

BECARIO BIT DE FUNDACIÓN BANCO SANTA FE.

INGENIERÍA DE ALFA-AMILASAS; ENZIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Clavijo, María Florencia.

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos, CEFOTI. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.

Área: Ciencias biológicas
Sub-Área: Biotecnología
Grupo: Y

Palabras clave: alfa-amilasas, almidón, biocombustibles.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto es desarrollar y producir a escala de laboratorio enzimas activas y estables relacionadas con la industria de biocombustibles, especialmente del bioetanol. Para esto, proponemos realizar la caracterización bioquímica y cinética de una enzima clave para la degradación de almidón: una α -amilasa bacteriana de *Saccharophagus degradans* (SdAmy).

INTRODUCCIÓN

El almidón es un polímero de moléculas de glucosa unido a través del enlace α -1,4-glucosídico. Las α -amilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de dicho enlace y constituyen una de las principales enzimas utilizadas en las industrias. Se pueden obtener de plantas, animales y microorganismos, sin embargo las procedentes de fuentes fúngicas y bacterianas son las que han dominado aplicaciones en sectores industriales. Se encuentran entre las proteínas de alta relevancia para la biotecnología, constituyendo una clase de enzimas que abarcan aproximadamente el 25% del mercado mundial de proteínas nativas y recombinantes (Rajagopalan and Krishnan 2008). La aplicación de las amilasas se ha expandido en muchos campos como la química clínica, medicinal y de análisis, así como en la sacarificación del almidón, en industrias textiles, de alimentos, farmacéuticas y en la producción de biocombustibles.

Las propiedades de cada α -amilasa son importantes para sus aplicaciones., de esta forma, es de alto interés la identificación y caracterización de nuevas enzimas que tengan una mejor actividad biológica y propiedades diferenciales para ser aplicadas a diferentes procesos.

Recientemente fue identificado un gen que codifica para una α -amilasa putativa de *S. degradans* compuesta por 585 residuos aminoacídicos y hasta el momento no ha sido caracterizada. En este trabajo, presentamos la caracterización de la enzima recombinante SdAmy, llevando a cabo la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima y analizando sus propiedades bioquímicas.

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Elución del vector pET32a_SdAmy y transformación de células competentes *E. coli* XL1-Blue

Obtención de plásmidos pET32a_SdAmy a escala pequeña a partir de las células XL1-Blue transformadas

Transformación de la cepa de expresión de *E. coli* BL21 RIL con el vector pET32a_SdAmy

Inducción de la expresión y purificación de la proteína SdAmy: la inducción proteica se llevó a cabo mediante el agregado de IPTG 0,5 mM concentración final a 18° 2h. Se tomaron muestras de inducción al tiempo cero (sin IPTG) y a las 2 h. post-inducción.

La purificación de SdAmy se realizó mediante cromatografía de afinidad en columna comercial de sefarosa-Ni (HiTrap chelating, GE Healthcare Life Sciences).

Las inducciones, y purificaciones se analizaron mediante SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida 12%, y ensayo de *western blot* (figura 1).

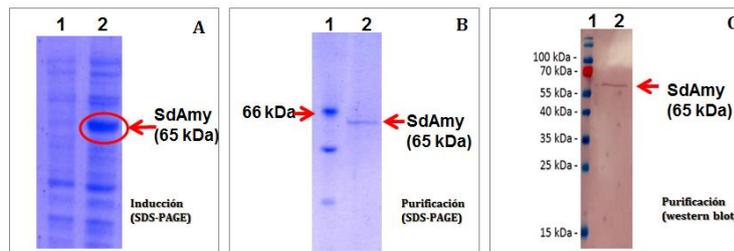


Figura 1: A- Análisis de la inducción de SdAmy en gel de poliacrilamida al 12% (P/V) (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie. Calle 1, extracto celular BL21 RIL sin inducir. Calle 2, extracto celular BL21 RIL a las 2h de inducción. **B- Análisis de la purificación de SdAmy en gel de poliacrilamida al 12% (P/V) (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie.** Calle 1: marcador de masa molecular. Calle 2, fracción de SdAmy purificada. **C- Ensayo de *western blot* para la identificación de la proteína SdAmy (anticuerpo primario anti- HIS de conejo, anticuerpo secundario anti-IgG de conejo fusionado a fosfatasa alcalina).** Calle 1: marcador de masa molecular. Calle 2: fracción SdAmy purificada.

Ensayos de actividad: Se llevaron a cabo mediante “kit” comercial (Amilokit, Wiener Lab) y ensayos de actividad en placas conteniendo AcNa 50mM pH 5,5 + Almidón (0,5% (P/V) y Agar (1,2 % (P/V)) incubadas 1h. 37°C, y reveladas con una solución de lugol. Como control positivo se utilizó una alfa-amilasa comercial de Roche (figura 2).

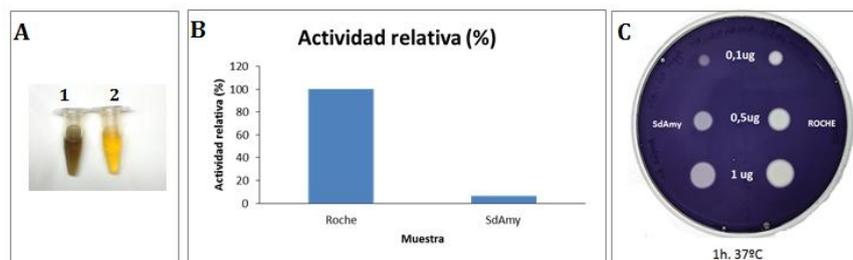


Figura 2: A- Determinación actividad por Amilokit: 1) Control negativo, 2) SdAmy. B- Actividad amilolítica relativa (%) de alfa-amilasa comercial Roche y alfa-amilasa recombinante (SdAmy) determinada por Amilokit. C- Ensayo de actividad en placa de SdAmy y alfa-amilasa comercial Roche

Efecto del pH y temperatura sobre la actividad alfa-amilasa: Se estudió el efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática, con el fin de poder determinar el pH y temperatura óptima, a la que SdAmy presenta mayor actividad (figura 3).

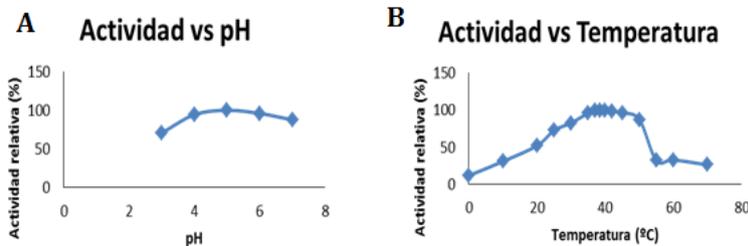


Figura 3: A- Efecto del pH sobre la actividad de SdAmy. B- Efecto de la temperatura sobre la actividad SdAmy.

Determinación de parámetros cinéticos: Se llevó a cabo el estudio de la cinética de la reacción enzimática con el fin de poder determinar los parámetros cinéticos de la alfa-amilasa recombinante y la alfa-amilasa comercial de Roche. Se realizaron mediciones de actividad a diferentes concentraciones de almidón (g/l) (figura 4).

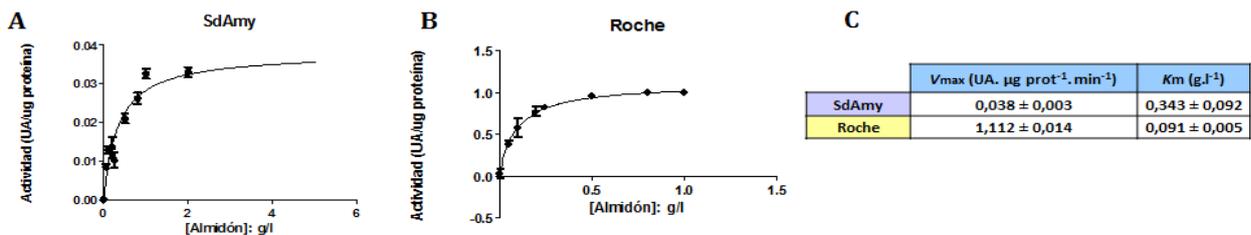


Figura 4: Gráfico de Michaelis-Menten que muestra cinética de la reacción enzimática catalizada por SdAmy (A) y por la alfa-amilasa comercial de Roche (B). C- Tabla de valores correspondientes a los parámetros cinéticos V_{max} y K_m de ambas amilasas.

Estudio de la estabilidad térmica de ambas amilasas (figura 5) y ensayos de actividad y estabilidad térmica SdAmy en presencia y ausencia de los compuestos calcio, acarbosa y maltosa (figura 6).

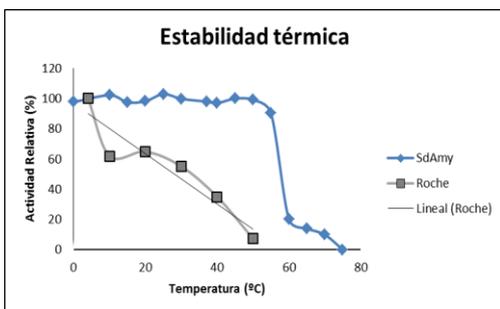


Figura 5: Efecto de la temperatura sobre la estabilidad térmica de SdAmy y alfa-amilasa comercial de Roche.

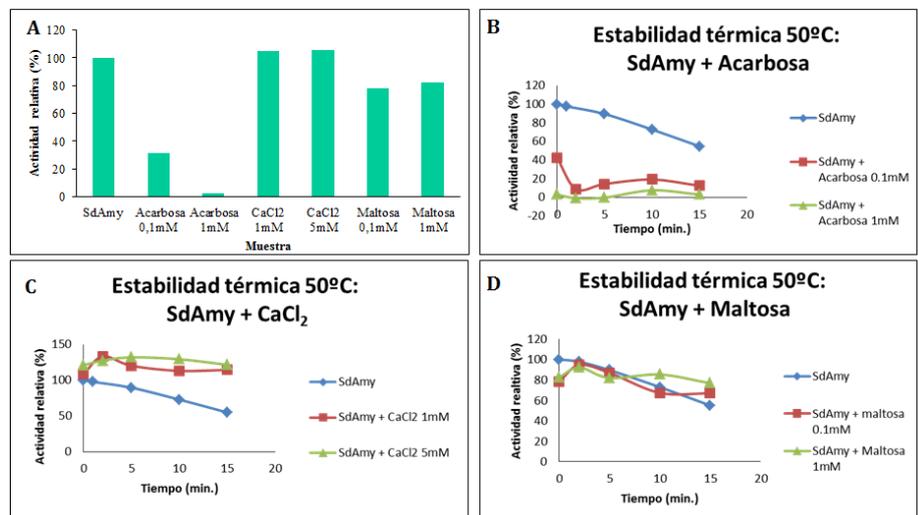


Figura 6: Efecto de los compuestos acarbosa, calcio y maltosa sobre la actividad (A) y estabilidad a 50°C de SdAmy (B, C y D).

CONCLUSIÓN

Las α -amilasa constituyen una de las principales enzimas utilizadas en las industrias y sus propiedades como estabilidad térmica, perfil de pH, estabilidad, y Ca-independencia son importantes para sus aplicaciones. Debido a esto, en el presente trabajo hemos identificado y llevado a cabo una caracterización bioquímica y cinética de la proteína alfa-amilasa de *S. degradans*.

Se determinó que presenta un pH óptimo de 5 y una temperatura óptima de 40°C. Su cinética se ajusta al modelo de Michaelis-Menten presentando una V_{max} de $0,038 \pm 0,003 \text{ UA.ug}^{-1}.\text{min}^{-1}$ y una K_m de $0,343 \pm 0,092 \text{ g.l}^{-1}$.

A partir de los ensayos sobre los efectos de la acarbosa, maltosa y calcio sobre la actividad de la proteína recombinante, observamos que la acarbosa actúa como inhibidor de la enzima, la maltosa produce inhibición por producto y que SdAmy no es Ca-dependiente.

Finalmente, hemos observado que SdAmy presenta una mayor estabilidad térmica respecto a una alfa-amilasa comercial y que el agregado de calcio la mejora significativamente inclusive a los 60 min. de incubación a 50°C. Esta característica es de gran interés en procesos industriales, como por ejemplo en la producción de biocombustibles en la que una sus etapas se lleva a cabo a altas temperaturas.

BIBLIOGRAFIA

- Ekborg, N. A., Gonzalez, J. M., Howard, M. B., Taylor, L. E., Hutcheson, S. W. & Weiner, R. M. (2005)** Saccharophagus degradans gen. nov., sp. nov., a versatile marine degrader of complex polysaccharides, *Int J Syst Evol Microbiol.* 55, 1545-9.
- Gomez-Casati, D. F., Preiss, J. & Iglesias, A. A. (2000)** Studies on the effect of temperature on the activity and stability of cyanobacterial ADP-glucose pyrophosphorylase, *Arch Biochem Biophys.* 384, 319-26.
- Gubern, G., Canalias, F. & Gella, F. J. (1995)** Determination of alpha-amylase activity: methods comparison and commutability study of several control materials, *Clin Chem.* 41,435-8.
- Jung, Y. H., Kim, H. K., Song, D. S., Choi, I. G., Yang, T. H., Lee, H. J., Seung, D. & Kim, K. H. (2014)** Feasibility test of utilizing Saccharophagus degradans 2-40(T) as the source of crude enzyme for the saccharification of lignocellulose, *Bioprocess Biosyst Eng.* 37, 707-10.7
- Ko, J. K., Ko, H., Kim, K. H. & Choi, I. G. (2016)** Characterization of the biochemical properties of recombinant Xyn10C from a marine bacterium, Saccharophagus degradans 2-40, *Bioprocess Biosyst Eng.*
- Rajagopalan, G. and C. Krishnan (2008).** "Alpha-amylase production from catabolite derepressed Bacillus subtilis KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate." *Bioresour Technol* 99(8): 3044-3050.
- Sanchez, O. J. & Cardona, C. A. (2008)** Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresour Technol.* 99, 5270-95.
- Shoseyov, O., Shani, Z. & Levy, I. (2006)** Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications, *Microbiol Mol Biol Rev.* 70, 283-95.
- Smith, A. M. (2001)** The biosynthesis of starch granules, *Biomacromolecules.* 2, 335-41.
- Taylor, L. E., 2nd, Henrissat, B., Coutinho, P. M., Ekborg, N. A., Hutcheson, S. W. & Weiner, R. M. (2006)** Complete cellulase system in the marine bacterium Saccharophagus degradans strain 2-40T, *J Bacteriol.* 188, 3849-61.
- Tomme, P., Driver, D. P., Amandoron, E. A., Miller, R. C., Jr., Antony, R., Warren, J. & Kilburn, D. G. (1995)** Comparison of a fungal (family I) and bacterial (family II) cellulose-binding domain, *J Bacteriol.* 177, 4356-63.