



ESTUDIO COMPARATIVO DEL COMPORTAMIENTO BIOQUÍMICO DE LA α -AMILASA NATIVA Y RECOMBINANTE, AmyJ33, DE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* JJC33M.

Juan José Montor Antonio; Sarahí Hernández Heredia; Sandra Trinidad del Moral Ventura; Universidad del Papaloapan, Instituto de Biotecnología. Circuito Central No. 200 C. P. 68301, San Juan Bautista Tuxtepec Oax., México; jay14_8@hotmail.com.

Palabras clave: *Bacillus amyloliquefaciens*, α -amilasa, gen.

Introducción. AmiJ33 es una α -amilasa de 50kDa producida por *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M (1). Las α -amilasas son enzimas que hidrolizan enlaces α -(1-4) y α -(1-6) del almidón, glucógeno y diversos oligosacáridos, por lo que son muy demandadas por la industria, principalmente la alimentaria.

El objetivo de este trabajo es clonar y caracterizar el gen de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (*amyJ33*), expresarlo en *Escherichia coli* y comparar las propiedades bioquímicas de AmyJ33 nativa y recombinante (AmyJ33r).

Metodología. *B. amyloliquefaciens* JJC33M se cultivó en medio YENB, a 37°C, 180rpm, por 24h. El ADN genómico se extrajo con el kit ZR Fungal/Bacterial DNA Extraction (Zymo Research). Los oligonucleótidos usados para amplificar *amyJ33*, se diseñaron a partir de la secuencia del genoma de *B. amyloliquefaciens* JJC33M (2). El producto de PCR se clonó en el plásmido pBAD TOPO® (Invitrogen) y se transformaron células de *E. coli* TOP10. La construcción se verificó mediante digestión con *NcoI* (BioLabs) y secuenciación (Macrogen Inc) usando los oligonucleótidos FpBAD y RpBAD. Las secuencias fueron empalmadas en BioEdit y analizadas con diversos programas en línea. AmyJ33r fue expresada a 37°C, 180rpm, por 20h en caldo LB, 0.2% de L-arabinosa y 100µg/ml de ampicilina. AmyJ33 fue producida por fermentación sumergida (1). Ambas enzimas fueron recuperadas del medio de cultivo por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, saturando al 60% para AmyJ33, y al 60 y 80% para AmyJ33r. El efecto y la estabilidad del pH se analizaron a pH 4, 5, 6, 7 y 8, incubando a 4°C por 1 y 24h respectivamente. El efecto de la temperatura se probó a 40, 50, 60, 70 y 80°C. La termoestabilidad se determinó a 40, 50, 60°C, por 1h. La actividad se midió a 45°C usando almidón nativo y gelatinizado.

Resultados. *AmyJ33* se identificó en el genoma de *B. amyloliquefaciens* JJC33M desde el péptido señal hasta el codón de paro. Se clonó un producto de PCR de 1980pb, que traduce para una proteína de 70kDa con N-terminal, dominio A, dominio C y C-terminal. El análisis en BLASTX de la secuencia mostró que comparte un 99 y 94% de identidad con *B. siemensis* y *B.*

amyloliquefaciens sp., *plantarum*, respectivamente. AmyJ33r se expresó en *E. coli*, sin embargo a diferencia de otras enzimas recombinantes, ésta fue exportada al medio extracelular, indicando que el péptido señal nativo de AmyJ33 es reconocido por la maquinaria celular de *E. coli*. Por otro lado, AmiJ33r mostró características bioquímicas distintas a AmyJ33. AmyJ33r sólo fue capaz de hidrolizar almidón gelatinizado, mientras que AmyJ33 hidroliza además almidón nativo. Se requirieron diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para precipitar las enzimas, para AmyJ33r 80%, y para la nativa solo 60%. AmiJ33r presentó pH óptimo a 9, mientras que AmiJ33 a 5, además mostraron perfiles de actividad distintos, con respecto al pH. En cuanto a la estabilidad a pH, AmiJ33r mostró su máxima actividad a pH 5 y 7, en cambio AmiJ33 únicamente a 5, a pH 4 AmiJ33r mostró el 10% de actividad residual, en cambio AmiJ33 el 60%, indicando que la AmiJ33 es más estable a pH ácidos que la recombinante. En cuanto al efecto de temperatura ambas enzimas muestran un perfil parecido y una temperatura óptima a 80°C. Actualmente se están evaluando otras características bioquímicas como termoestabilidad y efecto de agentes iónicos, principalmente de Ca^{+2} en la actividad así como características enzimáticas y productos de hidrólisis. También, se ha construido una versión truncada sin N ni C-terminal, para evaluar contundentemente su efecto en la hidrólisis del almidón y en el comportamiento bioquímico.

Conclusiones. AmiJ33 es procesada por *B. amyloliquefaciens* JJC33M. El N-terminal de AmiJ33 fue reconocido por la maquinaria celular de *E. coli*, provocando su exportación al medio extracelular. La enzima nativa y recombinante mostraron diferencias bioquímicas, sugiriendo que el N y/o C-terminal tienen un efecto importante en dichas características. Es posible que uno de estos extremos interfiera con disponibilidad del dominio catalítico para hidrolizar el almidón nativo.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por los proyectos CONACYT 154683 y PROMEP 2009-02 103.5/11/6149.

Bibliografía. 1. Montor J, Olvera C, Reyes D, Sachman B, Ramírez L, Del Moral S. (2014). *Nova Scientia*, 6(2): 39-59.
2. Montor J, Sachman B, Lozano L, Del Moral S. (2015). *Genome Announc*, 3.