



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA GLUCOAMILASA PRODUCIDA POR LA CEPA DE *Aspergillus niger* HPD-2

Juan Antonio Cervantes-Montelongo, Fernando Pérez-Rodríguez, José Antonio Guzmán-Cruz, Gerardo Acosta-García, Luis David Patiño-Hernández, Lorenzo Guevara-Olvera. Laboratorio de Biología Molecular; Departamento de Ingeniería Bioquímica; Instituto Tecnológico de Celaya; Antonio García Cubas s/n, Celaya, Gto, México; CP 38010. Ce: lorenzog@yahoo.com, comewithme2@hotmail.com.

Palabras clave: *Aspergillus niger* HPD-2, glucoamilasa, SBD (Starch Binding Domain).

Introducción. La cepa de *Aspergillus niger* HPD-2 fue aislada de suelo del estado de Veracruz en 1979 y presenta características de cultivo interesantes a 38 °C y un pH de 3.0. La glucoamilasa producida por esta cepa se cree que se encuentra presente aún bajo condiciones no inducibles y presenta actividad dentro de un rango de temperaturas de 65-70 °C y un pH de 3-4 (1). Por otro lado, el estudio de los dominios de unión al almidón (SBD) es importante ya que son los responsables de la unión correcta de la enzima a su sustrato para llevar a cabo la hidrólisis y que mutaciones en estos dominios de unión elimina la adecuada conformación del SBD dando como resultado una hidrólisis deficiente o nula (2). Es por ello, además de las características particulares de actividad que presenta este sistema amilolítico, se tiene como objetivo su caracterización bioquímica y molecular de la enzima glucoamilasa producida por la cepa HPD-2.

Metodología. El trabajo se pretende llevar en dos partes, en la primera se realizaron pruebas con diferentes fuentes de carbono en el medio de crecimiento, determinar la presencia de la enzima en cada medio (3) y medir su actividad por medio de azúcares reductores (4) con el propósito de corroborar si la enzima se encuentra presente en un medio no inductor de su síntesis, además de un estudio bioquímico tradicional. En la segunda parte se amplificaron por medio de PCR y clonaron las regiones tanto promotora, del marco de lectura del gen *glaA* y el dominio de unión al almidón (SBD) de la enzima utilizando oligonucleótidos específicos. Posteriormente, se analizarán y compararán estas secuencias con bases de datos como la del NCBI y EMBL para conocer si existen cambios en la secuencia de la región promotora que permitan explicar la expresión de la glucoamilasa en condiciones de no inducción.

Resultados.

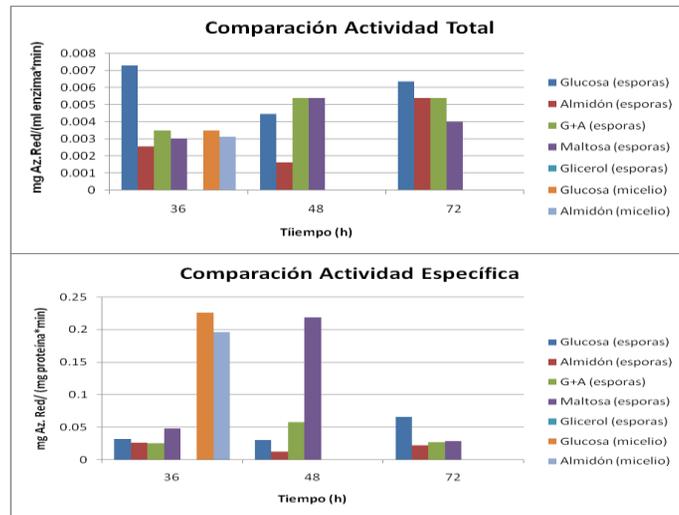
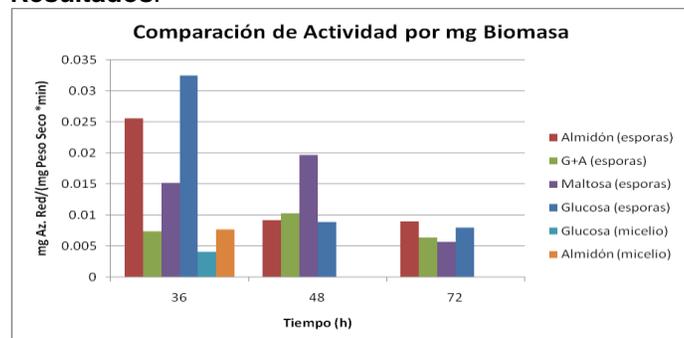


Fig. 1. Gráficas de Comparación de Actividad. Se muestra la presencia y actividad de la enzima aún en un medio no inductor.

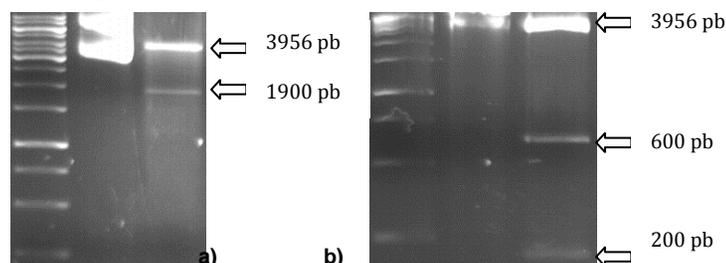


Fig.2. Geles de agarosa 1.2%Et/Br.a) ADNp digerido con *Eco* RI y liberación del inserto *glaA*.b) ADNp digerido con *Eco* RI y el inserto *pglaA*.

Conclusiones.

*Se corroboró la presencia y actividad de la glucoamilasa en el medio no inductor (glucosa).

*Se obtuvieron las clonas con los fragmentos correspondientes al gen *glaA* y al promotor, mostrando un sitio de corte interno para *Eco* RI.

Agradecimiento. Al Laboratorio de Biología Molecular del ITC y al CONACYT por el apoyo de beca de maestría para la realización del proyecto.

Bibliografía.

1. Carballo y Melgarejo, M. 1986. Sistema Amilolítico de *Aspergillus niger* HPD-2: Factores que Afectan su Producción y Actividad. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz.
2. Tzur P., Ilan L. and Oded S. 2003. *Biochemistry. Journal.* 372: 905-910.
3. Lowry, O., Randall J.R. 1951. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent.
4. Miller G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* Vol 31, No 3, 426-428.