

EVALUACIÓN DE DOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE LA α -AMILASA (AMYJ33-ABC): *Bacillus siamensis* JJC33M y *Escherichia coli*

Sarahí Hernández Heredia¹, Mariely Sosa-Marín¹, Sandra Trinidad del Moral Ventura³, Clarita Olvera Carranza², Beatriz Torrestiana-Sanchez¹, María Guadalupe Aguilar-Uscanga¹

¹Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Veracruz/ Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Miguel Ángel de Quevedo 2779. Veracruz, Veracruz, México CP 91897 (sarahihernandez5773@gmail.com; marielysosa1625@gmail.com; beatriz.ts@veracruz.tecnm.mx; maria.au@veracruz.tecnm.mx).

²Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, México CP 62210 (clarita.olvera@ibt.unam.mx).

³Investigador de México-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Instituto Tecnológico de Veracruz/Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Miguel Ángel de Quevedo 2779. Veracruz, Veracruz, México CP 91897 (sandit.dmv@gmail.com, sandra.dv@veracruz.tecnm.mx).

Palabras clave: AmyJ33-ABC nativa, AmyJ33-ABC recombinante, sistemas de expresión

Introducción. *Bacillus siamensis* JJC33M se aisló de suelos cultivados con caña de azúcar, produce un α -amilasa (AmyJ33-ABC nativa) de 50 kDa que está conformada por un dominio A/B y un dominio C. AmyJ33-ABC nativa hidroliza almidón gelatinizado y nativo, tiene un pH y temperatura óptima de 5.0 y 80°C, respectivamente ⁽¹⁾. AmyJ33-ABC nativa es una enzima con potencial biotecnológico, sin embargo, sus niveles de producción son bajos comparados con otras enzimas comerciales. Una alternativa para incrementar la producción de proteínas es la utilización de un sistema de expresión recombinante alterno como *Escherichia coli*, algunos reportes mencionan un aumento en la producción de hasta tres veces ⁽²⁾. El objetivo de este trabajo es evaluar dos sistemas de expresión: el nativo y el recombinante para la α -amilasa AmyJ33-ABC y evaluar sus características cinéticas.

Metodología. Se realizó la cinética microbiana de *B. siamensis* JJC33M y se caracterizó la proteína nativa (AmyJ33-ABC) en términos bioquímicos y enzimáticos. Por otro lado, el gen que codifica para la α -amilasa AmyJ33-ABC fue clonado en el vector de expresión pET22b(+). Las clonas positivas se analizaron por patrón de restricción con las enzimas de restricción NdeI y XhoI. Se evaluó la inducción con IPTG (0.1, 0.5 y 1 mM). Se realizó la cinética microbiana de *E. coli* transformada con el gen que codifica para AmyJ33-ABC y posteriormente se caracterizó la proteína recombinante en términos bioquímicos y enzimáticos.

Resultados. A través del análisis de las cinéticas se observó que ambas cepas (*B. siamensis* JJC33M y *E. coli*) tienen parámetros similares como la velocidad específica de crecimiento máximo ($\mu_{max}=0.57-0.55h^{-1}$). Sin embargo, *E. coli* transformada produce la α -amilasa AmyJ33-ABC recombinante con una actividad

específica de 404.5 U/mg siendo 14.7 veces más activa que la α -amilasa AmyJ33-ABC nativa producida por *B. siamensis* JJC33M (27.52 U/mg). Por otro lado, en cuanto a los parámetros cinéticos, AmyJ33-ABC recombinante es 25.7 veces más eficiente que AmyJ33-ABC nativa y 0.8 veces más afín al sustrato. AmyJ33-ABC recombinante y la nativa tienen un pH óptimo de 4.0 y 5.0, respectivamente. Se observó un efecto negativo en la afinidad por el sustrato en AmyJ33-ABC recombinante ya que no hidroliza almidón nativo. En cuanto a los productos de hidrólisis empleando a AmyJ33-ABC nativa y recombinante son similares, tal parece que la conformación de las proteínas no influye en la generación de productos glucosa, maltosa y maltotriosa pero sí influye en la eficiencia catalítica, con ello se acorta el tiempo de generación de oligosacáridos de interés. Ambas enzimas pueden ser utilizadas para el sector de panificación y obtención de jarabes fructosados.

Conclusiones. La utilización de un sistema de expresión alterno como *E. coli* permitió aumentar la actividad específica de la enzima, así como mejorar los parámetros cinéticos y enzimáticos, aunque la enzima recombinante no tiene la capacidad de hidrolizar almidón nativo, a diferencia de la nativa que hidroliza almidón gelatinizado y almidón nativo.

Agradecimiento. A CONACYT por la beca de doctorado otorgada con número de registro 002026.

Bibliografía.

1. Montor-Antonio JJ, Olvera-Carranza C, Reyes-Duarte D, et al (2014) Caracterización bioquímica de AmyJ33, una amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de suelos cultivados con caña de azúcar en la región del Papaloapan. Nova Sci. 6:39.
2. Lara, Álvaro R.. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Revista mexicana de ingeniería química, 10(2), 209-223.