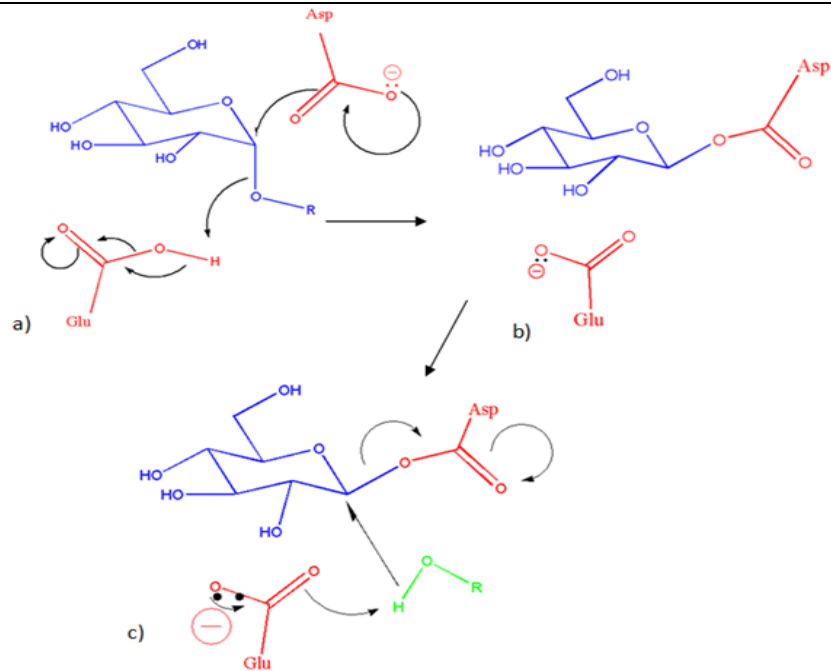
**Figura 5. Mecanismo de  $\alpha$ -amilasa en la reacción de transglicosilación.**

Se muestra la reacción de transglicosilación de la enzima amilasa por medio del mecanismo de doble desplazamiento. El mecanismo es idéntico al mostrado en la figura 4 hasta el paso "B". Al tener presentes sacáridos en el medio, éstos pueden entrar en lugar del agua al sitio catalítico de la enzima, donde el ácido glutámico sustraerá su hidrógeno, volviendo a esta nueva glucosa en un buen nucleófilo para atacar el enlace enzima-sustrato y formar un nuevo enlace  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4).

Esta reacción puede darse en conjunto con la de hidrólisis al ser una reacción reversible. La afinidad del sitio activo por agua o por otras cadenas de sacáridos, determina la preferencia de la reacción catalizada por la enzima.

## Alcohólisis

En esta reacción la enzima  $\alpha$ -amilasa cataliza la transferencia de una molécula glicosídica a una molécula de alcohol usado como aceptor glicosídico en lugar del agua. La reacción de alcohólisis requiere de una concentración efectiva alta de alcohol (butanol, terbutanol o isobutanol) en el medio. El mecanismo de reacción es igual a los antes descritos en las reacciones de hidrólisis y transglicosilación variando únicamente en que la molécula desprotonada por el glutamato para realizar la sustitución nucleofílica final es un alcohol, formando un enlace glicosídico entre la glucosa y el alcohol dando lugar a la síntesis del alquil glicósido<sup>12</sup>.



**Figura 6. Mecanismo de  $\alpha$ -amilasa en la reacción de alcohólisis.**

Se muestra la reacción de alcohólisis de la enzima amilasa por medio del mecanismo de doble desplazamiento. Esta reacción se da por el mismo mecanismo descrito en la figura 4 y 5, hasta la formación del complejo enzima-sustrato donde un alcohol será activado mediante la desprotonación por el ácido glutámico para realizar el ataque nucleofílico del enlace enzima-sustrato y generar así el alquil glicósido.

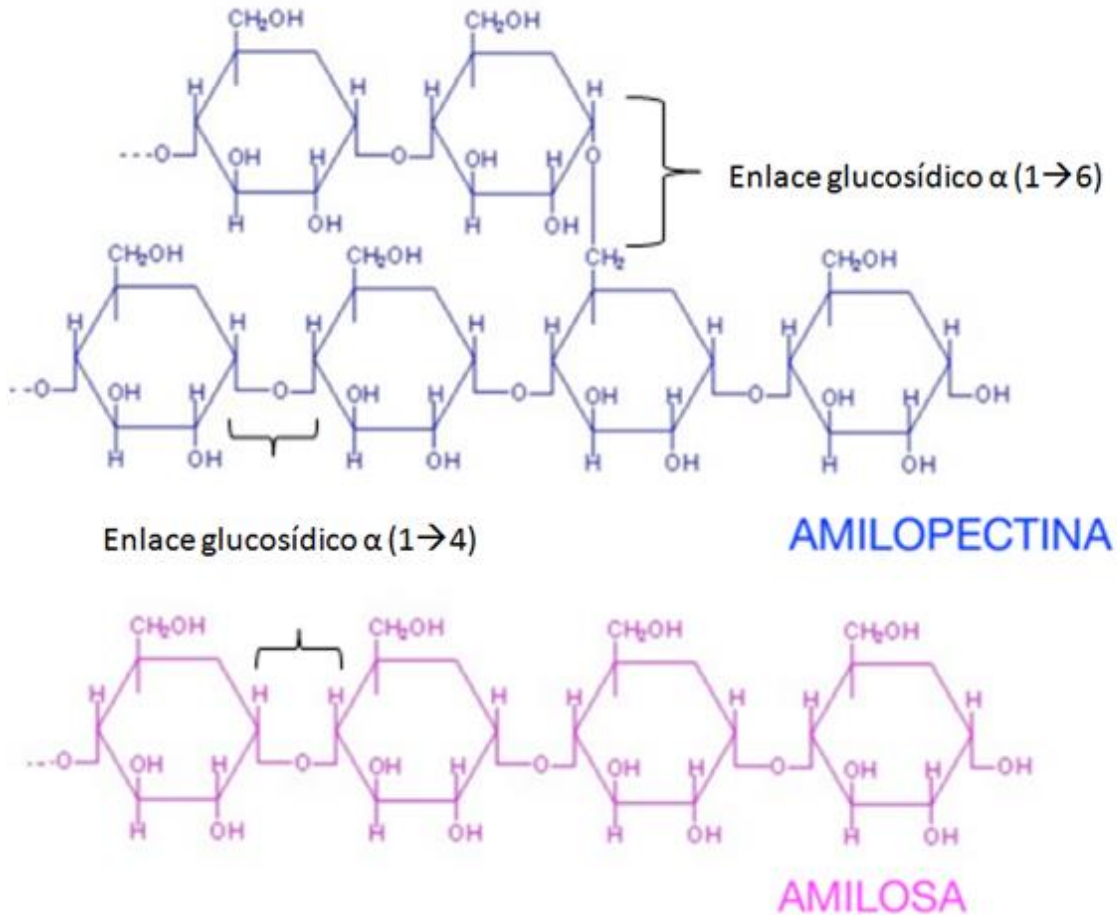
## Almidón

El almidón, después de la celulosa, es el polisacárido que se encuentra en mayor abundancia en la naturaleza, procedente de la polimerización de la glucosas unidas por enlaces glicosídicos entre el hidroxilo del carbono 1 y el hidroxilo del carbono 4. La orientación espacial de este enlace es determinada por la configuración ( $\alpha$  o  $\beta$ ) del carbono anomérico de la glucosa teniendo relevancia en la estructura del polisacárido resultante y a su vez determinando la función biológica que éste posea<sup>14</sup>.

La fórmula empírica del almidón es  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , con un peso molecular  $(164,14)_n$  donde “n” posee intervalos de 300-1000 unidades, teniendo un pH de 6,0 a 7,5. Estructuralmente el almidón es un entrecruzado de amilopectina y amilosa, ambos polímeros de glucosa. La amilosa se conforma por cadenas lineales de glucosas unidos por enlaces glicosídicos  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) mientras que la amilopectina forma cadenas ramificadas al poseer también enlaces glicosídicos  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6)<sup>4</sup> (Figura 7).

El almidón es de gran importancia económica ya que es ampliamente utilizado en la industria alimenticia como aglutinante, gelificante y conservador, así como en la texturización y consistencia de alimentos. Además, a partir de su hidrólisis se obtiene glucosa que puede ser utilizada directamente o mediante invertasa, transformada en fructosa para jarabes fructosados utilizados en la industria refresquera. En la industria farmacéutica se utiliza como cohesivo, relleno y desintegrante de la cápsula de fármacos, haciendo uso de su propiedad de absorción del agua. Otros usos que se hacen del almidón es para la fabricación de adhesivos o empaques biodegradables<sup>23</sup>. Puede formar micelas hidratadas gracias a que forma puentes de hidrógeno con moléculas vecinas.

El almidón es insoluble en agua fría pero puede llegar a ser soluble al calentar la mezcla a temperaturas alrededor de 85 °C obteniendo una solución coloidal donde empieza la gelificación de los gránulos de almidón y es aquí donde comienza la lixiviación de la amilosa. Es a estas temperaturas cuando el almidón queda disponible para la mayoría de los procesos industriales. Por eso, es preciso contar con enzimas termoestables que procesen el almidón y que sean capaces de resistir las exigencias que el proceso demanda.



**Figura 7 Componentes del almidón**

Muestra los dos componentes que conforman el almidón. La amilopectina, constituida por cadenas de glucosas unidas por enlaces  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  entre el carbón anomérico y el carbono 4 y ramificadas por medio de enlaces  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ . La amilosa está conformada por cadenas lineales de glucosas unidas por enlaces  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ .

### *Thermotoga maritima*

*Thermotoga maritima* es una de las pocas eubacterias gramnegativas hipertermófilas que existen y una de las más estudiadas debido a su capacidad de división a temperaturas mayores a  $90^\circ\text{C}$ <sup>24</sup>, crece en rangos de temperatura que van de  $55^\circ\text{C}$  a  $90^\circ\text{C}$  teniendo una temperatura óptima de crecimiento de  $80^\circ\text{C}$ .

Su genoma, de un único cromosoma circular, cuenta con 1,860,725 pares de bases y su análisis reveló numerosas vías involucradas en la degradación de azúcares así como también una posible transferencia lateral de genes entre esta bacteria y la rama archaica<sup>25</sup>. Esta bacteria es capaz de metabolizar tanto carbohidratos simples como complejos como por ejemplo almidón, celulosa, sacarosa, glucosa y xilano, fermentándolos predominantemente a acetato, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub><sup>26</sup>. Estas características han colocado a *Thermotoga maritima* como una potencial fuente de producción de hidrógeno biológico que puede ser usado como fuente de energía a partir de biomasa vegetal.

*Thermotoga maritima* es un organismo flagelado, que no forma esporas, estrictamente anaerobio, en forma de barra que muestra una envoltura única. Se encuentra naturalmente en lugares geotermales del suelo marino<sup>27</sup>. El linaje de esta bacteria ha sido catalogado evolutivamente como uno de los más lentos de las eubacterias debido a la filogenia de una de sus subunidades ribosomales<sup>28,25</sup>. En la actualidad los microorganismos aislados de fuentes geotérmicas se encuentran bajo intenso estudio por el potencial biotecnológico de sus enzimas al estar adaptadas a muy altas temperaturas o a las condiciones más extremas, conteniendo funciones catalíticas deseables. Este es el caso de las amilasas producidas por este microorganismo, ya que por las condiciones de la solubilización del almidón, es deseable que su procesamiento pueda ser llevado a cabo por una enzima termófila.

## Mutación y mutación sitio dirigida

La evolución biológica a través de la variación genética, producto de la mutación y la selección natural de los individuos, ha adaptado a miles de proteínas, cuya estructura está definida directamente por la secuencia de bases de los genes, para que cada una realice una función específica o bajo ciertas condiciones distintas a las demás<sup>29</sup>.

Una mutación se define como el cambio o alteración en la secuencia de ADN de cualquier organismo, modificando su genotipo y potencialmente las características de éste al cambiar una o varias bases. Las mutaciones, ya sea las de naturaleza espontánea o inducidas, favorecen la diversidad genética dando lugar a la evolución. Las mutaciones inducidas son provocadas por agentes químicos, físicos y biológicos<sup>30</sup>.

A lo largo de los años, han surgido técnicas para poder modificar a voluntad las proteínas, entre las que destacan la mutagénesis sitio-dirigida. Esta técnica nos permite modificar la secuencia de aminoácidos dentro de la proteínas, revelando la relación que guarda la

secuencia, estructura y función del polipéptido<sup>29</sup>. Al modificar una proteína por esta técnica podemos cambiar aspectos de ésta, como su función, estabilidad, especificidad de sustrato etc.

La mutación sitio dirigida nos permite cambiar la secuencia dentro de un gen de un fragmento clonado de ADN en un sitio específico por medio de inserción, deleción o sustitución de bases<sup>31</sup>, permitiéndonos estudiar regiones concretas dentro de la proteína, dilucidar la participación que tiene cada aminoácido dentro de la estructura proteica así como su participación dentro de la función que ésta realiza<sup>32</sup>. Estos cambios pueden ser utilizados para suprimir o cambiar la expresión de un gen en particular.

La mutagénesis sitio dirigida requiere de la separación de las hebras complementarias de ADN para posteriormente incorporar oligonucleótidos sintéticos que son casi totalmente complementarios a la cadena de ADN utilizada como templado y que contiene la región del gen que se desea modificar, con un cambio de bases(s) en el codón a modificar y que al hibridar y al ser extendidos con la ADN polimerasa insertarán ese cambio dentro de la secuencia del gen dando paso a la mutación<sup>31,33,34,35</sup>.

## Mega primer

La mutación sitio dirigida puede ser llevada a cabo por el método de mega primer descrita por primera vez por Kammann *et al.* (1989)<sup>36</sup>, y requiere de la participación del oligonucleótido mutagénico y dos oligonucleótidos flanqueadores para la síntesis del gen completo a mutar con dos rondas de PCR<sup>37</sup>.

Dentro de la primera reacción de PCR participa el oligonucleótido interno que contiene la mutación deseada y un oligo flanqueador que hibrida dentro del vector en la hebra contraria a la que hibrida el oligonucleótido mutagénico. Esta reacción dará como producto el megaprimero que es de mayor tamaño a los oligonucleótidos participantes. Este producto es purificado por electroforesis a través de un gel para posteriormente ser utilizado como cebador en una segunda reacción de PCR utilizando el oligonucleótido flanqueador contrario al de la primera reacción para completar la totalidad del gen<sup>37</sup>.

Esta técnica sintetiza a su vez ADN silvestre junto con el ADN que posee la mutación inducida, encontrándose ésta última en un porcentaje teóricamente mayor al 90% puesto que el fragmento mutagénico se produce exponencialmente en cada ciclo y siendo posible su identificación por medio de secuenciación de un número pequeño de clonas<sup>31</sup>.

## Antecedentes

Se ha estudiado la capacidad de las endoglicosidasas, entre ellas  $\alpha$ -amilasas de algunos microorganismos como *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*, de transferir residuos de glúcidos de bajo peso molecular a alcoholes, como metanol, etanol y n-butanol, propiedad que se ha visto limitada en las enzimas hidrolíticas<sup>38,39</sup>. También se ha visto esta capacidad en algunas exoglicosidasas como  $\beta$ -amilasa o la glucoamilasa pero al generar productos de menor peso molecular, para algunos fines específicos son preferidas las endoglicosidasas con excepción de  $\alpha$ -amilasas maltogénicas o sacarificantes, efecto que se presume está relacionado a diferencias de afinidades en subsitios de unión al sustrato<sup>40,41</sup>.

Hasta la fecha, se han identificado 3 amilasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en el microorganismo hipertermófilo *Thermotoga maritima*, AmyA<sup>42</sup>, AmyB<sup>43</sup> y AmyC<sup>42</sup>, variando en sus temperaturas óptimas en 85°C, 70°C y 90°C, respectivamente. AmyA es la única de estas tres amilasas que ha sido encontrada en el medio extracelular y la única caracterizada con diferentes sustratos<sup>44,19,17</sup>. Las otras han sido encontradas intracelularmente. Además se ha identificado que AmyA de *Thermotoga maritima* es capaz de generar alquil glicósidos<sup>17</sup>.

La ingeniería de proteínas busca diseñar mutaciones en los lugares correspondientes donde se obtenga un efecto sobre alguna particularidad de la proteína, basándose en la relación que guarda la secuencia, estructura y función de ésta<sup>45</sup>.

El grupo de Saab *et al.* (1999)<sup>46</sup> ha reportado que al mutar la alanina-289 a Tirosina, aminoácido ubicado cerca del sitio activo, en la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus*, fue posible producir una proteína con capacidades alcoholíticas, además de alterar otros aspectos como el perfil de pH de la enzima. Esta mutación sustituye a un residuo hidrofóbico por otro, pero de un tamaño mayor al tener la tirosina un anillo dentro de su arreglo químico.

Al ir aumentando el número de secuencias y estructuras 3D resueltas gracias a la implementación de técnicas como cristalografía de rayos X o la resonancia magnética nuclear (NMR), se han innovado metodologías como los análisis comparativos con valor predictivo capaces de derivar nociones generales acerca de la estructura de las moléculas<sup>47</sup>, así como también identificar residuos específicos y la función que desempeñan dentro de la catálisis enzimática<sup>48</sup>. Entre estas metodologías se encuentra el diseño de mutaciones basadas en posiciones de residuos homólogos, tomando en cuenta la polaridad y geometría del sitio activo<sup>17</sup>. Así, ha sido posible modificar la actividad de transglicosilación en la enzima neopullunasa bajando la afinidad de la enzima por

moléculas polares como el agua, incrementando así la concentración efectiva de sustratos menos polares en el sitio activo<sup>49,50</sup>. Este efecto también se ha logrado impidiendo la entrada de agua al sitio catalítico de la enzima, modificando la geometría de éste para forzar a la enzima a utilizar otro aceptor<sup>39,17</sup>.

Al comparar alineamientos de múltiples secuencias de enzimas hidrolíticas y sacarificantes así como también comparaciones estructurales, Damián-Almazo *et al.* (2008)<sup>17</sup> pudieron identificar residuos de aminoácidos aromáticos, que no se encontraban dentro de la secuencia conservada de la  $\alpha$ -amilasa de *Thermotoga maritima*, implicados en la actividad de alcoholólisis. Al hacer esta comparación de secuencias se pudo identificar una glutamina en la posición 222 dentro de la secuencia proteica, este aminoácido es conservado en las enzimas transglicosídicas, mientras que en las enzimas hidrolíticas, el residuo que pertenece a esa posición es una histidina. Al mutar la histidina en la posición 222 de la enzima hidrolítica  $\alpha$ -amilasa de *T. maritima* por la glutamina observaron un incremento en la actividad de alcoholólisis y una disminución en la actividad de hidrólisis. Este cambio cae en el dominio B de la amilasa, el cual participa en la unión al sustrato.

Partiendo de que la secuencia de proteínas homólogas contiene información relevante que permite identificar los residuos importantes para la catálisis, el alumno de doctorado Rodrigo Alejandro Arreola Barroso, desarrolló un algoritmo basado en frecuencias que propone encontrar aminoácidos implicados en actividades específicas como es la capacidad de transferencia molecular. Este algoritmo compara mapas de contactos que nos muestran en 2D el acomodo espacial de los aminoácidos de una estructura proteica plegada3D. Comparando varias enzimas con estructuras similares pero que divergen en su actividad, estabilidad, especificidad hacia sustrato, etc. se pueden identificar de manera sistemática los residuos en que difieren para enfocar los esfuerzos de mutagénesis hacia éstos. A través de este análisis se identificó que en las enzimas con mayor actividad transglicosídica presentan una Phe en lugar de Ile en la posición 126.



## Justificación

Cada vez es más frecuente el uso de enzimas para la síntesis de compuestos debido a la alta especificidad y estereo selectividad de éstas y a que en muchos procesos las enzimas pueden ser fijadas en una matriz dándoles la ventaja de poder ser utilizadas repetidas veces, a diferencia de utilizar un proceso químico en que la purificación del producto en medio de una mezcla muy compleja de subproductos puede elevar considerablemente el costo. Sin embargo, las enzimas están adaptadas para realizar reacciones específicas bajo condiciones naturales, por lo que en la mayoría de los casos es necesario modificarlas a través de ingeniería de proteínas para adaptarlas a condiciones de reacción diferentes o incluso para realizar reacciones diferentes.

En el presente proyecto se implementó el uso de una  $\alpha$ -amilasa para la producción de alquil glicósidos, productos de un alto valor agregado utilizados como emulsificantes en las industrias de alimentos, farmacéutica y alimenticia, a partir de almidón. El uso de una amilasa de naturaleza hipertermófila, como es el caso de la enzima proveniente de *Thermotoga maritima*, es un excelente punto de partida ya que puede cumplir con las exigencias industriales para el procesamiento del almidón que requiere temperaturas mayores a 80 °C. Sin embargo, la reacción de alcoholólisis no es la reacción natural de esta enzima, por lo que es deseable incrementar esta actividad sobre su actividad natural que es la hidrólisis. Para tal fin el alumno de doctorado Rodrigo Alejandro Arreola Barroso ha desarrollado un algoritmo cuyo propósito es identificar aminoácidos que al ser mutados incrementen la actividad de alcoholólisis. La construcción y caracterización de las mutantes propuestas permitirán contribuir al estudio de esta metodología que promete ser más precisa y sistemática que las utilizadas hasta la fecha.

## Objetivos

### Objetivos generales

Contribuir a la evaluación del algoritmo basado en frecuencias desarrollado para la identificación de mutantes que favorezcan las reacciones de alcoholólisis.

### Objetivos particulares

Diseño de oligonucleótidos mutagénicos a partir de un análisis para identificar blancos a mutagenizar.

Construcción de los genes mutantes de AmyA de *Thermotoga maritima*.

Producción y purificación de las enzimas mutantes y la silvestre de AmyA.

Caracterización de las mutantes en las reacciones de hidrólisis, transglicosidación y alcoholólisis.

Comparar la actividad de la enzima silvestre con la de las mutantes.

## Metodología

### Identificación de aminoácidos para mutagénesis

El algoritmo para identificación de posibles residuos para mutagenizar comparó enzimas que tenían una importante actividad transglicosídica contra enzimas amilasas hidrolíticas. Al analizar los datos se encontró que la fenilalanina en la posición 126 estaba favorecida dentro de las enzimas transglicosídicas, por lo que se optó por mutar la isoleucina que caía en esta posición dentro de la secuencia de la  $\alpha$ -amilasa para integrar la fenilalanina a su composición proteica.

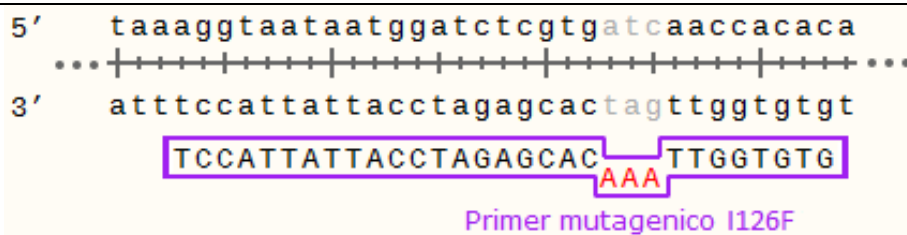
## Diseño de Oligonucleótidos mutagénicos

Se diseñó el oligo haciendo uso del software serial cloner, para generar el cambio de isoleucina en la posición 126 de la secuencia proteica por fenilalanina (I126F) cambiando el codón ATC en la posición 783-785 del gen por TTT, mutando dos bases.

El oligonucleótido mutagénico se diseñó de manera que contuviera características que ayudarían al alineamiento y a la especificidad de unión a la cadena complementaria del templado en la PCR, considerando también no tener complementariedad consigo mismo para evitar estructuras secundarias no deseadas a causa de hibridaciones intracadena, cuidando aspectos como el contenido de bases nitrogenadas para obtener una temperatura de fusión ( $T_m$ ) adecuada. Este último puede llegar a estimarse siguiendo la fórmula  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ , donde una unión de adenina con timina y una unión con guanina y citosina contribuirían a un aumento a la  $T_m$  de 2°C y 4°C, respectivamente. La construcción de la mutación se realizó sobre el plásmido pET3a/AmyA<sup>17</sup> construido en el laboratorio en trabajos anteriores, y utilizando el oligo universal T7 como oligo flanqueador que hibrida sobre el plásmido para realizar las construcciones, de manera que la  $T_m$  fue propuesta en 57°C como temperatura aunque no opnima, apropiada en consideración a los dos oligonucleótidos.

El oligonucleótido se mandó a sintetizar en la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del instituto de biotecnología (IBT).

El oligo diseñado tenía la secuencia GTGTGGTTAAACACGAGATCCATTATTACCT en dirección 5'-3' e hibrida con la cadena 3'-5' del templado a mutar (Figura 8).



**Figura 8. Oligonucleótido mutagénico I121F.**

Muestra el oligonucleótido mutagénico (resaltado en morado) que da el cambio de codón (remarcado en rojo) que sustituye una isoleucina por una fenilalanina en la posición 126 de la secuencia proteica.

---

## Construcción de Megaprimer (mutagénesis sitio dirigida)

Las mutantes de AmyA de *T. maritima* se construyeron usando la técnica de mega primer descrita por primera vez por Kammann *et al.* (1989)<sup>36</sup>, utilizando como oligonucleótidos externos al T7 forward y al T7 de terminación (Figura 9).

En una primera reacción de PCR se utilizó el oligo mutagénico junto con el oligo universal T7 reverso y el gen clonado de AmyA en el vector comercial pET3a (Novagen) para la síntesis del megaprimer empleando un termociclador T100<sup>TM</sup> (BIO-RAD) bajo las siguientes condiciones:

Condiciones de la PCR:

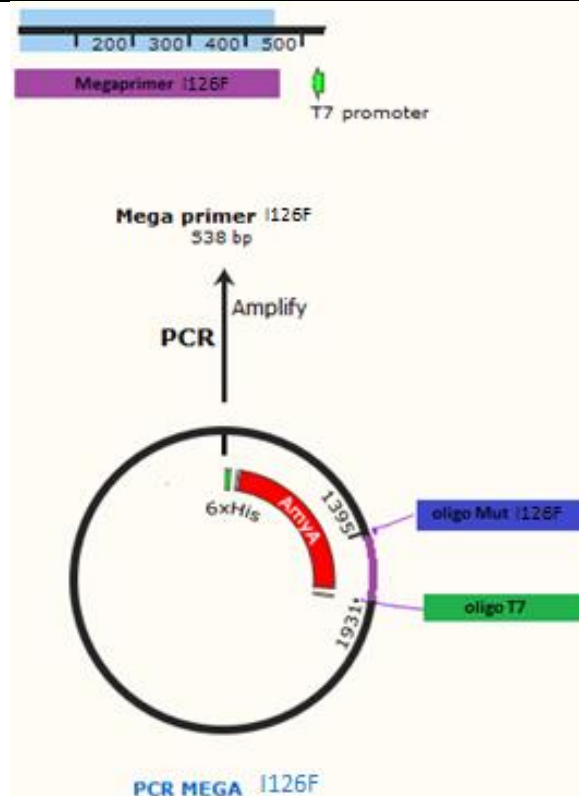
**Tabla 2. Condiciones PCR Megaprimer**

Templado: pET3a - AmyA WT	4 µL
Oligo Fw: Mutagénico I126F	6 µL
Oligo Rv: T7(10 picomol/ µL)	5 µL
Polimerasa: PFU	5 µL
dNTP's 2.5 mM	10 µL
Buffer	10 µL
H <sub>2</sub> O	60 µL

Condiciones del termociclador:

**Tabla 3. Condiciones Termociclador**

95°C	2:00 min	1 ciclo
94°C	0:30 min	25 ciclos
57°C	0:30 min	
68°C	0:45 min	
68°C	0:30 min	1 ciclo
4°C	∞	1 ciclo



**Figura 9. PCR Mega primer I126F**

En esta imagen se explica la PCR para la síntesis del megaprimero, utilizando como templado el pET3a-AmyA. Se utiliza el oligonucleótido que contiene la mutación I126F (marcado en azul) y el T7 Rv (marcado en verde), la reacción dará como producto el megaprimero con una longitud de 538pb (morado).

La síntesis del megaprimer se verificó mediante electroforesis utilizando gel preparativo de agarosa al 1%, utilizando como amortiguador una solución de Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (TAE 1x) y haciendo uso del equipo de cámara de electroforesis y power pac 300 (BIO RAD) como fuente de poder corriéndolo a 200V por 10min (Figura13).

La banda del megaprimer se cortó y se le adicionó 150µl de solución amortiguadora para unión, calentándolos a una temperatura de 80°C hasta que se fundió la agarosa. La solución resultante se purificó empleando el Kit para purificación de productos de PCR (ROCHE) de columna de sílica, que se basa en la adición de iones caotrópicos, creando un entorno hidrofóbico alrededor del ADN y que bajo estas condiciones hidrofóbicas, los ácidos nucleicos se unen perfectamente a la membrana de sílica mientras que las proteínas y otros contaminantes no se unen, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado. Posteriormente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana de sílica mediante tampones de elución con baja concentración de sales o simplemente agua.

Se centrifugó y se desechó la solución que pasó por la columna de sílica. Las columnas se lavaron con 200µl de solución amortiguadora de lavado centrifugándolas posteriormente durante 1 min. El ADN se recuperó con 50 µl de agua mili Q.

Se midió la concentración del megaprimer con 1µl de muestra en el espectrofotómetro nanodrop 2000c (THERMO SCIENTIFIC) a una longitud de onda de 260nm (Tabla 4).

El nanodrop es un espectrofotómetro que mide longitudes de onda que van desde los 220 nm a los 750 nm. Una de las características de esta tecnología de nueva generación es que sólo utiliza una gota de muestra, no requiere de una celda y el software calcula automáticamente las concentraciones de las muestras analizadas, siguiendo las siguientes relaciones.

**Tabla 4. Relaciones Nanodrop**

Ácidos nucleicos	1 A260nm = 1 OD ADN = 50 µg/ml  1 A260nm = 1 OD RNA = 40 µg/ml
Proteínas	1 A280nm = 1 mg/ml

## Construcción de genes mutantes

Para la construcción de los genes mutantes de la amilasa se utilizó como templado el vector con el gen silvestre de la  $\alpha$ -amilasa y el vector que contenía el gen de la amilasa con el cambio de la histidina por la glutamina en la posición 222(H222Q).

El megaprimer previamente purificado se utiliza en esta segunda reacción de PCR para completar el gen junto con ambos templados. Dando como resultado dos secuencias distintas, la que fue puesta con el templado silvestre de AmyA traduciría a una proteína con la mutación I126F (AmyA-F), en cambio la que fue puesta con el templado que ya contenía la mutación H222Q daría como resultado una enzima amilasa que contendría dos mutaciones, la I126F y la H222Q (AmyA-FQ).

Para la construcción de los 2 genes mutantes completos de  $\alpha$ -amilasa se siguió una estrategia donde en una primera fase de la PCR se añade la mezcla (Tabla 5) de la reacción junto con el megaprimer (Oligo Fw) para asegurar su acoplamiento a los templados y en una segunda fase de la PCR se le añade el oligonucleótido T7 Rv que hibrida en el vector pET3a para la síntesis del gen completo de la amilasa.

La PCR se realizó un termociclaador (BIO RAD termal cicler T100™), bajo las siguientes condiciones:

**Tabla 5. Condiciones PCR para completar el gen de la amilasa**

AmyA-F mix		AmyA-FQ mix	
Templado: pET3a-AmyAWt	3 $\mu$ l	Templado: pET3a-AmyA-Q	3 $\mu$ l
Oligo Fw: Megaprimer I126F	10 $\mu$ l	Oligo Fw: Megaprimer I126F	10 $\mu$ l
Polimerasa: Taq	6 $\mu$ l	Polimerasa: Taq	6 $\mu$ l
dNTP's 2.5 mM	10 $\mu$ l	dNTP's 2.5 mM	10 $\mu$ l
Buffer(10x)	10 $\mu$ l	Buffer(10x)	10 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	56 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O	56 $\mu$ l

Nota: se tuvo que usar un exceso de megaprimer, se observó que a concentraciones más bajas la reacción de PCR era ineficiente.

Condiciones del termociclador para ambas reacciones:

**Tabla 6 Condiciones del termociclador para completar el gen de la amilasa**

95°C	2:00 min	1 ciclo
95°C	0:40 min	10 ciclos
60°C	0:40 min	
72°C	1:00 min	
Se le agregó 5µl del oligonucleótido T7 Rv a ambas reacciones y se continuo con la segunda fase del PCR		
95°C	0:40 min	25 ciclos
57°C	0:40 min	
72°C	2:00 min	

El producto de PCR se analizó mediante gel preparativo de agarosa al 1%, el gel se corrió en un equipo 250EX (LIFE TECHNOLOGIES) a 120V por 15 minutos, utilizando una solución amortiguadora 1x de Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (TAE 1x). Se comprobó el éxito de la reacción al teñir el gel de agarosa con bromuro de etidio y al ser analizado en el transiluminador Gel Doc EZ Imager (BIO RAD) bajo luz UV (Figura 14).

Se cortaron las bandas del tamaño correspondiente al gen de la amilasa (1.6kb) y se les adicionó 150 µl de solución amortiguadora de unión. Las mezclas se calentaron a 80°C hasta que se licuó la agarosa, las soluciones resultantes se purificaron utilizando el kit de purificación Roche de columna de sílica. Se centrifugaron las columna en el equipo centrifuga 5415 D (eppendorf) para eliminar las soluciones amortiguadoras del kit de purificación y se le adicionó 700µl de solución amortiguadora de lavado, posteriormente se centrifugo la columna a 1000 rpm por 1 min recuperando el ADN en 90 µl de agua miliQ.

## Digestión y Ligación enzimática

Para la ligación se purificó de células XLIBLue el plásmido pET22 que tiene un gen β-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (Figura 10), y que adiciona al momento de la traducción una cola de histidinas al final de la proteína. El plásmido se purificó por medio del kit de purificación de plásmidos Roche.



Se tomaron 86 µl de cada gen purificado de la amilasa (AmyA-F y AmyA-FQ) y el plásmido comercial pET22. A cada reacción se le adicionó 10 µl de Solución amortiguadora 10X (2 Biolabs) junto con 2 µl de las enzimas de restricción *HindIII* y *NdeI*. Las reacciones se dejaron incubar a 37°C durante toda la noche. Poner los productos de la digestión con las mismas enzimas de restricción generan terminales cohesivas y complementarias entre el vector y el producto de la reacción de PCR haciéndolos aptos para una posterior ligación (Figura 10).

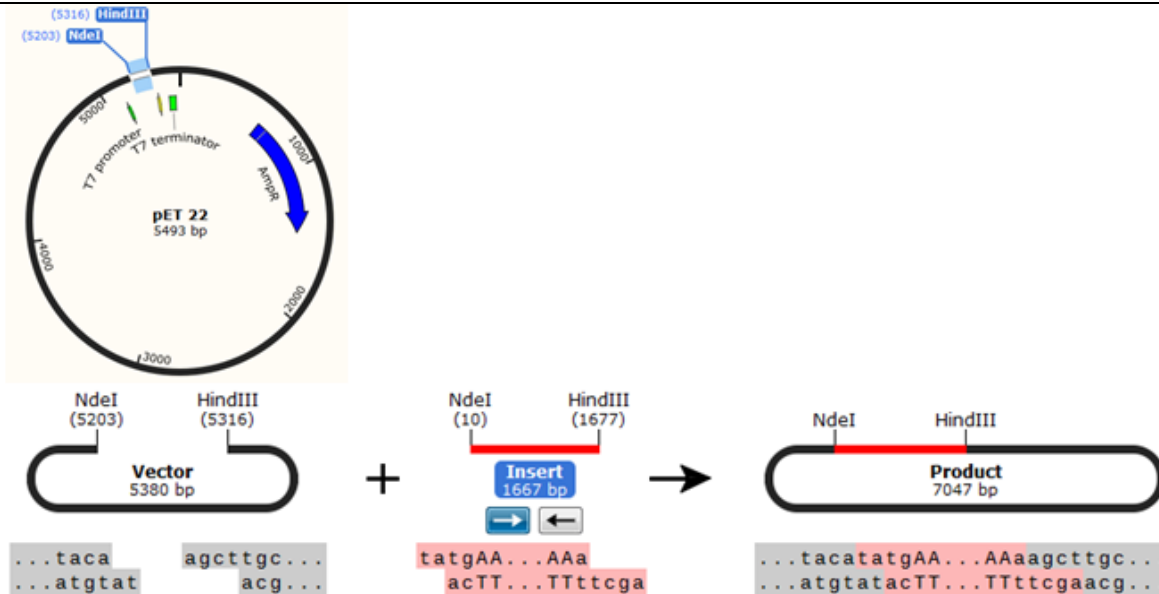


Figura 10. Sitio de corte de las enzimas de restricción *HindIII* y *NdeI*

En la parte superior de la imagen se aprecia el modelo del pET22 con las ubicaciones del lugar de corte de *NdeI* y *HindIII* así como el fragmento que resultaría de esa digestión marcado en azul claro. En azul fuerte se muestra el de resistencia a ampicilina. En verde se muestra los sitios de unión de los oligo T7. En la parte inferior se muestran los sitios de acople cohesivos creados por las enzimas *NdeI* y *HindIII* entre el inserto (rojo) y el vector (negro), así como los distintos tamaños de los componentes y de la construcción del plásmido.

Se comprobó la digestión mediante su corrida en gel agarosa (Figura 15).

Las digestiones fueron purificadas por geles de agarosa para separar el fragmento de interés corriéndolas a 120V durante 10 min, las bandas correspondientes fueron cortadas para purificarlas mediante el kit de purificación Roche por columna de afinidad de sílica.

Para la ligación se utilizó una proporción de 1 volumen de vector contra 3 de inserto, tomando así 20  $\mu$ l y 60  $\mu$ l respectivamente, junto con 20  $\mu$ l de solución amortiguadora 5x y 2  $\mu$ l de T4 ADN ligasa (New England Biolabs, Inc.) para las 2 reacciones. Vector e insertos fueron puestos a ligar toda la noche a 16 °C y las ligaciones fueron posteriormente purificadas por medio de precipitación por alcoholes.

Los vectores ligados fueron separados de la solución mezclándolos en vortex con isobutanol para posteriormente centrifugarlos. Se quitó cuidadosamente el disolvente dejando alrededor de 50  $\mu$ l de éste para no remover la pastilla de ADN.

El disolvente remanente se evaporó en el vacufuge marca eppendorf a presión reducida y 60°C. Una vez evaporado el remanente, se agregaron 3  $\mu$ l de agua miliQ a cada tubo eppendorf para disolver los vectores ligados.

## Trasformación bacteriana

Se descongelaron en hielo células electro competentes MC1061 *E.coli*. Se tomaron los 3  $\mu$ l de cada ligación resuspendidas en agua y se les adicionó una alícuota de 50  $\mu$ l de células, los cuales se transfirieron cuidadosamente a celdas de electroporación previamente puestas a enfriar en hielo para evitar que las células perdieran competencia.

Las células fueron transformadas por electroporación usando un pulso con una diferencia de potencial de 1.80V, recuperándolas en agitación a 250rpm a 37°C en medio SOC enriquecido con glucosa y magnesio por 1 hora (1 ml de medio).

Las células recuperadas se cultivaron en medio LB/Ampicilina, para seleccionar a las células transformadas ya que portan el gen de resistencia al antibiótico contenido en el pETT22. Las cajas se dejaron incubando a 37°C toda la noche.

## Verificación de clonas por medio de PCR de colonia

Se picaron todas las colonias que crecieron de la transformación con puntas de micro pipeta.

Las puntas fueron colocadas y agitadas en 20  $\mu$ l de agua, durante 5 minutos en la campana de flujo laminar para evitar contaminación, para después ser puestas en 100  $\mu$ l de medio LB/Ampicilina.

Los 20  $\mu$ l de agua de cada colonia picada fueron utilizados para la reacción de PCR de colonia, para asegurar la presencia del inserto. Se analizaron un total de 25 colonias. Se utilizó termociclador robocycler infinity (STRATAGENE) para estas reacciones, las condiciones de las PCR fueron las siguientes:

Mix para PCR colonia:

**Tabla 7. Condiciones para PCR de colonia**

Buffer 10X	3 $\mu$ l
dNTP's	3 $\mu$ l
T7 Fw	2 $\mu$ l
T7 Rv	2 $\mu$ l
Templado	colonia
H <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l
Taq ADN polimerasa	3 $\mu$ l

Condiciones del termociclador:

**Tabla 8. Condiciones de termociclador para PCR de colonia**

95°C	2:00	1 ciclo
95°C	0:30	30 ciclos
57°C	0:30	
72°C	2:00	
72°C	2:00	1ciclo
12°C	$\infty$	1 ciclo

La reacción se puso con los primers T7 que hibridan fuera del gen, dando como resultado de la PCR la totalidad del gen de AmyA de 1.6 Kb o un fragmento de 0.5 Kb para los que contuvieran el vector religado permitiéndonos así distinguir clonas que sí tuvieran el gen de aquellas que no (Figura 17). Se tomaron algunas de las fracciones de colonia en 100  $\mu$ l de LB con ampicilina de los plásmidos que contuvieron el inserto y se pusieron a crecer en

4 ml de LB/Ampicilina 37°C 1 hora. Los plásmidos mutados junto con los plásmidos parentales (AmyA-Wt AmyA-Q) almacenados se purificaron con el uso de columna de afinidad con sílica de ROCHE .

Los 4 plásmidos fueron secuenciados en la unidad de síntesis y secuenciación de ADN (USSADN) del instituto del IBT. Cumpliendo con los requerimientos se emplearon 10 picomolas de oligonucleótido y 500 ng del plásmido repartidos en 16 µl para 1 muestra.

Cada plásmido se secuenció con los oligonucleótidos flanqueadores (T7Fw y T7Rv) del gen de la amilasa en el plásmido pETT22 , teniendo la secuenciación en ambos sentidos, 5'-3' y 3'-5', al ser complementarias entre sí al momento de sobrelaparlas se obtiene la lectura completa del gen.

El cromatograma de las secuenciaciones fue analizado inicialmente con el software FINCH TV en caso de tener dudas por parte de la unidad de secuenciación. Para análisis posteriores se utilizó el programa mega 6.

Se alinearon las secuenciaciones con la secuencia de amilasa silvestre descargada de la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) en el programa Mega 6. En este análisis se buscó que las secuencias no tuvieron cambios no deseados, que contuvieran las mutaciones diseñadas y que contuvieran al final del gen los codones de las colas de histidinas (HIS TAG) contenidas en el plásmido pET22. Las colas de histidinas servirán en etapas posteriores para la purificación proteica por medio de columna de afinidad a níquel (Figura 18).

## Expresión de las variantes enzimáticas de $\alpha$ -amilasa

La transformación bacteriana en células  $\text{Ca}^{2+}$  competentes fue por medio de choque térmico. Avances recientes sugieren que la absorción de ADN es facilitada por el  $\text{Ca}^{2+}$  presente en la superficie celular y el choque térmico crea poros permitiendo la entrada de ADN hacia el citoplasma celular<sup>51</sup>.

Se utilizó la cepa de *E.coli* ER2566 (proporcionada en el kit IMPACT™-CN de New England BioLabs) para la expresión de las 4 variantes de la amilasa contenidas en el plásmido pET22.

Las células  $\text{Ca}^{2+}$  competentes de *E.coli* fueron preparadas a través de lavados con cloruro de calcio. Las células fueron centrifugadas repetidas veces para extraer el medio de cultivo que poseía el inóculo, sustituyéndolo con la solución de cloruro de calcio.

Se tomaron 4 alícuotas de 30  $\mu\text{l}$  de las células  $\text{Ca}^{2+}$  competentes en tubos eppendorf y a cada tubo se le agregaron 5  $\mu\text{l}$  de plásmido de cada variante de la amilasa. Los tubos se dejaron incubando en hielo durante 30 minutos. Se precalentó un thermomixer compact marca eppendorf a  $42^{\circ}\text{C}$  y una vez alcanzada esta temperatura se colocaron los tubos sin agitar durante 2 minutos e inmediatamente fueron resuspendidos en 1 ml de LB y colocados en hielo por 2 minutos. Las células fueron puestas a recuperar a  $37^{\circ}\text{C}$  a 250rpm por 1 hora para después ser plaqueadas en medio LB/ampicilina, como método de selección, incubándolas una noche a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Se seleccionaron las colonias aisladas de cada variante de la amilasa para inocular un preinóculo de 10 ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina a 200 mg/L dejándolo a  $37^{\circ}\text{C}$  a 250 rpm. Estos cultivos se utilizaron para inocular un volumen de 250  $\mu\text{l}$  de medio LB/ampicilina, el cual se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación a 250 rpm hasta alcanzar una D.O de 0.6 a 600 nm. Una vez alcanzada esta densidad óptica se pasó el cultivo a hielo para adicionarle isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.2 mM como análogo no hidrolizable de la lactosa e inductor de la expresión genética. Una vez agregado el IPTG, el cultivo se dejó crecer toda la noche a  $18^{\circ}\text{C}$  a 250 rpm.

## Obtención del extracto proteico

Las células se recuperaron del cultivo por centrifugación a 9000 rpm durante 30 minutos en una ultracentrífuga refrigerada SORVALL ST16R (Thermo scientific).

El pellet celular formado se resuspendió en 25ml de una solución amortiguadora (Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM pH 7.5). Las células resuspendidas se colocaron en hielo y se sonicaron para la ruptura de membrana permitiendo liberar así el contenido de proteínas citoplásmicas, haciendo uso del equipo BRANSON SONIFER 450 (VWR Scientific) dándoles 8 pulsos a 70% de amplitud de 10 segundos haciendo pausas de 30 segundos. Se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{l}$  de cada variante para ser utilizadas posteriormente en gel de electroforesis sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS-PAGE) para la separación y visualización de las proteínas totales contenidas en el extracto celular de las clonas de *E.coli*.

Las células se calentaron a  $85^{\circ}\text{C}$  por media hora como una de las primeras etapas de purificación ya que gracias a la termoestabilidad de AmyA de *T. maritima*, fue posible al ser desnaturalizado, una separación parcial del resto proteico no termoestable de *E.coli*.

Las células lisadas de cada variante de la amilasa se centrifugaron a 9000 rpm durante 30 min a 4°C haciendo uso de una ultracentrífuga refrigerada SORVALL ST16R (Thermo scientific). Una vez centrifugado se recuperó el sobrenadante y se tomó una alícuota para el gel de SDS-PAGE comparativo.

El gel de poliacrilamida se preparó en condiciones desnaturizantes, lo que permite que las proteínas pierdan su estructura 3D haciendo que la migración dependa únicamente de la carga y el tamaño de la molécula. El agente desnaturizante empleado fue el detergente SDS.

El gel de poliacrilamida se hizo con las siguientes especificaciones dadas en la tabla 9:

**Tabla 9. Especificaciones de gel SDS PAGE.**

Gel	Separador	Empacador
ddH <sub>2</sub> O	0.958ml	1.03ml
30% Acrilamida	2.15ml	277µl
1.5 M tris pH 8.8	1.2ml	0ml
1.0 M tris pH 6.8	0 µl	204µl
7.7% SDS	60µl	19µl
20% APS	35µl	20µl
TEMED	2µl	1.5µl

Se tomaron 25 µl de las muestras tomadas del sonificado y del sobrenadante obtenido después de la centrifugación de cada variante proteica de la amilasa y se prepararon adicionándoles 10 µl de amortiguador de carga para después calentarlas a 85°C durante 3 min. Las muestras se cargaron en el gel junto con un marcador de peso molecular Precision Plus Protein (Bio-Rad).

Se dejaron corriendo por 2 horas a 150V en una cámara de electroforesis para proteínas Bio-Rad.

El gel fue analizado empleando un foto-documentador Gel Doc EZ imager marca Bio-Rad (Figura 22).

La fracción soluble fue sometida a cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC) a través de una columna de Ni<sup>2+</sup> utilizando un equipo Amersham Pharmacia Biotech P-920. Las proteínas son retenidas por la columna de níquel por fuerzas electroestáticas entre éste y las colas de histidinas. Las enzimas que no contenían las colas de histidinas fueron eluidas utilizando un buffer que contenía TrisHCl 50cmM, NaCl300 mM, pH 8.0.

Las proteínas que salían del FPLC fueron detectadas por un detector de luz UV, dándonos un seguimiento del flujo total de las proteínas así como también una estimación de la cantidad obtenida. Las proteínas de interés fueron eluidas con imidazol con un gradiente que iba de 0-100% (25 a 300 mM ) en 8 min (Figura 23).

Las fracciones que mostraron mayor concentración de proteína se juntaron y se sometieron a diálisis con una solución amortiguadora 50 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl y  $Ca^{2+}$  a 2 mM (Figura 24).

Las diálisis se dejaron 12 hrs en cuarto frío y en agitación continua, se realizó un cambio de buffer por la mañana para dejarlo 3 horas más.

Las proteínas dializadas fueron recolectadas y cuantificadas mediante el método de Bradford. Se preparó una solución con la proporción 1 volumen de reactivo de Bradford con 4 volúmenes de  $H_2O$  MQ. Para la cual se realizó una curva estándar de calibración a partir de una solución de albúmina bovina de concentración conocida.

De una concentración de 1 mg/ml de albumina bovina se realizaron las siguientes diluciones, la reacción se hizo en 1 ml de la siguiente manera:

**Tabla 10. Curva patrón para la cuantificación de proteína por el método de Bradford**

Volumen albumina ( $\mu$ l)	0	1	2	4	8
Solución Bradford	1000	999	998	996	992
Proteína( $\mu$ g/ml)	0	1	2	4	8

Se leyó la absorbancia de cada punto a una longitud de onda de 595 nm utilizando como muestra blanco el punto 0  $\mu$ l de proteína. Los puntos se ajustaron a una recta que sirvió para la cuantificación de muestras experimentales por interpolación en la curva ( $R^2 > 0.9$ ).

Para la preparación de las muestras incógnita se procedió de igual forma como las muestras de calibración. Se tomaron dos volúmenes diferentes de cada variante de la amilasa y se promediaron los resultados.

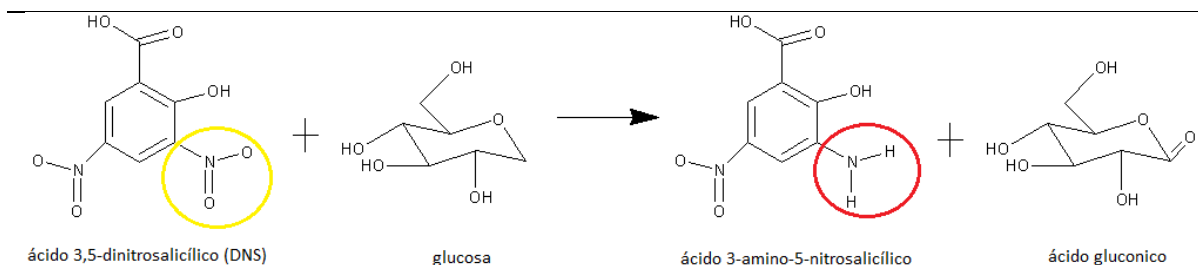
## Determinación de la actividad específica

La actividad específica para cada enzima se determinó midiendo los azúcares reductores liberados por la hidrólisis de almidón después de la adición de la enzima a la muestra en diferentes tiempos de incubación, de acuerdo al método DNS<sup>17</sup>.

Estas reacciones se llevaron a cabo empleando 1 ml de una suspensión con 10 mg/ml de almidón soluble (Sigma) y amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7 incubada a 85°C en un Thermomixer compact (Eppendorf).

A esta suspensión se le adicionó la enzima purificada, dejándose incubar a 85°C durante 12 minutos, lapso en el que se tomaron alícuotas de 50 µl cada 2 ó 3 minutos a partir de la adición de la enzima (el cual se considera como tiempo cero), dependiendo de la velocidad de despolimerización del almidón.

Estas alícuotas se vierten inmediatamente en eppendorf de 1.5 ml con 50 µl de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con el fin de detener la reacción al desnaturizar las proteína. La mezcla es calentada en agua hirviendo por 5 minutos para desarrollar el color generado por la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico por el grupo carbonilo libre de los azúcares reductores del almidón hidrolizado (Figura 11).



**Figura 11. Reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico**

Se ilustra el modelo de reacción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Esta molécula de color amarillo es reducida cuando está en presencia de azúcares activados siendo reducida a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico cambiando su color a rojo cobrizo.

Después de enfriarse las muestras en hielo para evitar su evaporación, se adicionaron 500 µL de agua destilada. El color desarrollado por la solución se midió espectrofotométricamente a 540 nm. Después de relacionar la velocidad de formación de azúcares reductores con la cantidad de enzima empleada y su concentración, obtenemos



la actividad específica, expresada en términos de micro equivalentes de glucosa ( $\mu\text{moles}$ ) liberados por minuto por mL de amilasa.

## Reacción de hidrólisis y alcoholisis

Para llevar a cabo las reacciones de alcoholisis, se midió la actividad específica de cada una de las variantes justo antes de realizar el ensayo, se calculó el volumen necesario para adicionar 20 U ( $\mu\text{mol}$  por min por mL de amilasa) de cada enzima y se dejaron incubando 24 hrs en una solución de almidón 100 mg/mL y butanol 10% v/v a una temperatura de 85°C. Después se dejó 24 hrs más con un tratamiento donde se les adicionó 25 U de glucoamilasa. Contando como tratamiento control una solución de almidón sin butanol. Los experimentos se hicieron por duplicado.

Para la construcción de una curva estándar se preparó una solución con una concentración de 10 mg/ml de glucosa y se realizaron las diluciones de acuerdo a la Tabla 11.

**Tabla 11. Curva patrón para la reacción con DNS**

Volumen glucosa( $\mu\text{l}$ )	0	2	5	15	20
Buffer Tris pH 7.5( $\mu\text{l}$ )	50	48	45	35	30
DNS ( $\mu\text{l}$ )	50	50	50	50	50

Al finalizar la reacción de AmyA, se le agregó 25 U/mL de glucoamilasa (GA) dejando la reacción por 24 horas más. El tratamiento con glucoamilasa es utilizado para romper el polímero de almidón, llevando los productos idealmente hasta G1, ya sea unido en forma de butil glucósido o de glucosa.

A cada enzima se le realizó por duplicado un tratamiento con y sin GA, contando como grupo control un tratamiento en ausencia de butanol.

## **Análisis de los sustratos y productos por TLC**

El análisis de los sustratos y productos de reacción se realizó cualitativamente mediante cromatografía en capa fina de acuerdo a las técnicas convencionales en placas HPTLC de sílice gel 60 (10X10 cm) Merck, utilizando como sistema de elución una mezcla butanol/etanol/agua (30:50:20). El revelado de las placas se realizó por aspersion con una solución de  $\alpha$ -naftol al 2.4% en una mezcla etanol/agua/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (83:7:11) y calentando a 100°C durante 1 min (Figura 31 y 32).

## **Análisis por HPLC de las reacciones de síntesis de butil glucósido con AMYA**

La identificación de los productos de alcoholisis y la cuantificación del butil glucósido se hizo por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), empleando un cromatógrafo Waters-Millipore 510 con detector de índice de refracción Waters modelo 410 y un inyector automático Waters 717 plus.

Se empleó una columna Thermo Scientific HypersilGold amino 250 x 4.6 mm, 5 $\mu$ , utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:agua (80:20), a un flujo de 1 mL/min y con temperatura de 30°C.

Todas las muestras fueron centrifugadas 15 minutos a 13,000 rpm previo al análisis.

La cuantificación del butil glucósido (BG) liberado por la glucoamilasa se hizo calculando el área de los picos arrojados por el software del HPLC (Figura 33).

## **Curva Michaelis-Menten**

Al utilizar el procedimiento empleado para la determinación de la actividad específica, pero variando la concentración de sustrato permiten construir una curva de Michaelis-

Menten, descrita por la ecuación  $v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$ . La cual puede describir el comportamiento de la  $\alpha$ -amilasa, al ser una reacción de primer orden ya que su velocidad de reacción depende únicamente de la concentración del reactante a la primera potencia y al no estar sujeta a inhibidores que puedan intervenir en su catálisis<sup>52</sup>.

Por medio de esta cinética se determinaran 3 magnitudes  $K_m$ ,  $k_{cat}$  y  $V_{m\acute{a}x}$  que caracterizan a una reacción que siga la ecuación de Michaelis-Menten y que además nos modelan el comportamiento enzimático en diferentes condiciones.  $K_m$  se suele asociar a la afinidad que tiene la enzima por su sustrato. Otra forma de interpretar esta magnitud es como una medida de concentración de sustrato requerida para que la enzima alcance la mitad de su velocidad máxima.  $k_{cat}$  es una medida de la formación de producto en una reacción saturada (enzima siempre ocupada por sustrato) de manera que también nos muestra cuantas veces la enzima transforma una molécula de sustrato por segundo.  $V_{m\acute{a}x}$  es la velocidad máxima de la reacción y sucede cuando todas las moléculas de la enzima están ocupadas con el sustrato. Es a partir de este punto en donde la velocidad de reacción ya no aumentará a pesar de que la concentración de sustrato sí lo haga<sup>52,53</sup>. Debido a que una  $K_m$  alta nos describe una baja afinidad de la enzima hacia su sustrato y  $k_{cat}$  nos indica la velocidad directa de la enzima, una buena enzima tendrá una  $K_m$  baja y una  $k_{cat}$  alta permitiéndonos modelar así una eficiencia catalítica con la ecuación  $\frac{K_{cat}}{K_m}$ .

Concentraciones de sustratos:

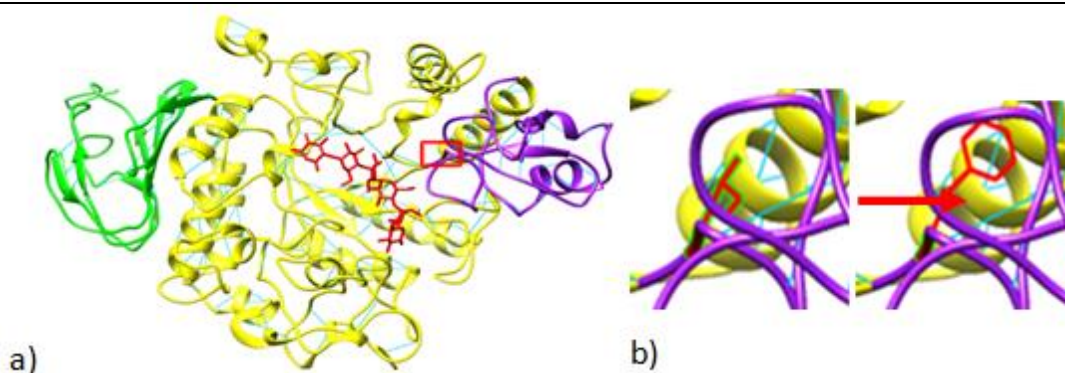
- 0.1 mg/ml
- 0.2 mg/ml
- 0.3 mg/ml
- 0.5 mg/ml
- 1 mg/ml
- 3 mg/ml
- 6 mg/ml
- 10 mg/ml.

A las soluciones de amortiguador/almidón se les adicionó un volumen de 10  $\mu$ l de enzima a intervalos de tiempo de 2 minutos para las concentraciones de 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml y 30 segundos para las concentraciones de 1 mg/ml, 3 mg/ml, 6 mg/ml y 10 mg/ml.

Las pendientes de las velocidades iniciales para las concentraciones de sustrato 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 3 mg/ml, 6 mg/ml y 10 mg/ml se graficaron para la obtención de la curva de Michaelis-Menten . Cada prueba se realizó por triplicado (Figuras 27-30).

## Resultados

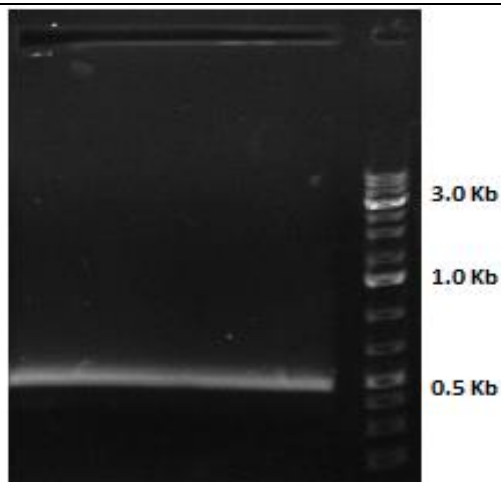
Con respecto a los objetivos particulares. El oligo mutagénico se construyó a partir del diseño hecho utilizando el programa serial cloner, de manera que al ser extendido sobre el templado de la amilasa insertara la mutación I126F, previamente seleccionada por comparación de mapas de contacto.



**Figura 12 Modelo 3D de la mutación I126F**

a) Muestra la estructura tridimensional de AmyA y la zona donde se realizará la mutación delimitada por un recuadro rojo. b) Se muestra el cambio de isoleucina por fenilalanina causada por oligo mutagénico dentro del recuadro rojo de A)

La mutación sitio dirigida fue construida por el método de mega primer<sup>51</sup>. La longitud del megaprimer de acuerdo al sitio donde se introdujo la mutación es de 538 pb, se pudo corroborar su síntesis por electroforesis en un gel de agarosa (Figura 13).



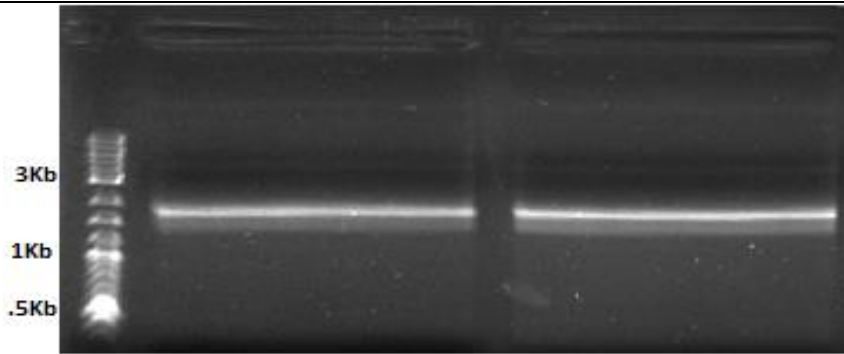
**Figura 13. Gel de electroforesis Megaprimer**

Electroforesis en gel preparativo de agarosa al 1% para su posterior purificación. Se comprueba la síntesis del megaprimer con un tamaño de 538 pb ya que la banda de este se encuentra en el orden de 500pb marcada por la escala de peso molecular montada en el lado derecho del gel. El gel se tiñó con bromuro de etidio para poder observar las bandas de ADN al iluminarlas con luz UV.

---

El megaprimer purificado se cuantificó con ayuda del nanodrop, dando como resultado una concentración de 38 ng/ $\mu$ l.

Para la segunda ronda de PCR, que daría como resultado la síntesis de ambos genes modificados de la amilasa (AmyA-F y AmyA-FQ), se utilizó el megaprimer y el oligo T7 rv con los templados silvestre y el templado que ya contenía la mutación H222Q respectivamente. Los productos se corrieron en geles de agarosa por electroforesis revelando las bandas correspondientes al gen de la amilasa de 1709 pb para ambas reacciones (Figura 14).



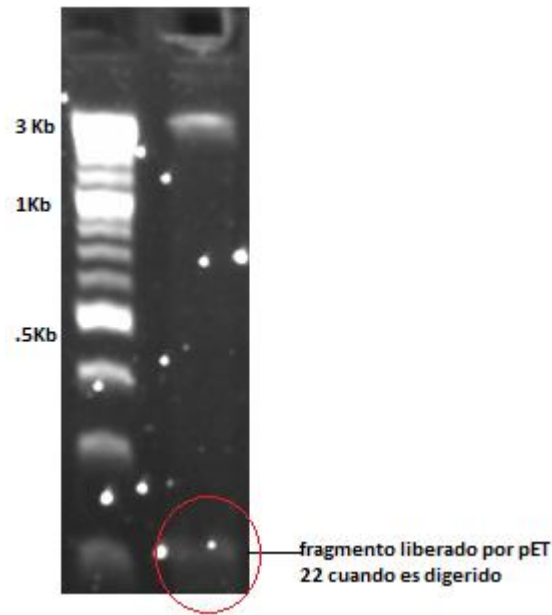
**Figura 14. Gel de agarosa que demuestra la síntesis del gen completo de la amilasa**

Gel de agarosa preparativo con el inserto de AmyA-F a la izquierda y a la derecha AmyA-FQ con un tamaño aproximado de 1.6 Kb corroborado por la escala de peso molecular montada a la izquierda del gel.

---

Se purificaron las bandas que correspondían al tamaño del gen completo de la amilasa y se dejaron los genes de AmyA-F y AmyA-FQ al igual el pET 22 a digerir con las enzimas de restricción *HindIII* y *NdeI* para crear extremos que sean complementarios entre el vector y el gen.

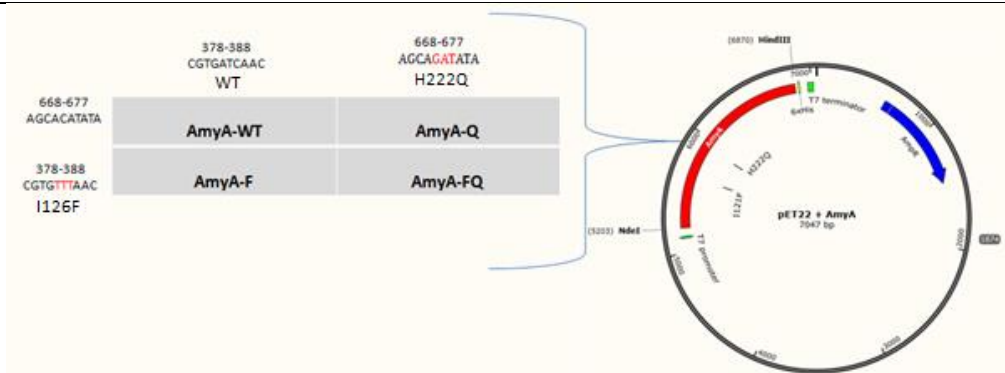
Los fragmentos liberados de los insertos al ser digeridos son demasiados cortos para ser observables en una electroforesis por gel de agarosa, sin embargo se pudo comprobar la efectividad de la reacción por medio del fragmento liberado del pET22 ya que su tamaño es superior a 100 pb pudiendo ser observable en un gel de agarosa (Figura 15).



**Figura 15. Fragmentos liberados por la digestión enzimática del vector pETT22**

Gel de agarosa donde se aprecian los fragmentos del plásmido pETT22 de 5493 pb sometido a digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* y el fragmento que es liberado de un tamaño aproximado de 100pb marcado con un círculo rojo.

Después de las purificaciones correspondientes, los genes digeridos junto con el plásmido se dejaron ligando con la enzima T4 ADN ligasa para la construcción del plásmido completo (Figura 16).



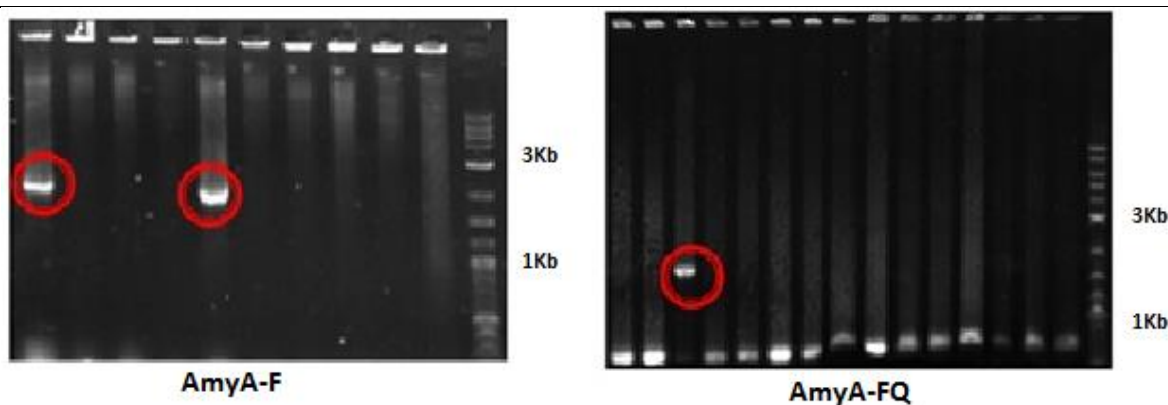
**Figura 16. Representación de las mutaciones dentro del plásmido con AmyA**

Se aprecia las secuencias genéticas con las mutaciones correspondientes al cambio de codón así como también las mutaciones que contiene cada proteína. Se muestra en azul el gen de resistencia a ampicilina, en rojo el gen de la amilasa, en verde los sitios de unión a los oligonucleótidos T7 y en amarillo la cola de histidinas (HIS-TAG).

Una vez ligados los genes al vector, se purificaron las construcciones y se procedió a realizar la transformación bacteriana por Shock eléctrico.

Los vectores pET22 con su correspondiente variante de amilasa, fueron introducidos por medio de electroporación en células competentes de *E.coli* cepa ER2566 para sobre expresión de estos. Las bacterias se plaquearon en medio con ampicilina como método de selección y se dejaron creciendo toda la noche. Se obtuvieron 10 colonias para AmyA-F y 15 colonias para AmyA-FQ.

Para verificar que efectivamente las bacterias hubieran incorporado el plásmido con la amilasa, se realizó PCR a todas las colonias obtenidas y aquellas que contuvieran el plásmido fueron mandadas a secuenciar para verificar que la secuencia de ADN no tuviera otros cambios además de los que fueron programados (Figura 17).



**Figura 17. Electroforesis en gel de PCR de colonia**

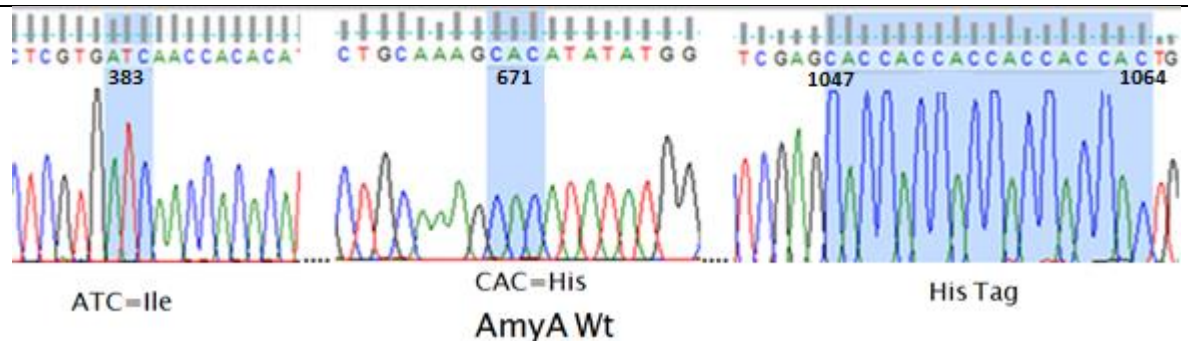
La imagen muestra las electroforesis en geles de agarosa de las PCR de colonia para discriminación de las colonias que contuvieron el inserto de AmyA de 1.6 Kb de aquellas que no. A la izquierda tenemos la PCR de colonia de la transformación de AmyA-F, y a la derecha la PCR de colonia de la transformación de AmyA-FQ. Las colonias encerradas dentro de un círculo rojo son las que se eligieron para extracción de plásmido y para su posterior secuenciación.

En las transformaciones con la mutante AmyA-F se encontró gran número de colonias pero pocas poseían la banda que correspondía al gen de inserción. En cambio con la mutación AmyA-FQ (Fig. 17 D) sólo se observó una colonia que dio positivo al gen en la PCR.

Aunque no se manipularon los plásmidos de AmyA-Wt y AmyA-Q se mandaron a secuenciar para verificar que no tuvieran ningún cambio durante su tiempo de almacenamiento.

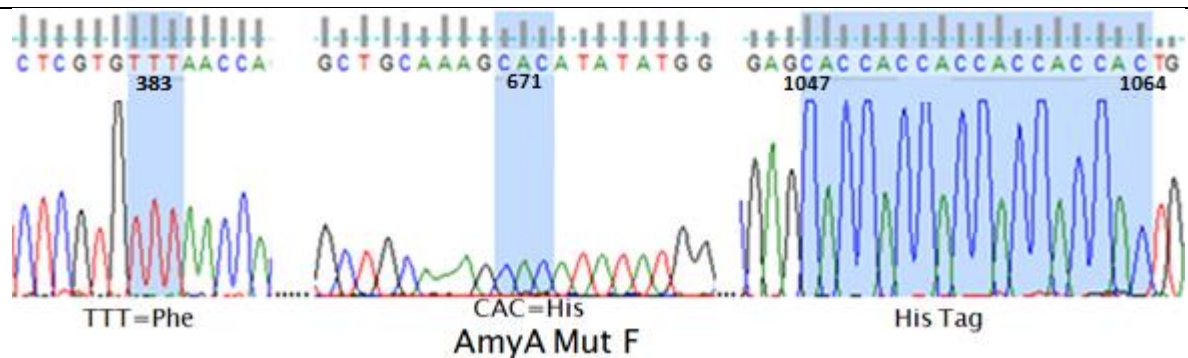


Los cromatogramas de las secuenciaciones se analizaron con los programas Finch TV y Mega 6. Aquí se buscó que no hubiera otros cambios en su secuencia aparte de los cambios diseñados en este trabajo (Figuras 18-21).



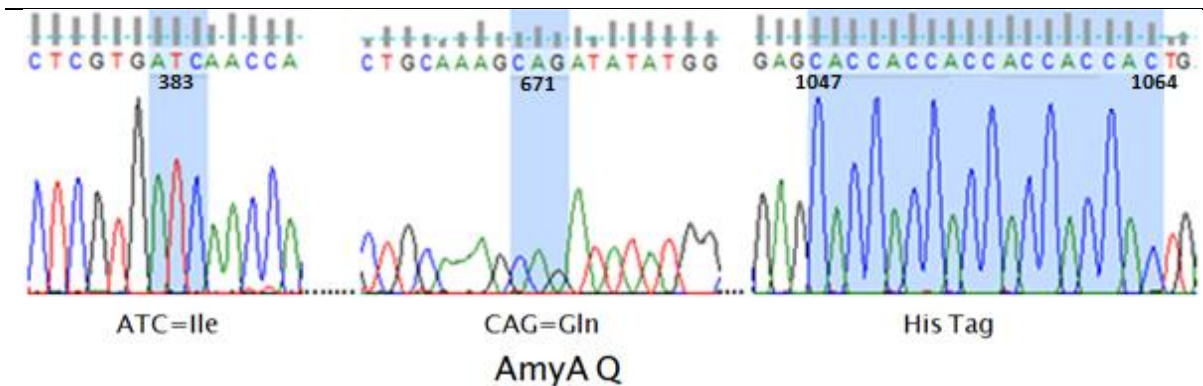
**Figura 18. Cromatograma de la secuenciación de AmyA-Wt**

Se muestran fragmentos de la secuencia obtenida del cromatograma de la secuenciación del plásmido de la enzima amilasa silvestre (AmyA-Wt), se muestra en la imagen los codones inmutados ATC en la posición 382-384 y el codon CAC en la posición 670-672 que codifican a los aminoácidos isoleucina e histidina respectivamente. Además de la secuencia que codifica para la cola de histinas con la repetición del codon CAC al final de la secuencia.



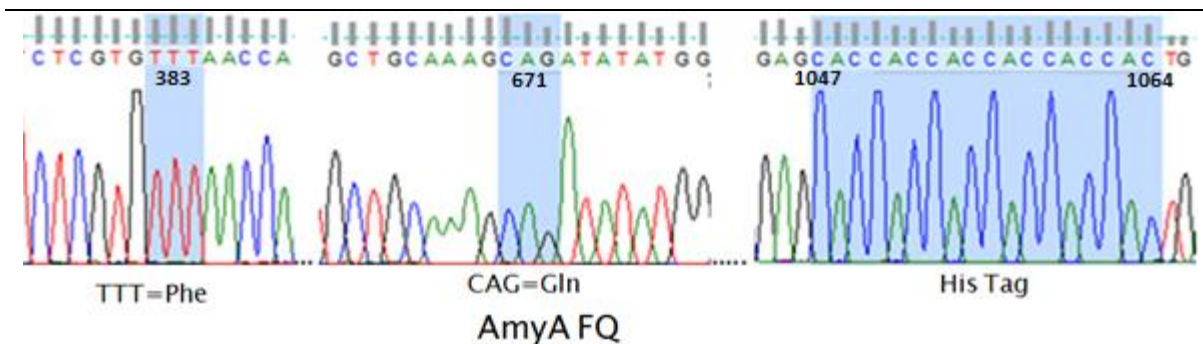
**Figura 19. Cromatograma de la secuenciación de AmyA-F**

Se muestran fragmentos de la secuencia obtenida del cromatograma de la secuenciación del plásmido de la enzima amilasa mutada (AmyA-F), se muestra en la imagen el codón donde fue insertada la mutación TTT (anteriormente ATC) en la posición 382-384 y el codón inmutado CAC en la posición 670-672 que codifican a los aminoácidos fenilalanina e histidina, respectivamente. Además de la secuencia que codifica para la cola de histinas con la repetición del codón CAC al final de la secuencia.



**Figura 20. Cromatograma de la secuenciación de AmyA-Q**

Se muestran fragmentos de la secuencia obtenida del cromatograma de la secuenciación del plásmido de la enzima amilasa mutada (AmyA-Q), se muestra en la imagen el codón inmutado ATC en la posición 382-384 que codifica isoleucina y el codón CAG donde en trabajos anteriores fue introducido el cambio de aminoácido a glutamina en la posición 670-672. Además la secuencia que codifica para la cola de histinas con la repetición del codón CAC al final de la secuencia.

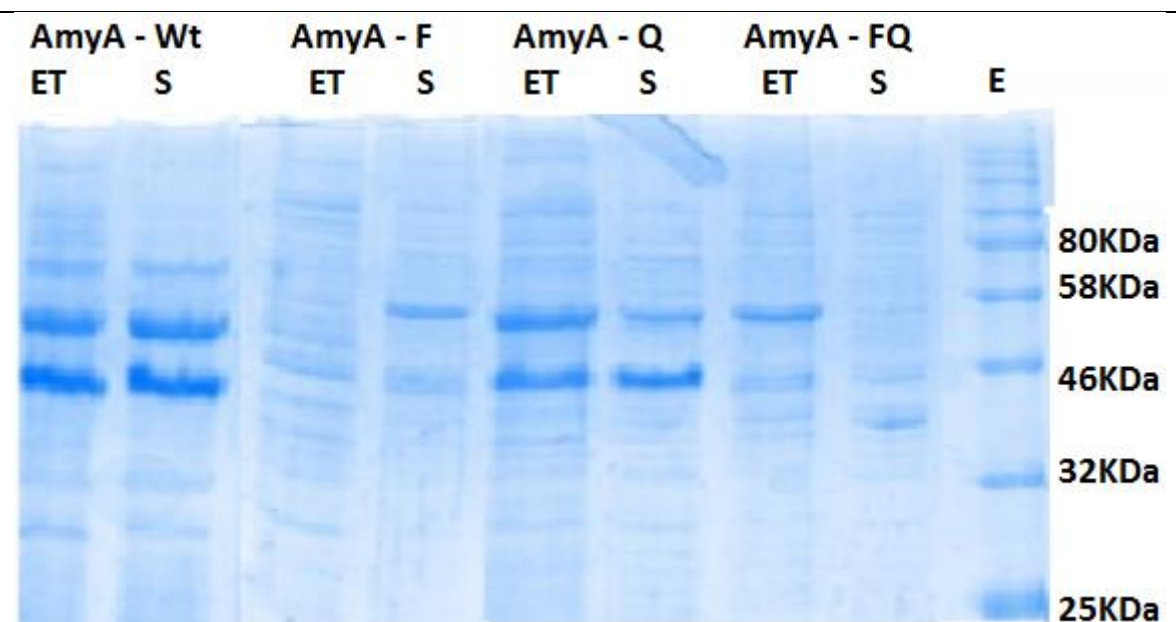


**Figura 21. Cromatograma de la secuenciación de AmyA-FQ**

Se muestran fragmentos de la secuencia obtenida del cromatograma de la secuenciación del plásmido de la enzima amilasa doble mutante (AmyA-FQ), se muestra en la imagen los codones mutados TTT en la posición 382-384 y el codón CAG en la posición 670-672 que codifican a los aminoácidos cambiados fenilalanina y glutamina, respectivamente. Además de la secuencia que codifica para la cola de histinas con la repetición del codón CAC al final de la secuencia.

Las cepas conteniendo los 4 plásmidos de AmyA se almacenaron en glicerol para contribuir a la biblioteca de mutantes de la  $\alpha$ -amilasa del laboratorio.

Las proteínas fueron exitosamente clonadas por transformación química y expresadas en la cepa ER2566 de *E. coli*. Se purificaron las 4 variantes proteicas de AmyA por columna de afinidad a Ni<sup>2+</sup> en FPLC. Se corrieron muestras de las 4 proteínas en un gel de poliacrilamida para verificar su pureza y para ver si la proteína efectivamente se encontraba soluble (Figura 22). Las proteínas fueron almacenadas en refrigeración a 4°C para evitar pérdida proteica y utilizarla en estudios de actividad posteriores.



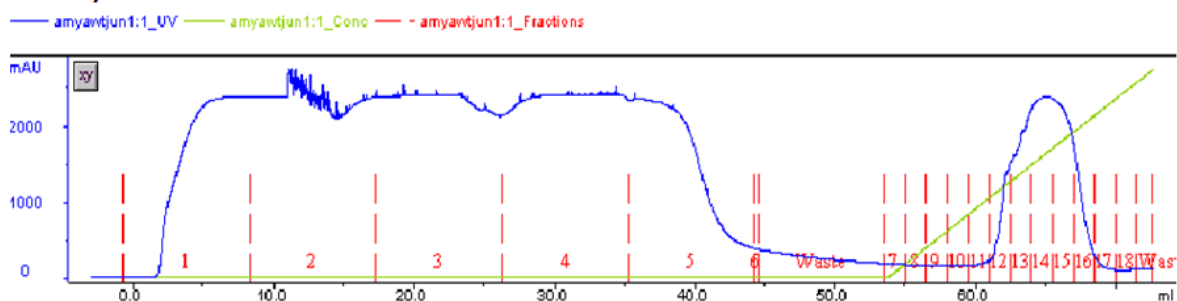
**Figura 22. Gel de SDS PAGE mostrando etapas de purificación**

Esta figura muestra la electroforesis en gel de SDS-PAGE de las variantes trabajadas de la amilasa. Cada columna correspondiente a una variante diferente, en el lado izquierdo de las columnas se encuentra el extracto total proteico y en el lado derecho se encuentra la fracción soluble. En el lado derecho del gel se encuentra la escalera de peso molecular.

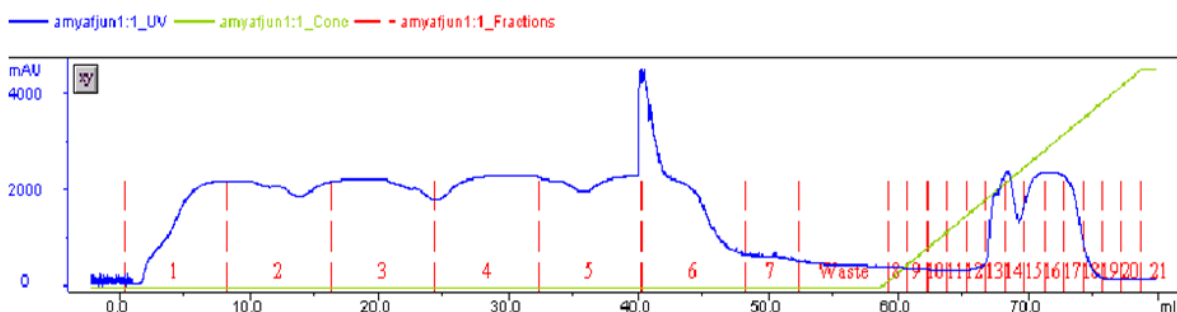
El gel muestra que las variantes de amilasa sí se expresaron al encontrarlas en el extracto total proteico mostrado en el gel. A excepción de la banda correspondiente a la fracción soluble de AmyA-FQ todas las amilasas se encontraron en la fracción soluble descartando así que pudiera estar dentro de las proteínas precipitadas. Posteriormente se comprobó que la parte soluble de AmyA-FQ presentaba actividad de hidrólisis al dejarla reaccionando en una prueba con almidón.

La fracción soluble se purificó haciendo uso del FPLC utilizando un gradiente de Imidazol para competir con las colas de histidina por la columna de afinidad. En total se cargaron 50 ml de cada proteína (Figura 23).

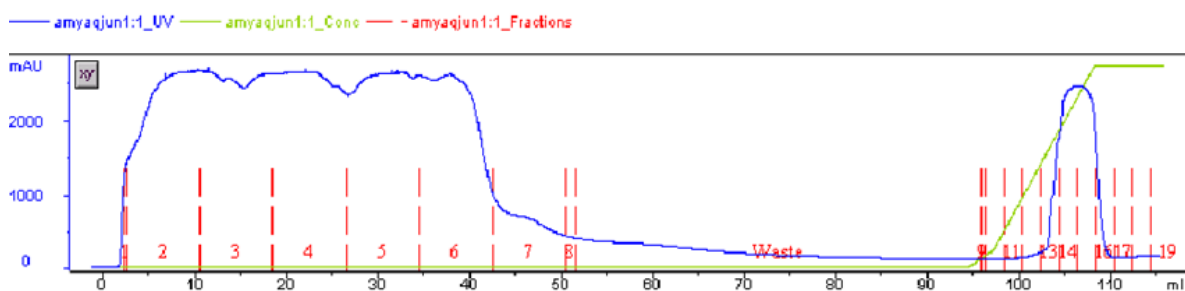
### AmyA Wt



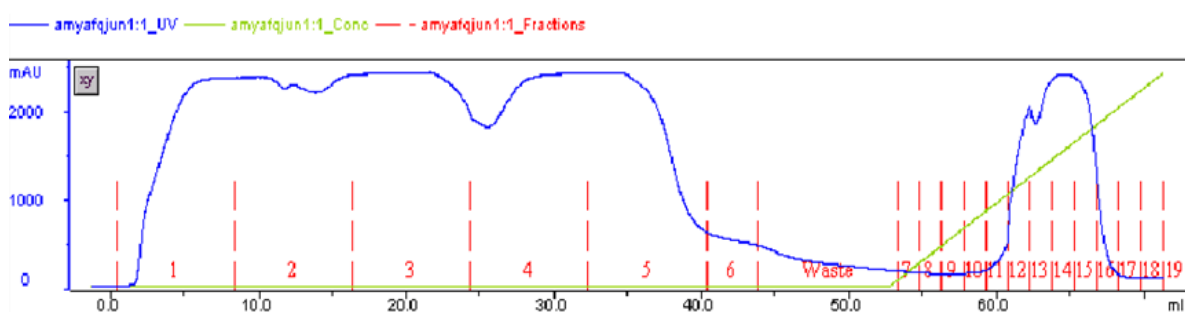
### AmyA MutF



### AmyA MutQ



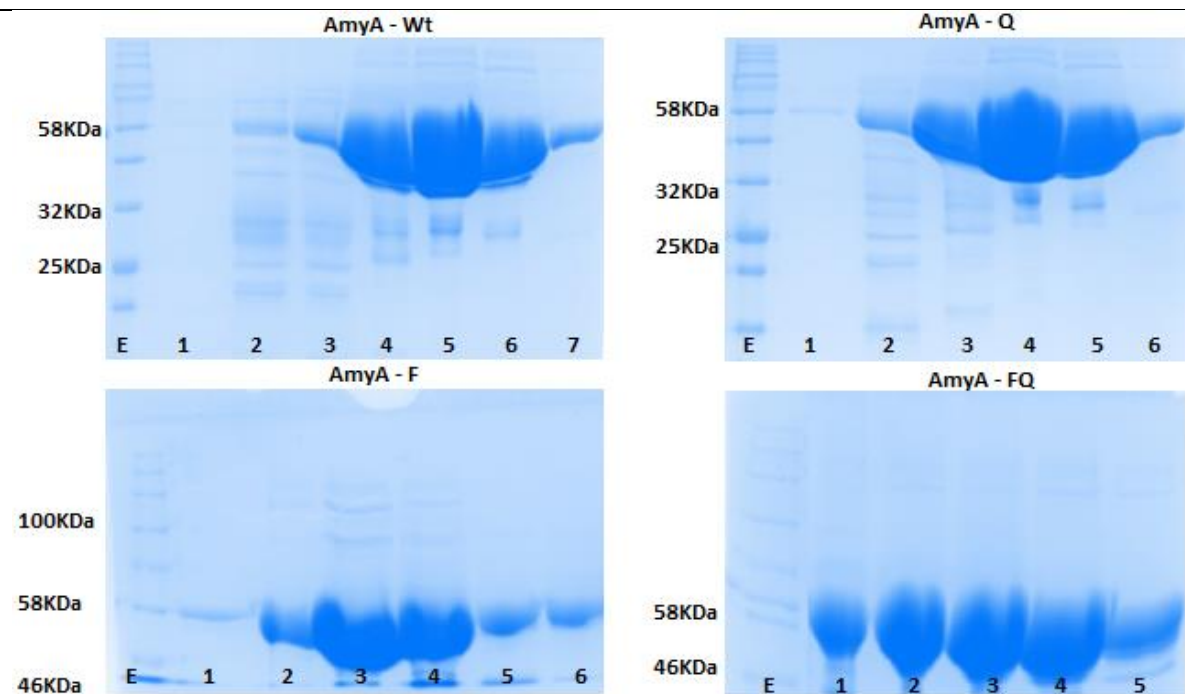
### AmyA MutFQ



**Figura 23. Corridos de las 4 amilasas variantes de amilasa**

Se muestran las corridas en el FPLC de las variantes de la amilasa trabajadas. La señal registrada por el detector de lámpara UV se muestra en línea azul, en línea verde el gradiente de imidazol y los recuadros rojos las fracciones colectadas en los con el número de tubo.

Se aprecia la totalidad de las proteínas que pasaron por la columna de níquel alrededor de los 40 primeros minutos, de éstas sólo fueron retenidas las amilasas ya que poseen las HIS-TAG, el resto de las proteínas salieron en las fracciones de lavado que se desecharon. Se observa que cuando es introducido el gradiente de imidazol, la lámpara de UV detecta el paso de proteínas, estas fracciones fueron recolectadas y analizadas en gel SDS-page (Figura 24).



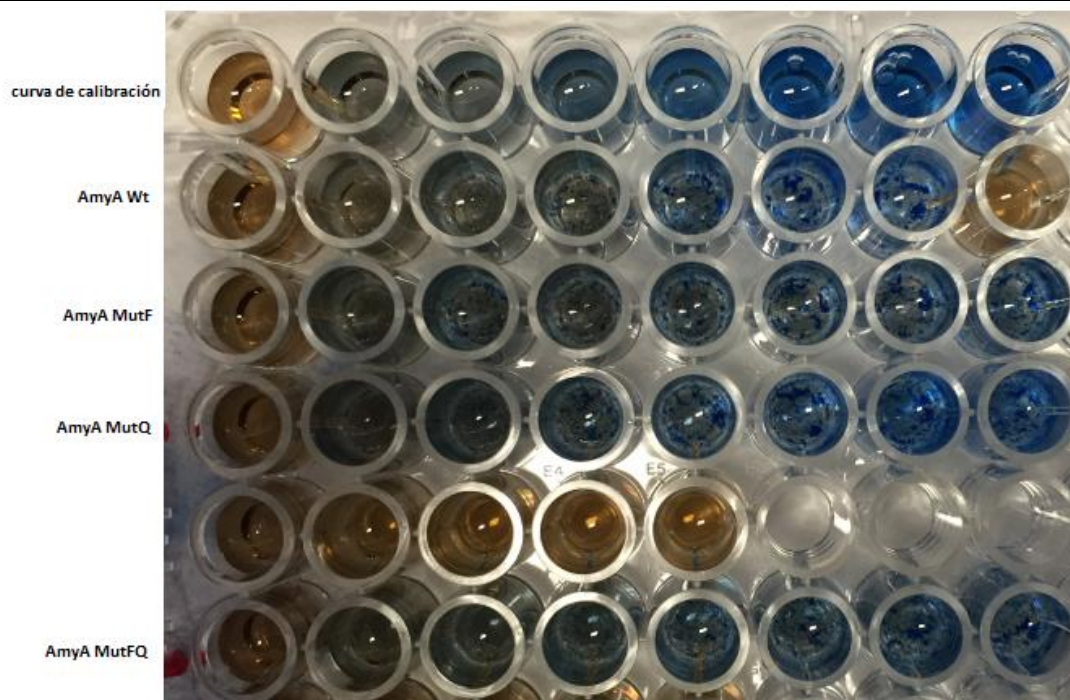
**Figura 24. Geles SDS PAGE de amilasas purificadas.**

Se muestra los geles SDS-PAGE donde se muestran las fracciones proteicas de cada variante de la amilasa después de ser purificadas por FPLC. El carril marcado con una “E” corresponde a la escalera de peso molecular para proteínas utilizada en cada gel. Los carriles enumerados corresponden al número de cada tubo de la fracción recolectada del FPLC.

Se juntaron las fracciones donde se mostró una concentración mayor de proteína, se omitieron las demás fracciones para evitar que la proteína estuviera muy diluida. De AmyA-Wt se juntaron las fracciones del tubo 3 al 7, de AmyA-Q se juntaron las fracciones del tubo 2 al 6, de AmyA-F se juntaron la fracciones del tubo 2 al 6 y de la AmyA-FQ se juntaron las fracciones del tubo 1 al 5.

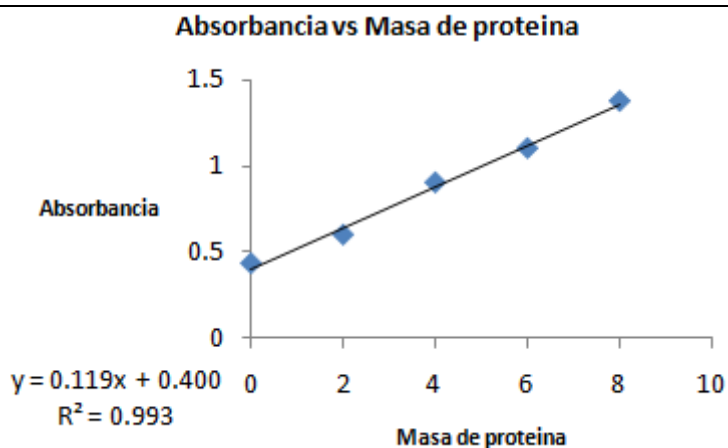
Las fracciones se dializaron toda la noche contra una solución de (Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM pH 7.5) y se cuantificó por el método de Bradford utilizando albúmina de suero bovino como estándar para construir una curva de calibración (Figura

25). La proteína AmyA-Wt fue la que obtuvo una mayor concentración aunque todas estuvieron en el mismo orden de magnitud. Se obtuvo lo siguiente de la cuantificación:



**Figura 25. Método de Bradford**

Se muestra la coloración progresiva con el aumento de concentración de proteína que se da al utilizar el método de Bradford. La concentración de proteína es proporcional a la intensidad de coloración. En la primera fila se muestra la curva estándar de albúmina bovina, pasando de menor a mayor concentración de izquierda a derecha. Seguido de las muestras amilasas.



**Figura 26. Curva estándar para método de Bradford**

Se muestra la curva estándar obtenida al leer la absorbancia a 540 nm para cuantificación de proteínas por el método de Bradford. La curva se construyó utilizando albúmina de suero bovino a concentraciones conocidas.

**Tabla 12. Cuantificación por Bradford.**

Proteína	Volumen proteína(uL)	absorbancia mutantes(540 nm)	Cant. Proteína (ug)	[Proteína] (ug/uL)
AmyA WT	5	0.843	3.7	0.75
AmyA WT	5	0.924	4.4	0.88
AmyA H222Q	5	0.7317	2.7	0.56
AmyA H222Q	8	0.9207	4.3	0.55
AmyA I191F	5	0.6056	1.7	0.35
AmyA I191F	8	0.9054	4.2	0.53
AmyA H222Q-I191F	5	0.5736	1.4	0.29
AmyA H222Q-I191F	8	0.6929	2.4	0.31

Las concentraciones obtenidas fueron las siguientes:

**Tabla 13. Proteínas obtenidas.**

Proteína	[Proteína] (ug/uL)
AmyA-Wt	0.81±0.09
AmyA-Q	0.56±0.007
AmyA-F	0.4±0.12
AmyA-FQ	0.3±0.014

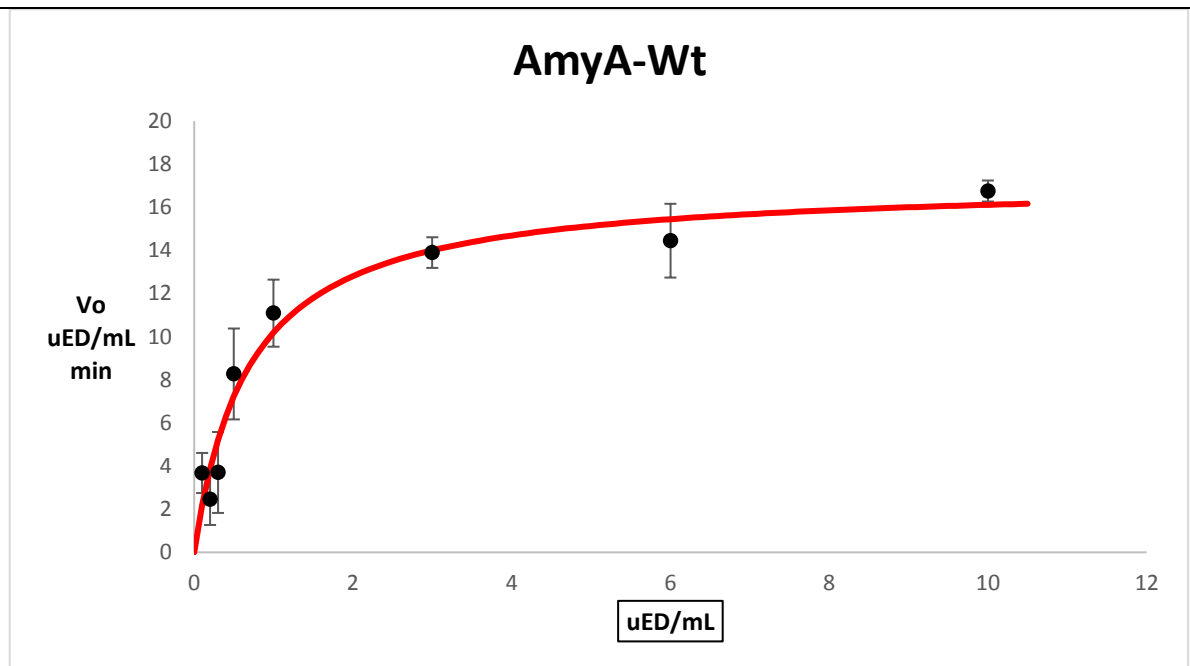
Nos percatamos que tanto la amilasa como sus variantes mutantes después de un periodo de 7 días comienzan a experimentar proteólisis, ya que al volverla a correr en un gel de SDS PAGE, aparecían dos bandas de distinto peso molecular, una de 63KDa que corresponde al peso de la amilasa y una banda de 53KDa. Razón por lo que se decidió purificar nueva proteína y comparar sus actividades antes de que este fenómeno se diera. Lo antes mostrado corresponde a los datos de la nueva extracción. Aun así como prueba extra a este trabajo, se verificó que la fracción de 53KDa aún conservaba actividad a través de la medición de azúcares reductores producidos a partir de la hidrólisis del almidón, aunque al ser pruebas que no entraban en el objetivo general de este estudio no se analizó exhaustivamente. En otros trabajos posteriores se podría comparar las actividades de la amilasa completa así como de su versión cortada, además de determinar en qué región cae dicho corte.

Se procedió a medir parámetros catalíticos de las 4 variantes de la amilasa calculando los volúmenes de adición de las proteínas para asegurar que se estuvieran poniendo el mismo número de unidades.

## Caracterización bioquímica de las variantes proteicas

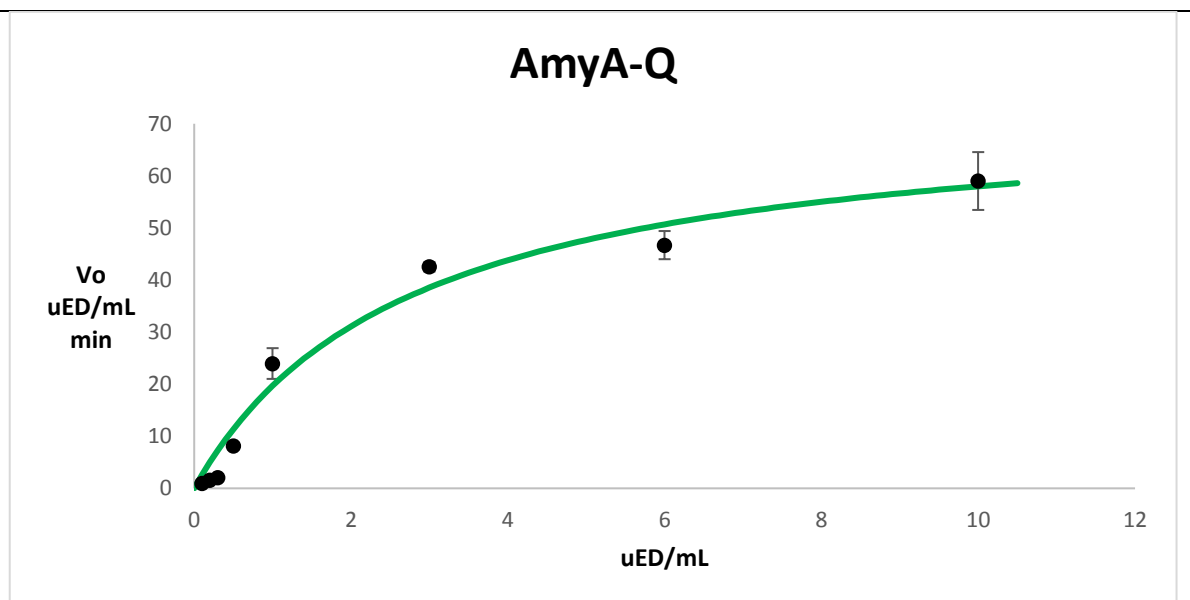
Se midieron las velocidades iniciales de formación de azúcares reductores, al variar la concentración de almidón. Con estos datos se construyeron curvas de Michaelis-Menten para determinar parámetros cinéticos como  $V_{máx}$ ,  $K_{cat}$  y  $K_m$ , y comparar la eficiencia catalítica entre las proteínas al utilizar la fórmula  $K_{cat}/k_m$ . El experimento se realizó por triplicado. La desviación estandar esta representada por las barras de error (Figuras 27-30).





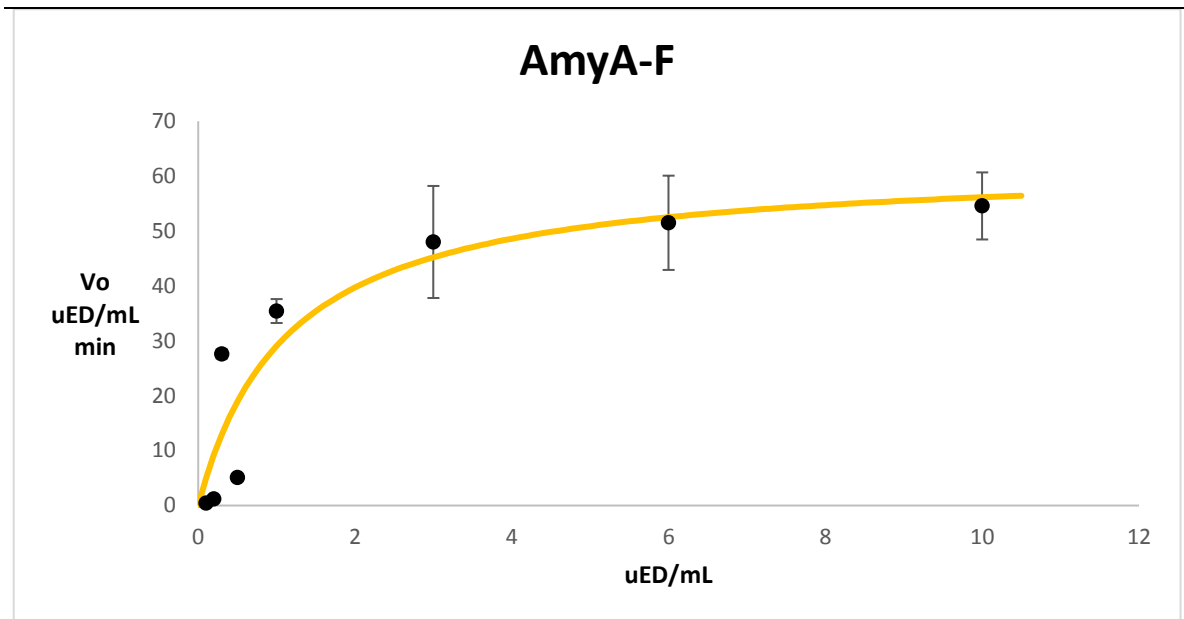
**Figura 27. Curva Michaelis-Menten AmyA-Wt**

Gráfica de diferentes concentraciones de sustrato sobre la velocidad inicial. Se observa que la enzima tiene un comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten.



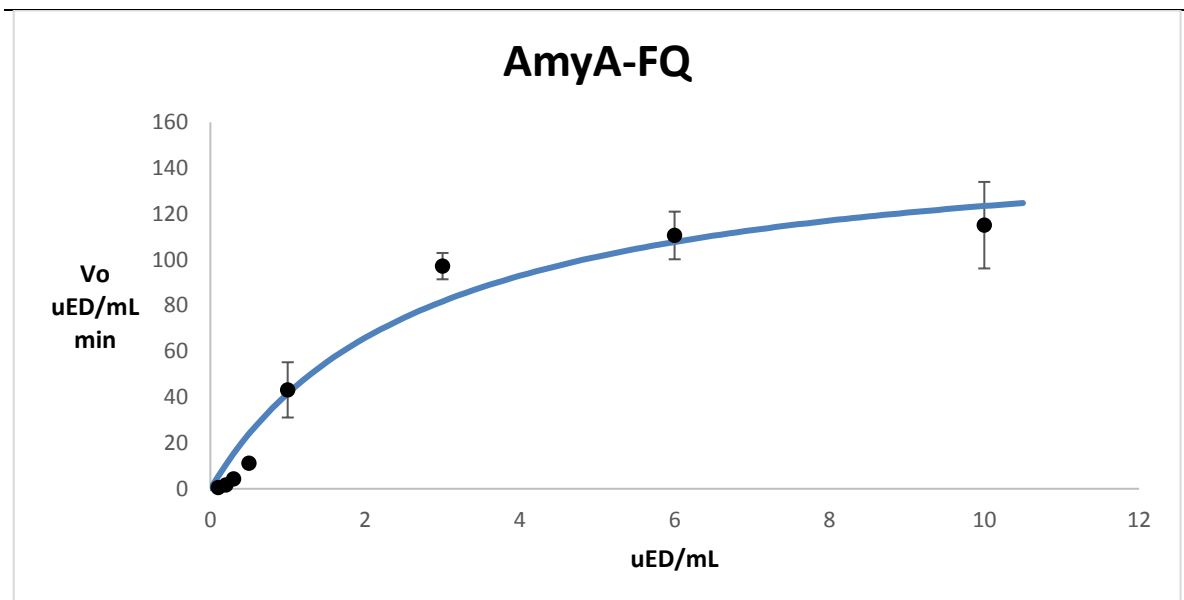
**Figura 28. Curva Michaelis-Menten AmyA-Q**

Gráfica de diferentes concentraciones de sustrato sobre la velocidad inicial. Se observa que la enzima tiene un comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten.



**Figura 29. Curva Michaelis-Menten AmyA-F**

Gráfica de diferentes concentraciones de sustrato sobre la velocidad inicial. Se observa que la enzima sigue un comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten.



**Figura 30. Curva Michaelis-Menten AmyA-FQ**

Gráfica de diferentes concentraciones de sustrato sobre la velocidad inicial. Se observa que la enzima sigue un comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten.

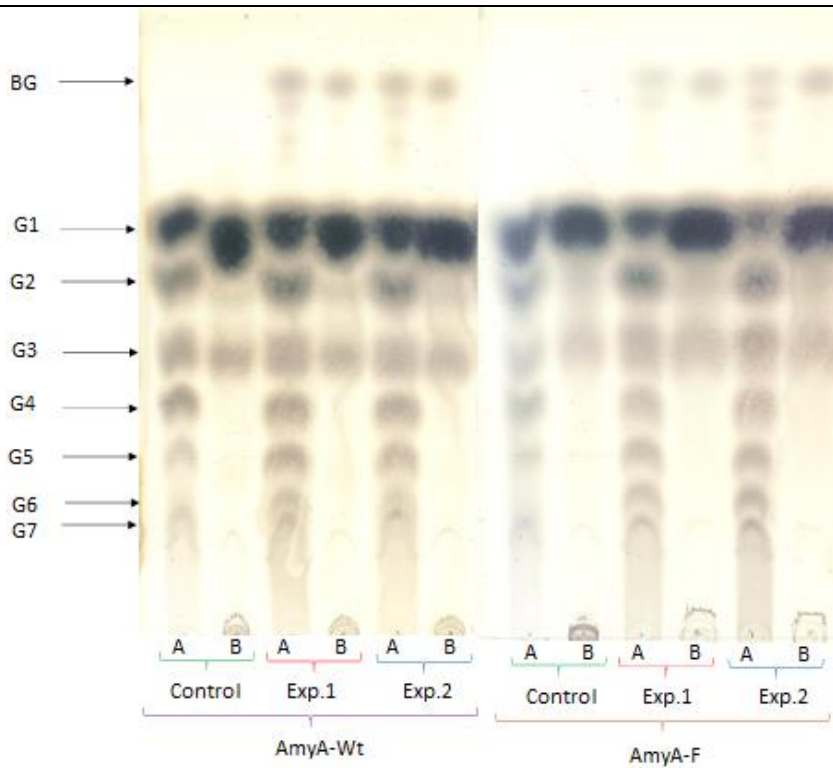
Los parámetros cinéticos se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 14 Parámetros cinéticos.**

Proteína	AmyA-Wt	AmyA-F	AmyA-Q	AmyA-FQ
$V_{m\acute{a}x}$ (uED/mL/seg)	0.286	1.043	1.23	2.61
$K_m$ (uED/mL/seg)	0.0115	0.02	0.046	0.046
$k_{cat}$	3.08 s <sup>-1</sup>	1.26 X10 <sup>4</sup> s <sup>-1</sup>	1.26X10 <sup>4</sup> s <sup>-1</sup>	2.04X10 <sup>4</sup> s <sup>-1</sup>
$K_{cat} /K_m$	2.68 X 10 <sup>5</sup> (uED/mL)	6.3X10 <sup>5</sup> (uED/mL)	2.75 X10 <sup>5</sup> (uED/mL)	4.43 X10 <sup>5</sup> (uED/mL)

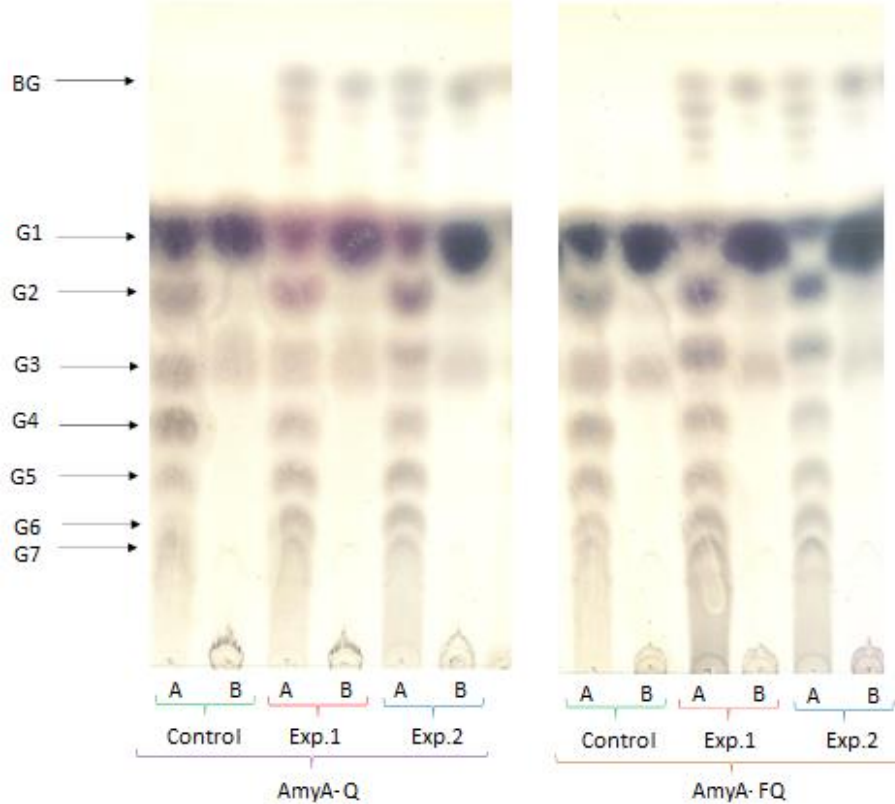
## Reacción de alcoholisis e hidrólisis por TLC

Para medir la actividad de la proteína, por medio de la actividad específica se calcularon las unidades enzimáticas para las 4 variantes de AmyA para utilizar este valor y poner el mismo número de unidades de enzima en cada ensayo. Se dejó reaccionando a 20 unidades de enzima con almidón para la generación de productos de menor peso molecular en una reacción con y sin butanol, además de una reacción secundaria con 25 unidades de glucoamilasa. Cada experimento se hizo por duplicado (Figuras 31 y 32).



**Figura 31. Cromatografía de capa fina en sílica gel de las amilasas AmyA-Wt y AmyA-F**

Se muestra la placa de sílica del TLC donde se aprecia cualitativamente la actividad de la enzima AmyA WT (izquierda) así como el efecto que tuvo la mutación I126F sobre esta enzima (derecha). En el lado izquierdo se encuentra una escala que corresponde a los distintos tamaños de oligómeros de la glucosa. Los dos primeros carriles de cada enzima corresponden al control donde el tratamiento estaba libre de butanol y por lo tanto la formación de butil glucósido no era posible. El lado izquierdo de cada columna (carril A) corresponde al tratamiento sin glucoamilasa, dejando a los productos de la reacción con las amilasas intactos. El lado derecho de cada columna (carril B) corresponde al tratamiento con glucoamilasa donde se hidrolizaba el polímero de almidón hasta sus monómeros G1.



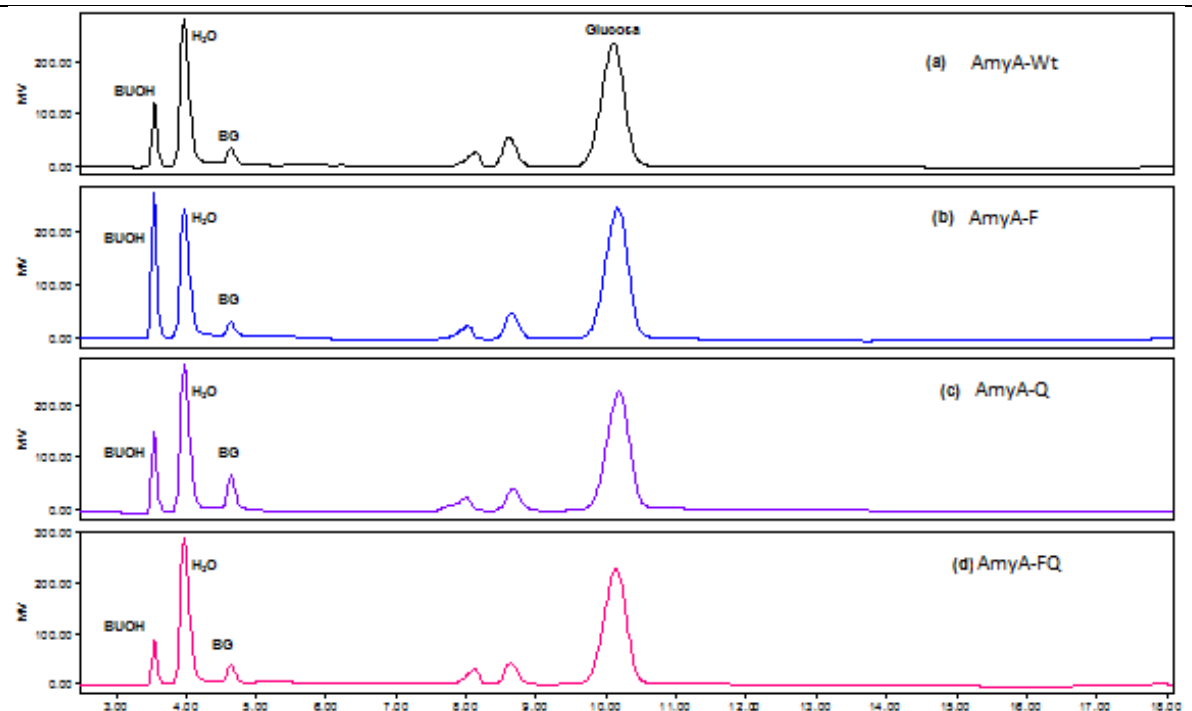
**Figura 32. Cromatografía de capa fina en sílica gel de las amilasas AmyA-Q y AmyA-FQ**

Se muestra la placa de sílica del TLC donde se aprecia cualitativamente la actividad de la enzima AmyA- Q (izquierda) construida y trabajada anteriormente en el laboratorio, así como el efecto que tuvo la mutación I126F sobre esta misma enzima (derecha). Los carriles “A” corresponden a la reacción final con AMY (24 h) sin tratamiento con GA. Mientras que los carriles “B” tratamiento con GA (24 h). Los carriles marcados como control fueron reacciones en ausencia de butanol y los marcados como Exp 1 y 2 fueron dos experimentos independientes en presencia de butanol.

Se observan de forma cualitativa la separación del perfil de productos de las amilasas obtenidos tras su reacción en un medio con butanol para una estimación rápida de su actividad. Las manchas más intensas están entre G1 y G3 para todas las enzimas denotando el perfil de productos de estas enzimas. En cuanto a la síntesis de BG, se pueden observar arriba de la mancha de G1 ya que su menor polaridad hace que corran más rápido. Las manchas son mucho menos intensas que las de G1 y G3, dándonos así una idea de lo superior que es la actividad de hidrólisis sobre la actividad de alcoholólisis. Al ser sometidas al tratamiento con glucoamilasa, una exonucleasa que digiere cadenas glicosídicas a partir de su extremo no reductor, las cadenas de glucosas en toda la gama

de productos se ven reducidas a glucosa, mientras que las de alquil glicósidos, se reducirán a glucosa más una molécula de butil glucósido por cada butil glucósido formado.

Para tener datos cuantitativos de los eventos de alcoholisis e hidrólisis se cuantificó el número de equivalentes de BG por HPLC así como el número de equivalentes de glucosa formados durante la reacción. Los resultados se muestran en las siguientes gráficas.



**Figura 33. Cromatograma de corrida en HPLC de las 4 variantes de Amilasa**

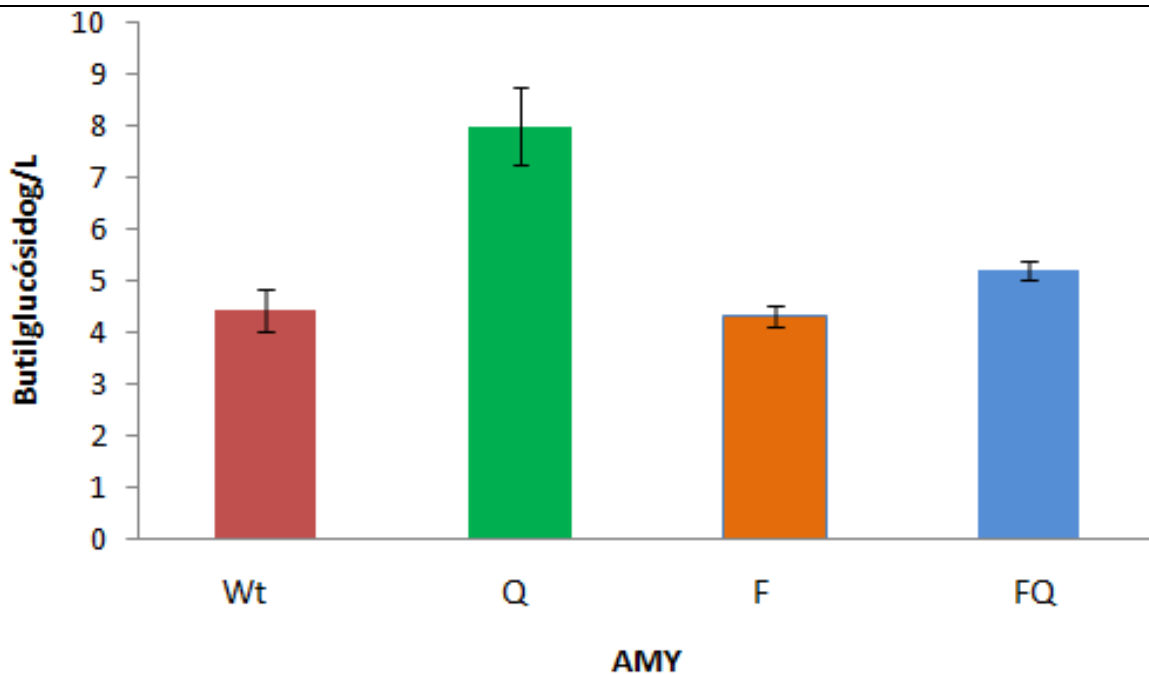
En los cromatogramas se pueden observar que las 4 amilasas tuvieron el mismo perfil molecular aunque no en las mismas cantidades. Se muestran dos picos anteriores al pico de glucosa que corresponden a moléculas no identificadas dentro del cromatograma de cada enzima y que se presume que son productos de transglucosidación anormales (diferentes de  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4)).

**Tabla 15 Resultados condensados.**

<b>Enzima</b>	<b>No. eventos de hidrólisis (μmol/mL)</b>	<b>No. de eventos de alcoholólisis (μmol/mL)</b>	<b>Alcoholólisis/hidrólisis</b>	<b>Eficiencia de la reacción de alcoholólisis (%)</b>	<b>Butil glucósido g/L</b>
WT	212.3	18.7	0.09	8.1	4.4
H222Q	179.9	33.8	0.19	15.8	8.0
I126F	210.0	18.3	0.09	8.0	4.3
FQ	209.9	22.1	0.10	9.5	5.2

En esta tabla se muestran los resultados condensados del perfil de productos al equilibrio de las 4 variantes de amilasa trabajados en este estudio con la adición del cálculo del porcentaje de eficiencia de la reacción de alcoholólisis.

No hay un efecto perceptible de la mutación I126F al ser incorporada en la proteína silvestre ya que los valores de los diferentes eventos entre la proteína silvestre y su versión con fenilalanina permanecen casi idénticos. Sin embargo al incorporar mutación I126F en la proteína H222Q la actividad de hidrólisis aumenta generando alrededor de 20 eventos hidrolíticos (μmol/mL) más, en cuanto la actividad de alcoholólisis se ve disminuida alrededor de 20 eventos (μmol/mL).

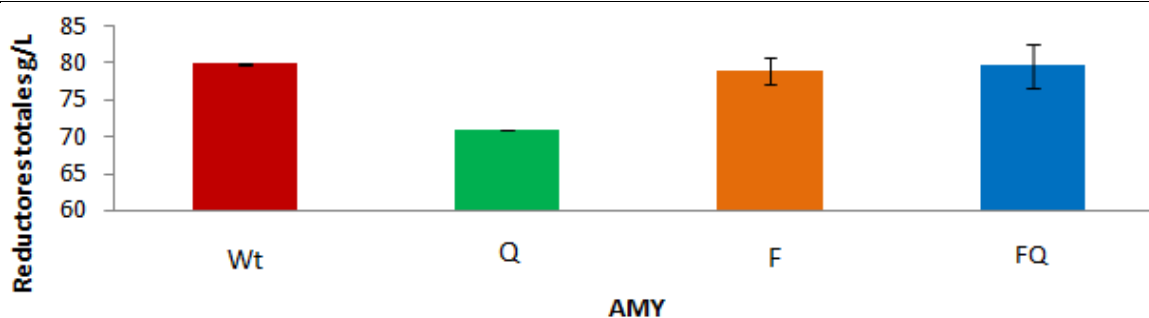


**Figura 34. Eventos de alcoholisis de las 4 variantes de amilasa**

Gráfica que presenta los eventos de alcoholisis en equivalentes de butil glucósido (BG) en una escala de gramos por litro cuantificados en HPLC de las 4 variantes de amilasa.

Los eventos de BG se cuantificaron:

- AmyA-Wt = 4.4 g/L
- AmyA-F = 4.3 g/L
- AmyA-Q = 7.9 g/L
- AmyA-FQ = 5.2 g/L



**Figura 35. Prueba de azúcares reductores de las 4 variantes de amilasa**

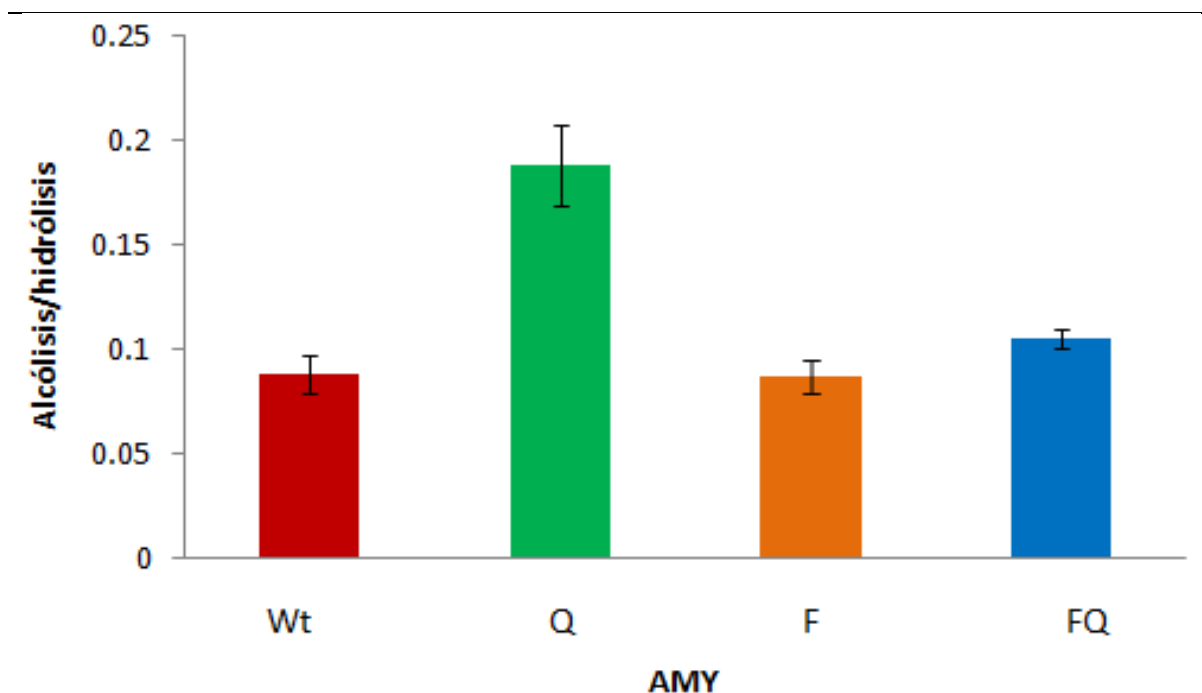
Gráfica que presenta los eventos de hidrólisis en equivalentes de glucosa en una escala de gramos por litro cuantificados en HPLC de las 4 variantes de amilasa.



Finalmente, el objetivo es aumentar las reacciones de alcoholisis con respecto a las de hidrólisis, por esto es importante evaluar la relación de estas dos actividades en cada una de las variantes. En la siguiente gráfica se muestra esta relación:

Los eventos de equivalentes a glucosa se cuantificaron:

- AmyA-Wt = 80 g/L
- AmyA-F = 79 g/L
- AmyA-Q = 70 g/L
- AmyA-FQ = 80 g/L.



**Figura 36. Eficiencia de la reacción de alcoholisis sobre la reacción de hidrólisis**

Gráfica que presenta la relación de eventos de alcoholisis sobre los eventos hidrólisis de lo antes cuantificado en HPLC.

En esta gráfica se puede apreciar la tendencia de cada enzima a inclinarse por la actividad alcoholítica en lugar de su actividad hidrolítica, mostrando su eficiencia para la reacción de alcoholisis. Se aprecia que la única proteína que muestra una mejora en la relación de

alcohólisis/hidrólisis es la mutante H222Q. Las mutantes que tienen la mutación I126F muestran una relación alcohólisis/hidrólisis similar a la de la enzima silvestre.

Siendo la medición:

- AmyA-Wt = 0.088 g/L
- AmyA-F = 0.087 g/L
- AmyA-Q = 0.19 g/L
- AmyA-FQ = 0.10 g/L

## Discusión de resultados

A lo largo del estudio nos encontramos con situaciones que si bien no eran parte de los objetivos de este proyecto, vale la pena contemplarlos para futuros estudios. Uno de estos aspectos fue el corte que sufrían las enzimas amilasas, tanto la forma silvestre como sus versiones mutadas. En un periodo de tiempo, la proteína reduce su peso molecular alrededor de 7 KDa, pasando de tener un peso de 63 KDa a 56 Kda aproximadamente. Esta modificación se hace presente en un promedio de 7 días después de que la enzima amilasa ha sido purificada, sin embargo parece no inhibir la actividad hidrolítica de ésta.

Las variantes que se estudiaron no mostraron diferencia durante las etapas de construcción genética, expresión y purificación proteica. Tampoco mostraron diferencias en su termoestabilidad y tiempo de vida media por lo que las mutaciones incorporadas en estas parecen no afectar aspectos más allá de la tasa de actividad.

El trabajo se realizó siguiendo la hipótesis propuesta por el alumno de doctorado Rodrigo Alejandro Arreola Barroso, su teoría menciona que al comparar directamente la orientación espacial de secuencias de aminoácidos de enzimas con estrecha similitud en cuanto a estructura se refiere, a través de mapas de contacto permitiría identificar aminoácidos clave que participaran en la actividad que la enzima ejerce, permitiéndonos así modificar la actividad de dichas enzimas, transfiriendo características de unas a otras. Para contribuir parcialmente a esta teoría, se propuso modificar la actividad de la  $\alpha$ -amilasa desplazándola de su actividad primaria que es la hidrólisis hacia su actividad secundaria para la transferencia de glucosas a grupos distintos al agua, por medio de cambios en su secuencia proteica hacia aminoácidos identificados en proteínas transglicosídicas dentro de su misma familia.

Al evaluar el cambio I126F en el modelo estructural con el software chimera, se aprecia que la mutación no cae sobre la zona catalítica de la enzima, sino al inicio del dominio B que se ha implicado en la unión al sustrato, por lo que un cambio en esta región significaría una modificación en la selectividad de éste (Figura 12). Además se temía que por la ubicación donde se introdujo este residuo, podría llevar a una inactividad enzimática, pero como se ha visto a lo largo de este estudio, la alfa amilasa no se inactivó.

El residuo original isoleucina con una cadena lateral alifática, posee características apolares y no tiene la capacidad para formar puentes de hidrógeno. La fenilalanina también es un residuo con estas características con la única diferencia que posee un anillo aromático dentro de su estructura siendo así de mayor tamaño confiriendo rigidez a la estructura proteica. Se pensó que con estas características podría existir un impedimento estérico que fuera más selectivo con las moléculas de butanol en las enzimas donde se ve favorecida la reacción de transglicosidación, aunque en los experimentos donde se alcanza el equilibrio se comprobó que al implementar esta mutación en la AmyA-WT y en la AmyA-Q no se obtuvo el efecto esperado en la actividad de alcoholísis. En el contexto de la enzima silvestre no tuvo ningún efecto, sin embargo, en el caso de la mutante H222Q, que era mejor alcoholítica, se observó un decremento en la actividad de alcoholísis, revirtiéndola a los valores de la enzima silvestre. En cuanto a la hidrólisis, la mutación I126F restaura la pérdida de selectividad por la reacción de hidrólisis que la mutación H222Q había provocado en AmyA-Q y queda inalterada en la AmyA-WT. Efecto contrario a nuestras predicciones.

A pesar de que el residuo fenilalanina en la posición 126 se encuentra conservado en muchas de las enzimas que llevan a cabo reacciones de transglicosidación dentro de la familia 13, familia a la cual pertenece  $\alpha$ -amilasa, se observó que al introducir este residuo en la enzima  $\alpha$ -amilasa silvestre no tiene un gran impacto ya que muestra una pequeña disminución de 0.11%, no significativa, en la eficacia de la reacción de alcoholísis. También se ve disminuida la actividad de hidrólisis aunque en menor grado como se aprecia en la Tabla 19.

El efecto de la introducción de la fenilalanina 126 también se evaluó en la construcción proteica AmyA-Q que en estudios previos del laboratorio había mostrado un incremento en el rendimiento de alcoholísis, superando un 20% la cantidad de alquil glicósidos producidos, así como una disminución en los productos de hidrólisis de alrededor de un 50% en contraste con la AmyA-WT. Utilizando esta secuencia como templado para introducir la mutación I126F, y como se muestra en la Tabla 19 el efecto de esta mutación es perjudicial para la actividad de alcoholísis ya que su eficacia en esta actividad está en 15.82% sin la fenilalanina y con esta baja alrededor de 6.3% además de también presentar

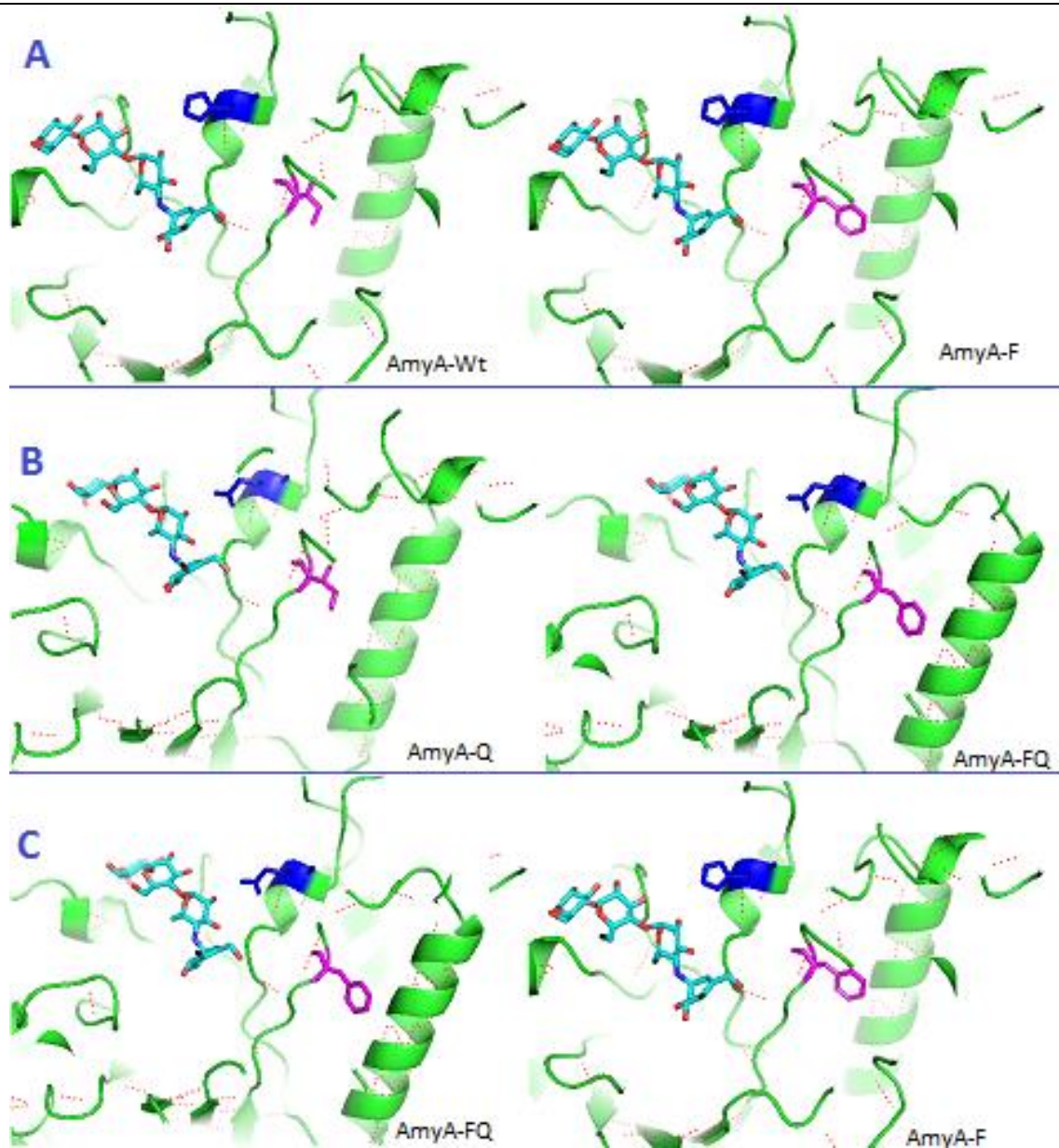
un aumento en la actividad de hidrólisis, asemejando esta última a la que posee la enzima silvestre.

Es interesante resaltar que la mutación I126F tuvo un efecto de incremento en las velocidades iniciales de la reacción de hidrólisis (Figuras 29 y 30), a pesar de que este efecto no fue contemplado en el algoritmo de selección de aminoácidos.

Ya que tanto la isoleucina como la fenilalanina son aminoácidos apolares, carecen de un grupo reactivo y no forman puentes de hidrógeno, una posible explicación a estos efectos podría ser que en la proteína con la mutación de histidina a glutamina (AmyA-Q), exista algún choque estérico entre los residuos mutados, debido a la diferencia de tamaño entre estos dos últimos aminoácidos, la fenilalanina por su rigidez ocasionada por el anillo que posee pudo haber desplazado la posición de la glutamina, haciendo que sus efectos de interacción con el sustrato y la selectividad que le otorgaba a la proteína para la entrada del alcohol con la consecuente formación de alquil glicósidos desaparecieran (Figura 37-B).

Siguiendo el mismo razonamiento, la fenilalanina pudo haber desplazado la posición de los aminoácidos para quedar en el mismo sitio que la proteína AmyA-FQ (Figura 37-C), ya que el perfil de productos al equilibrio de las proteínas AmyA-FQ y AmyA-F son muy semejantes.

Y mientras que las nuevas interacciones entre aminoácidos y sustrato ocasionadas por el desplazamiento que produce la fenilalanina en la proteína silvestre, pudieran haber coincidido con el efecto de interacción de los aminoácidos en sus posiciones originales (Figura 37-A). Siendo que al comparar las proteínas AmyA-WT con su contraparte mutada AmyA-F tampoco se ve un efecto significativo.

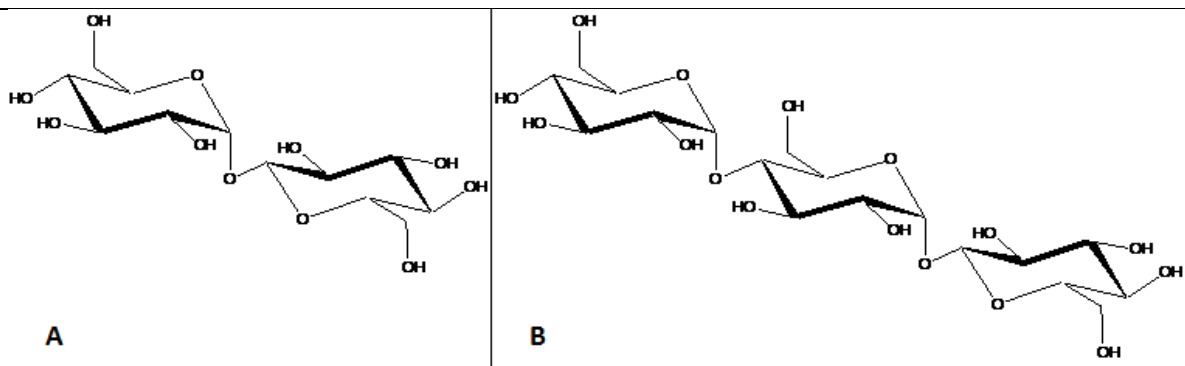


**Figura 37. Acomodo espacial aminoácidos-sustrato**

Se muestra la posición y el tamaño de los aminoácidos: isoleucina, fenilalanina, histidina y glutamina., Así como posibles interacciones entre estos, el sustrato y el resto de la proteína.

En el caso de los análisis por TLC en placa de sílica, se observa que el tratamiento con glucoamilasa no logró hidrolizar completamente los polímeros residuales de la actividad de las enzimas hasta la fase G1, dejando moléculas de tamaño G2 y G3. Se cree que estos productos se tratan de la neotrealosa, una molécula no hidrolizable que la amilasa pudo sintetizar al transferir una glucosa a otra, solo que en lugar de la formación del enlace glicosídico  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4), la glucosa entrante forma el enlace  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  1) con la glucosa que

participa la formación del complejo enzima (Figura 38). Quizás que este fenómeno se da debido a que la glucosa aceptora entra de forma incorrecta en la enzima.



**Figura 38 Neotrealosa**

Se muestra la molécula de la neotrealosa con G2(A) y G3(B). La molécula con G2 posee un enlace  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  1), en cuanto la molécula G3 posee un enlace  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  1) y un  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4).

También pudo tratarse de esta molécula al analizar los productos por HPLC, ya entre los picos correspondientes a la glucosa y al butil glucósido aparecen dos picos pequeños que no estaban contemplados. Futuros estudios podrían incluir la caracterización estructural de dichos compuestos.

## Conclusiones

Las proteínas son las moléculas más complejas que hay, llevando a cabo las funciones necesarias para que cualquier proceso biológico pueda existir. La evolución las ha transformado y refinado para que realicen una función específica cumpliendo con los altos criterios de velocidades y especificidades demandadas por los organismos vivos. Estas características de las proteínas son debido a la participación de muchos factores entre los cuales se encuentran la conformación cuaternaria de la proteína, la carga de aminoácidos que ésta posea, la interacción entre aminoácidos dentro de ésta, así como la interacción de éstos con el medio en donde se encuentre la proteína y las propiedades fisicoquímicas que sus cadenas laterales le otorguen como potencial eléctrico, solubilidad, estabilidad etc.

El método de comparación por homología de secuencias proteicas y de secuencias de ADN, sigue siendo uno de los más utilizados por la comunidad científica para reconocer

sitios muy específicos dentro de las enzimas, sitios en los cuales se puede considerar una mutación, aunque debido a la gran complejidad e interacción ya mencionada que tienen las proteínas. Es difícil conocer a fondo las implicaciones que cualquier cambio en éstas puede llegar a alcanzar ya que como por ejemplo aunque se haya identificado la función de una zona en una proteína, un aminoácido cambiado dentro de esta zona puede estar interactuando con otro aminoácido en una zona completamente diferente con una función distinta, a través de toda una red de interacciones, y éste a su vez con otros aminoácidos de su misma área y de diferentes zonas al mismo tiempo, formando así redes de trabajo muy grandes en las que una mutación de un solo aminoácido puede ocasionar la pérdida de función de la proteína entera. Son muy pocos y muy difíciles de determinar los aminoácidos que pueden ser mutados en una proteína, que si bien no conlleven a una pérdida de función, otros aspectos también están en juego como la velocidad de la reacción que ésta realiza, la especificidad por su sustrato, su estabilidad en diferentes medios y temperaturas así como también la vida media de ésta. Encontrar la mutación adecuada para que se dé el cambio deseado puede llegar a ser un camino arduo y extenso, por eso el crecimiento científico constantemente busca nuevos métodos que le sirvan para alcanzar objetivos de una forma más precisa. En este trabajo, se buscó una herramienta *in silico*, un algoritmo basado en frecuencias que nos permitiese identificar por un método de homología de mapas de contacto, aminoácidos conservados en proteínas que desarrollaban la función buscada, transfiriendo esa función a proteínas con otras características de nuestro interés, como la termorresistencia.

Nuestro trabajo indica que la proteína con una mayor actividad de alcoholisis y una baja actividad de hidrólisis al alcanzar el equilibrio, sigue siendo la AmyA-Q que por nuestros análisis indican, supera a la enzima silvestre en la producción de alquil glicósidos en un 45%, a AmyA-F en un 46% y a AmyA-FQ en un 35%, Y que nuestra mutación a pesar de estar conservada en proteínas transglicosídicas, no tuvo el efecto esperado, sino que por el contrario, inclinó la balanza hacia la actividad hidrolítica ya que AmyA-FQ gana 14% en el número de eventos de hidrólisis en contraste con la versión de la enzima sin la mutación de fenilalanina (AmyA-Q). En cuanto a la enzima silvestre con su versión con fenilalanina no se observa un gran contraste puesto que la versión mutada solo está abajo 2% en la actividad de hidrólisis y 1% en la actividad de alcoholisis. Sin embargo, la caracterización cinética de la mutación muestra un incremento en la capacidad catalítica de las enzimas. A pesar de esto el resultado fue que si se observa un efecto de esta mutación obtenida por el algoritmo basado en frecuencias desarrollado en el laboratorio, efecto que no inactiva a la proteína y que no tiene repercusión en su termoestabilidad, ni en su vida media, así como tampoco se ven alteradas las tasas de expresión ni de purificación. Otro efecto notable se dio en la selectividad por el aceptor, efecto que recae en la zona donde fue introducida nuestra mutación. Lo cual puede ser un buen indicio de

que el algoritmo sí identifica aminoácidos clave que están implicados en aspectos específicos de la proteína, siendo que el algoritmo puede requerir de ajustes para ejercer eficientemente su función.

## Perspectivas

En el caso del corte que sufre la amilasa, posibles cuestiones posteriores podrían abarcar aspectos tales como en qué medida se ve afectada tanto la actividad hidrolítica como la alcoholítica o si es que se ve modificada y precisar el lugar donde el corte ocurre. Por ejemplo, se podría haber determinado la cercanía del corte al lado carboxilo terminal o al extremo amino terminal gracias a la cola de histidinas que se les adicionó a las proteínas, se podrían purificar nuevamente las proteínas para correrlas posteriormente en un gel de SDS PAGE para dilucidar dónde correspondería el corte.

El algoritmo basado en frecuencias para reconocimientos de aminoácidos clave por medio de mapas de contacto, dentro del mismo perfil de búsqueda que guió hacia la mutación de la isoleucina por fenilalanina en la posición 126, a la vez también arrojó más residuos que no se evaluaron debido a que la fenilalanina por aspectos como su posición y por efectos de residuos similares evaluados en anteriores trabajos, parecía ser la opción más viable que contribuiría a los objetivos de este trabajo y sería pertinente evaluarlos para tener una perspectiva más profunda del algoritmo empleado y hacer las correcciones necesarias para que garantice los resultados deseados.

Se podría evaluar el algoritmo basado en frecuencias de selección de aminoácidos con respecto a la  $k_{cat}$  de las proteínas que fueron evaluadas por éste para poder darle un significado a la modificación de los parámetros catalíticos.

También sería interesante evaluar el comportamiento de todas las enzimas con sustratos de menor tamaño así como pruebas de vida media y estabilidad, ya que estos detalles no fueron vistos en su totalidad debido al tiempo disponible para realizar el trabajo.



## Bibliografía

1. Dembitsky, V. M. Astonishing diversity of natural surfactants: Glycosides of fatty acids and alcohols. (2004).
2. Stephen J. Weininger, F. R. S. *Química orgánica*. Reverté, s.a., (1988).
3. McMurry, J. *Química orgánica*. (Cengage Learning).
4. Kuriki, T. & Imanaka, T. The Concept of the Alpha-Amylase Family: Structural Similarity and Common Catalytic Mechanism. *J. Biosci. Bioeng.*(1999).
5. Mizokami, O. and K. Action on Pullulan by *Streptococcus bovis* amilase. *Starch Sci.* (1980).
6. Sakano, Y., Fukushima, J., and Kobayashi, T. Hydrolysis of  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6-glycosidic linkages in trisaccharides by *Thermoactinomyces vulgaris* amilase. *Agric. Biol. Chem.* (1983).
7. Bourne, Y. & Henrissat, B. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: Families and functional modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2001).
8. Kuriki, T., Takata, H., Okada, S. & Imanaka, T. Analysis of the active center of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. *J. Bacteriol.* (1991).
9. Machius, M., Wiegand, G. & Huber, R. Crystal Structure of Calcium-depleted *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase at 2.2 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* (1995).
10. Katsuya, Y., Mezaki, Y., Kubota, M. & Matsuura, Y. Three-dimensional structure of *Pseudomonas isoamylase* at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol.* (1998).
11. Henrissat, B. & Daviest, G. oH. (1997).
12. Juanita Yazmi n Damian Almazo. Generación de mutantes de  $\alpha$ -amilasa de *thermotoga maritima* con una actividad alcohólica incrementada. (2001).
13. Wallbn, P., Grondafil, N. J., Henschen, A. & Blombhck, B. On the Primary Structure of Human Fibrinogen. (1969).
14. Polaina, J. Estructura, función e ingeniería molecular de enzimas implicadas en la digestión de carbohidratos. (2004).
15. Henrissat, B., Sulzenbacher, G. & Bourne, Y. Glycosyltransferases, glycoside hydrolases: surprise, surprise!. (2008).
16. Kathiresan, K. & Manivannan, S. isolated from mangrove rhizosphere soil. (2006).
17. Damiann-Almazo, J. Y. *et al.* Enhancement of the alcoholic activity of amylase AmyA from *Thermotoga maritima* MSB8 (DSM 3109) by site-directed mutagenesis. (2008).
18. Dies, G., Henrissat, B., Davies, G. & Henrissat, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. (1995).
19. Moreno, A. *et al.* Transglycosylation reactions of *Thermotoga maritima* amylase.

- Enzyme Microb.* (2010).
20. Jespersen, H. M., MacGregor, E. A., Sierks, M. R. & Svensson, B. Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. (1991).
  21. Ek, S. J.  $\alpha$ -amylase family: molecular biology and evolution stefan jane. (1997).
  22. Nielsen, J. E. & Borchert, T. V. Protein engineering of bacterial K-amylases. *Biochim. Biophys.* (2000).
  23. Hernández-Medina, M., Torruco-Uco, J. G., Chel-Guerrero, L. & Betancur-Ancona, D. Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. (2008).
  24. Bibel, M., Brettl, C., Gossler, U., Kriegshäuser, G. & Liebl, W. Isolation and analysis of genes for amylolytic enzymes of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. (1998).
  25. Nelson, K. E. *et al.* Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. (1999).
  26. Schut, G. J. & Adams, M. W. W. The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: A new perspective on anaerobic hydrogen production. (2009).
  27. Huber, R. *et al.* *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. (1986).
  28. Paul, R., Lazarev, D. & Altman, S. Characterization of RNase P from *Thermotoga maritima*. (2001).
  29. Segovia, L. & Soberón, X. Evolución experimental de proteínas. (2008).
  30. Mathews, C. K. & Ahern, K. G. *Bioquímica*. (2002).
  31. Carter, P. Disease Gene Identification. (1986).
  32. Vision, C. & Constrai, N. *Scie* (1984).
  33. Jacobs, K. A. *et al.* The thermal stability of oligonucleotide duplexes is sequence independent in tetraalkylammonium salt solutions: Application to identifying recombinant DNA clones. (1988).
  34. Bartoszewska, B. & Szczerek, I. Synthesis and use of 2,6-bis(p-azidobenzylidene)cyclohexanone. (1979).
  35. Martínez, C. & Silva, E. *Metodos fisico quimicas en biotecnologia*. (2004).
  36. Kammann, M., Laufs, J., Schell, J. & Gronenbom. *Nucleic Acids Research Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction*. (1989).
  37. Tyagi, R., Lai, R. & Duggleby, R. G. A new approach to 'megaprimer' polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. (2004).
  38. Matsubara, S. *Biochem.* (1961).
  39. Shoji Matsubara. *Studies on Transmaltosidation by Taka-amylase* By (1961).
  40. Kondo, H., Nakatani, H., Matsuno, R. & Hiromi, K. Product Distribution in Amylase-Catalyzed Hydrolysis of Amylose: Comparison of Experimental Results with Theoretical Predictions. (1980).
  41. Allen, J. D. & Thoma, J. A. Subsite mapping of enzymes. Application of the depolymerase computer model to two  $\alpha$ -amylases. (1976).
  42. Ballschmiter, M., Fütterer, O. & Liebl, W. Identification and characterization of a novel intracellular alkaline  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic bacterium

- Thermotoga maritima MSB8. (2006).
43. Lim, W. J. *et al.* Cloning and characterization of a thermostable intracellular  $\alpha$ -amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. (2003).
  44. Schumann, J., Wrba, A., Jaenicke, R. & Stetter, K. O. Topographical and enzymatic characterization of amylases from the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. (1991).
  45. Segovia, L. & Peimbert, M. Ingeniería De Proteínas Y Evolución Dirigida. (2010).
  46. Saab-Rincón, G., Del-Río, G. *et al.* Introducing transglycosylation activity in a liquefying amylase. (1999).
  47. Tuchsherer, G., Scheibler, L., Dumy, P., and Mutter, M. *Biopolymers* . (1998).
  48. Hennig, M., Stenrner, R., Kirschner, K. and Jansonius, J. N. *Biochemistry* . (1997).
  49. Hinz, S. W. A. *et al.* Increasing the transglycosylation activity of galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 by site-directed mutagenesis. (2006).
  50. Kuriki, T. *et al.* Controlling substrate preference and transglycosylation activity of neopullulanase by manipulating steric constraint and hydrophobicity in active center. (1996).
  51. Serrano-rivero, Y. & Fando-calzada, A. H. R. Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. (2013).
  52. C.K. Mathews, K.E. van Holde, K. G. A. *Bioquímica*. (2002).
  53. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Principios de bioquímica*. (2009).