



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA RECOMBINANTE DE *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 EN *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesora Guía

M.Sc. María Gabriela Granja Bastidas

Autora

Ana Cristina Cevallos Bonifaz

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo, Producción de alfa-amilasa recombinante de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 en *Escherichia coli* BL21 (DE3), a través de reuniones periódicas con la estudiante Ana Cristina Cevallos Bonifaz, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

María Gabriela Granja Bastidas

Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina: Especialidad en
Patología Molecular

C.I. 1712995149

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Producción de alfa-amilasa recombinante de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 en *Escherichia coli* BL21 (DE3), a través de reuniones periódicas con la estudiante Ana Cristina Cevallos Bonifaz, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

María Alejandra Cruz Salazar

Máster en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología

C.I. 1719928572

DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Ana Cristina Cevallos Bonifaz
C.I. 1721751137

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su amor, compañía y apoyo incondicional durante todo este tiempo y a mi mejor amiga Pauli por su amistad y apoyo.

A la MSc. Gabriela Granja por ser mi guía, por su apoyo y por compartir sus conocimientos conmigo.

A la MSc. Emilia Vásquez por su confianza y por hacer este trabajo posible.

A todas las personas que han trabajado conmigo en el Laboratorio de Biología Molecular, por su apoyo, compañía y amistad.

DEDICATORIA

A mis abuelitas Ceci e Inés por su amor, a mis padres Lupita y César por ser mi motivación, por su ayuda, por sus abrazos, por su amor infinito, por confiar en mí y por enseñarme a ser mejor cada día, a mis hermanas Caro y Gaby por ser mi compañía, por ser mis mejores amigas y por enseñarme a vivir feliz. A Isra y Rafa por su amor y apoyo. A todos ustedes, por creer en mí.

RESUMEN

La enzima alfa-amilasa es una de las más importantes endoamilasas industriales, cataliza la reacción de hidrólisis de las moléculas de almidón y las convierte en polímeros compuestos de unidades de glucosa y maltosa. Posee aplicaciones en las industrias de alimentos, textiles, papel, detergentes, farmacéutica, química, entre otras. En este estudio, la producción y expresión de la proteína recombinante alfa-amilasa *amyL* se realizó a partir de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 en células de expresión *Escherichia coli* BL21 (DE3) utilizando el vector pET SUMO. La eficiencia de transformación de las células de *E.coli* Mach1T1-pUC19 obtuvo un valor que resultó adecuado para llevar a cabo exitosamente el experimento desarrollado en este estudio. Adicionalmente, el sistema desarrollado de clonación y expresión del gen *amyL* empleando el vector pET SUMO en células de *E. coli* BL21 (DE3), fue capaz de producir satisfactoriamente la enzima alfa-amilasa mediante la inducción con IPTG. De la misma manera, el uso del promotor T7 favoreció la expresión de la enzima alfa-amilasa demostrando valores detectables de actividad enzimática y específica para la misma. Finalmente, la integridad de la enzima *amyL* se demostró mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio.

ABSTRACT

The alpha-amylase enzyme is one of the most important industrial endoamylases. This enzyme catalyzes the hydrolysis of starch molecules, which results in polymers composed of glucose and maltose. Alpha-amylase has applications in the food, textile, paper, detergent, pharmaceutical and chemical industries, among others. In this study, production and expression of the recombinant alpha-amylase protein was performed from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 in *Escherichia coli* expression cells BL21 (DE3) through the pET SUMO vector. The transformation efficiency of *E. coli* Mach1T1-pUC19 cells was a value who was adequate to carry out a successful experiment in this study. In addition, the developed system of cloning and expression of the amyL gene using the vector pET SUMO in the *E. coli* BL21 cells (DE3), was able to respond to the alpha-amylase enzyme through the induction with IPTG. In the same way, the use of the T7 promoter favored the expression of the enzyme alpha-amylase demonstrating detectable and specific values of enzymatic activity. Finally, the integrity of amyL enzyme was demonstrated by electrophoresis in polyacrylamide gels in extracellular media precipitated with ammonium sulfate.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema.....	4
1.3. Justificación	5
1.4. Objetivos	7
1.4.1. Objetivo general.....	7
1.4.2. Objetivos específicos	7
2. Capítulo II. Marco teórico	7
2.1. <i>Bacillus licheniformis</i> y sus potenciales usos en biotecnología.....	7
2.1.1. Descripción taxonómica, morfológica y fisiológica	7
2.1.2. Estructura génica	9
2.1.3. Usos potenciales en biotecnología	9
2.2. Enzima alfa-amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580.....	10
2.2.1. Definición y reacción enzimática.....	10
2.2.2.1. Estructura primaria	12
2.2.2.2. Estructura secundaria.....	13
2.2.2.3. Estructura terciaria	13
2.2.4. Procesamiento y maduración de la enzima alfa-amilasa	15
2.2.5. Parámetros cinéticos	15
2.2.6. Usos de la enzima alfa-amilasa en biotecnología.....	15

2.3. Producción de proteínas recombinantes por Ingeniería Genética	16
2.3.1. Definición	17
2.3.2. Pasos de Ingeniería Genética para la producción de alfa-amilasa recombinante	17
2.3.2.1. Selección de las células hospederas de mantenimiento y de expresión	18
2.3.2.2 Selección del vector de transferencia	19
2.3.2.3 Incorporación del fragmento que contiene el gen de interés al vector.....	21
2.3.2.4 Transformación, selección y análisis de células de mantenimiento transformadas.....	22
2.3.2.5 Transformación, selección y análisis de células de expresión transformadas.....	23
2.3.2.6 Inducción de la expresión y análisis de la proteína recombinante	24
2.3.2.7 Purificación de la proteína recombinante de interés	27
3. Capítulo III. Metodología	28
3.1. Obtención de ADN genómico de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	28
3.1.1. Cultivo	28
3.1.2. Extracción de ADN genómico de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	28
3.1.3. Visualización del ADN genómico de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580.....	28
3.1.4. Cuantificación del ADN genómico de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580.....	29

3.2.1. Diseño y análisis de cebadores del gen <i>amyL</i> de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	29
3.2.2. Optimización de la PCR con <i>Taq</i> Polimerasa Recombinante para amplificar el gen <i>amyL</i> de la enzima alfa-amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	29
3.2.2.1. Resuspensión de cebadores	29
3.2.2.2. Estandarización de temperatura de hibridación.....	30
3.2.2.3. Estandarización de adyuvantes	30
3.2.3. Generación de ADN de interés a ser insertado en el vector pET SUMO	30
3.2.3.1. Amplificación del gen <i>amyL</i> de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 con la PCR optimizada	30
3.2.3.2. Purificación del producto de PCR del gen <i>amyL</i> de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	30
3.2.3.3. Cuantificación del producto de PCR del gen <i>amyL</i> de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	31
3.3. Unión de ADN de interés al vector pET SUMO	31
3.3.1. Ligazón <i>in silico</i> del ADN de interés al vector pET SUMO.....	31
3.3.2. Ligazón <i>in vitro</i> del ADN de interés al vector pET SUMO	31
3.4. Transformación en células de mantenimiento y selección de células transformadas <i>E.coli</i> Mach1T1 con el vector control pUC 19 y el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	32
3.4.1. Transformación y selección de células transformadas <i>E.coli</i> Mach1 T1 con el vector control pUC 19	32
3.4.2. Transformación y selección de células transformadas <i>E.coli</i> Mach1 T1 con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	33

3.4.3. Eficiencia de transformación de células transformadas <i>E.coli</i> Mach1T1 con el vector control pUC 19 y el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	33
3.5. Análisis a nivel de ADN de las células transformadas <i>E.coli</i> Mach1T1 con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	34
3.5.1. PCR de colonia con cebadores internos de las células transformadas con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	34
3.5.2. Análisis de restricción <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> de colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	34
3.5.2.1. Subcultivo de colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	34
3.5.2.2. Extracción, visualización y cuantificación de ADN plasmídico de las colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	34
3.5.2.3. Análisis de restricción <i>in silico</i> de colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	35
3.5.2.4. Análisis de restricción <i>in vitro</i> de colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	35
3.6. Preservación de las células transformadas <i>E.coli</i> Mach1T1 con el vector control pUC19 y el vector recombinante pET SUMO <i>amyL</i>	35
3.7. Transformación en células de expresión y selección de células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT y el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	36
3.7.1. Transformación y selección de células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT	36
3.7.2. Transformación y selección de células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	37

3.8. Análisis cualitativo de la presencia de la enzima alfa-amilasa en células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i> , con el vector control pET SUMO/CAT sin inducir y de las células sin transformar <i>E.coli</i> BL21 (DE3).....	37
3.9. Inducción con IPTG a las células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT y con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	37
3.9.1. Inducción con IPTG a las células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT	37
3.9.2. Inducción con IPTG a las células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	38
3.10. Curvas de crecimiento de las células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i> inducidas con el tratamiento 1 y 2, sin inducir y células <i>E.coli</i> BL21 (DE3) sin transformar	38
3.11. Análisis a nivel de proteínas de las células transformadas con el gen <i>amyL</i> sin inducir e inducidos	38
3.11.1. Precipitación con sulfato de amonio de la proteína recombinante alfa-amilasa	38
3.11.2. Visualización mediante SDS-PAGE de los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio de las células <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con vector control pET SUMO/CAT, vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i> y de las células sin transformar <i>E.coli</i> BL21 (DE3)	39
3.11.3. Análisis cuantitativo de los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio de las células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i> inducidas y sin inducir y células sin transformar <i>E.coli</i> BL21 (DE3)	39

3.11.3.1. Determinación de concentración de proteínas totales	39
3.11.3.2. Determinación de actividad enzimática	39
3.11.3.3. Determinación de actividad específica	40
4. Capítulo IV. Resultados y discusión	40
4.1. Obtención de ADN genómico de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	40
4.1.1. Extracción, visualización y cuantificación de ADN genómico de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	40
4.2. Obtención del gen <i>amyL</i> de la enzima alfa-amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 para clonación.....	41
4.2.1. Diseño y análisis de cebadores del gen <i>amyL</i> de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	41
4.2.2. Optimización de la PCR con <i>Taq</i> Polimerasa Recombinante para amplificar el gen <i>amyL</i> de la enzima alfa-amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	42
4.2.3. Generación de ADN de interés a ser insertado en el vector pET SUMO	42
4.3. Unión de ADN de interés al vector pET SUMO	42
4.4. Transformación en células de mantenimiento y selección de células transformadas <i>E.coli</i> Mach1T1 con el vector control pUC19 y el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	42
4.5. Análisis a nivel de ADN de las células transformadas <i>E.coli</i> Mach1T1 con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	44
4.5.1. PCR de colonia con cebadores internos de las células transformadas con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	44
4.5.2. Análisis de restricción <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> de colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	44

4.5.2.1. Extracción, visualización y cuantificación de ADN plasmídico de las colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	44
4.5.2.2. Análisis de restricción <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> de colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	46
4.6. Transformación en células de expresión y selección de células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT y el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	46
4.6.1. Transformación y selección de células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT	46
4.6.2. Transformación y selección de células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i>	47
4.7. Análisis cualitativo de la presencia de la enzima alfa-amilasa en células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i> , con el vector control pET SUMO/CAT sin inducir y de las células sin transformar <i>E.coli</i> BL21 (DE3).....	47
4.8. Curvas de crecimiento de las células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i> inducidas con el tratamiento 1 y 2, sin inducir y células <i>E.coli</i> BL21 (DE3) sin transformar	48
4.9. Análisis a nivel de proteínas de las células transformadas con el gen <i>amyL</i> sin inducir e inducidos	48
4.9.1. Visualización mediante SDS-PAGE de los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio de las células <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con vector control pET SUMO/CAT, vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i> y de las células sin transformar <i>E.coli</i> BL21 (DE3).....	48

4.9.2. Análisis cuantitativo de los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio de las células transformadas <i>E.coli</i> BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO- <i>amyL</i> inducidas y sin inducir y células sin transformar <i>E.coli</i> BL21 (DE3)	49
4.2.9.1. Determinación de concentración de proteínas totales	49
4.2.9.2. Determinación de actividad enzimática	49
4.2.9.3. Determinación de actividad específica	49
5. Conclusiones y Recomendaciones	51
5.1. Conclusiones	51
5.2. Recomendaciones	52
REFERENCIAS	54
ANEXOS	64

1. Capítulo I. Introducción

1.1. Antecedentes

Las enzimas, catalizadores naturales provenientes de organismos vivos, son componentes indispensables de las reacciones biológicas ya que tienen la función de incrementar la velocidad de las reacciones químicas y como resultado transforman diferentes moléculas en productos específicos (Castillo Rosales & Rodríguez, 2014; Sundarram, Pandurangappa, & Murthy, 2014). Están envueltas en procesos biológicos esenciales para la vida como la replicación del ADN, la síntesis de proteínas, el metabolismo, entre otros. Su función como catalizador, la especificidad de las transformaciones, el volumen reducido de desechos y las condiciones naturales y poco agresivas en las que trabajan, ha permitido el incremento de su uso en varios procesos industriales (Li, Yang, Yang, Zhu, & Wang, 2012).

La producción de enzimas para la industria tiene una variedad de aplicaciones, en el mercado mundial el 29% de enzimas producidas son destinadas a la industria alimenticia, el 15% son enzimas usadas como alimentos y el 56% son destinadas a otros usos industriales. Dentro de este contexto, las amilasas representan el 30% de la producción mundial de enzimas anualmente (Mobini-dehkordi & Javan, 2012).

La enzima alfa-amilasa es una de las más importantes endoamilasas industriales, siendo capaz de romper los enlaces glicosídicos (Zhang, Han, & Xiao, 2017), es ampliamente utilizada ya que cataliza la reacción de hidrólisis de las moléculas de almidón y las convierte en polímeros más pequeños compuestos de unidades de glucosa, maltosa y maltotriosa (Monteiro de Souza & Oliveira Magalhaes, 2010). La alfa-amilasa es producida por varias especies de animales, plantas y microorganismos, siendo estos últimos los más usados

para su producción debido a la facilidad en su manipulación y a su potencial económico en las industrias alimenticia, textil, de detergentes, producción de biocombustibles, de papel (Shahhoseini, Ziaee, & Ghaemi, 2003; Zhang et al., 2017); así como en la licuefacción de almidón, elaboración de cerveza, destilación, tratamientos para enfermedades digestivas, producción de tortas, jugos de frutas, jarabes de almidón (sucrosa, sacarosa) y productos farmacéuticos (Roy, Borah, Lata, & Mukherjee, 2013). Adicionalmente, se la puede emplear en la remoción de contaminantes del ambiente, o en la obtención de metabolitos de interés biotecnológico, a través del uso de microorganismos que aprovechan el almidón como su fuente de carbono gracias a esta enzima (Mobini-dehkordi & Javan, 2012).

El proceso de producción convencional de enzimas incluyendo a la alfa-amilasa ocurre por fermentación y depende de varios factores físico-químicos tales como el pH, temperatura, aireación, transferencia de oxígeno y humedad (Sundarram et al., 2014).

Aunque las amilasas provienen de diferentes fuentes como animales, plantas y microorganismos, son las amilasas provenientes de microorganismos las que son más demandadas en la industria debido a su corto periodo de crecimiento y productividad. La alfa-amilasa ocupa el primer lugar en términos de explotación comercial al ser una enzima producida extracelularmente, además de su especificidad de reacción y menor consumo de energía que los métodos químicos convencionales de producción (Divakaran, Chandran, & Pratap Chandran, 2011).

Uno de los mejores microorganismos productores de alfa-amilasa es *Bacillus subtilis*, se estima que esta especie es la productora del 50% de enzimas a nivel mundial (Mobini-dehkordi & Javan, 2012). La alfa-amilasa de *Bacillus*

subtilis ha sido parcialmente purificada y se han investigado los efectos de la temperatura, los iones metálicos y de agentes tensoactivos sobre la actividad de la misma, tal como se menciona en el estudio de Bano et al. (2011), en donde se demostró su termoestabilidad con diversos agentes tensoactivos y detergentes, lográndose mantener el 62% de su actividad a 70 °C y -18 °C.

Varios estudios ya han demostrado la producción de proteínas recombinantes, por ejemplo, en 1990 se reportó que la alfa-amilasa puede ser usada como un marcador para clonación genética, este sistema fue construido en un vector lanzadera entre *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* que contenía el gen de la alfa-amilasa, este gen fue insertado en un vector y se comprobó la actividad enzimática mediante ensayos de hidrólisis que resultaron en la producción de pequeños halos observados en un medio de cultivo con almidón, de esta manera se comprobó que la actividad enzimática se produce en gran cantidad (Zhang et al., 2017).

Así mismo, en los artículos de Shahhoseini et al., (2003) y de Zafar et al., (2015). el gen de alfa-amilasa fue clonado utilizando un vector pET a partir de *Bacillus licheniformis* y *Thermotoga petrophila* y expresado en *Escherichia coli*, se obtuvieron resultados en cuanto a la actividad enzimática optimizando parámetros como pH y temperatura, demostrando valores significativos y se comprobó cualitativamente mediante experimentos de hidrólisis de almidón y por SDS-PAGE la presencia de la enzima. De la misma forma, el estudio de Roy et al., (2013) purificó, caracterizó y demostró aplicaciones industriales de una alfa-amilasa producida a partir de *Bacillus subtilis* y expresada en *Escherichia coli*, demostrando valores de actividad enzimática óptima a pH 6 y 70 °C y aseverando que no necesita iones de Ca^{2+} para su actividad y termoestabilidad. En otros estudios, también se ha demostrado la producción de alfa-amilasa en distintas células de expresión, por ejemplo, en el trabajo de Celińska, Biała, Borkowska, & Grajek, (2015) se dio a conocer la importancia

de la enzima en aplicaciones industriales, se produjo a partir de *Sitophilus oryzae* y expresó en una cepa de *Yarrowia lipolytica*, la enzima fue secretada en el medio de cultivo y su actividad enzimática fue de 81 U/mL después de 29 horas de crecimiento en un reactor de 5 L a pH 5 y 40 °C comprobada luego de la precipitación con sulfato de amonio y adicionalmente se realizaron ensayos de digestión de almidón en cultivos de arroz. En el experimento de Sun et al., (2018) se demostró la eficiente producción de alfa-amilasa pancreática porcina cuando se expresó el gen codificante de la enzima funcional extracelular en *Pichia pastoris* y se caracterizó bioquímicamente a la enzima producida a pH 7,5 y 50 °C esto no solo indicó su potencial sino también la mejora necesaria para su aplicación en la alimentación animal.

1.2. Planteamiento del problema

Actualmente, el uso de enzimas a escala industrial ha aumentado notablemente y se considera que en los próximos años incrementará el número de procesos biocatalíticos en los que se encuentran envueltas (Castillo Rosales & Rodríguez, 2014). Para su producción a gran escala se utilizan procesos tradicionales que no son capaces de cubrir la alta demanda, esto se debe a que el tiempo de producción es bastante largo, los procesos necesitan optimización de parámetros físico-químicos y uso de grandes cantidades de materia prima, agua y energía con lo que se obtiene poca cantidad de la enzima y en una concentración baja, esto implica que los costos de estos procesos resulten ser muy elevados (Castillo Rosales & Rodríguez, 2014).

Considerando que aproximadamente el 90% de las enzimas importantes en la industria son producidas por organismos de forma recombinante, hay muy pocos análisis de producción de estas proteínas por microorganismos e

Ingeniería Genética especialmente haciendo énfasis en un amplio volumen de producción y a bajo costo (Ferreira, Azzoni, & Freitas, 2018).

Adicionalmente, en Ecuador no existe producción de enzimas mediante técnicas de Ingeniería Genética, ya que no se han reportado estudios de obtención de alfa-amilasa recombinante para usos industriales, además que la investigación y el desarrollo científico han aumentado en los últimos años en cuanto a estructura, talento humano, leyes y políticas educativas, pese a esto, el país sigue en el tercer mundo científico. Otra gran dificultad es la adquisición de insumos y materiales de laboratorio, ya que no existe en Ecuador una empresa de biotecnología nacional que genere estos materiales y las grandes empresas biotecnológicas del mundo no tiene una sede en el país, por lo que el precio al importar sube al doble comparado con EEUU y Europa, y el tiempo es la dificultad más grande ya que un reactivo se puede demorar hasta tres meses en llegar (Guerrero, 2018).

1.3. Justificación

Pese a que la producción convencional de enzimas por fermentación tiene potencial natural y ofrece algunas ventajas, el problema radica en el tiempo, ya que se deben optimizar las condiciones de fermentación, composición del medio de cultivo, parámetros físicos y químicos como pH, temperatura, fuente de carbono y nitrógeno, aireación, cantidad de inóculo, tiempo de crecimiento, etc., lo que además genera gastos económicos (Sundarram et al., 2014).

Es necesaria la implementación de un protocolo para la producción biotecnológica de alfa-amilasa recombinante en *E.coli* a partir de *Bacillus licheniformis* en Ecuador, ya que es de gran importancia a nivel industrial al

contribuir con la investigación y desarrollo de la Biotecnología en el país. Esta enzima es una de las más utilizadas, con aproximadamente 30% del mercado mundial anualmente (Monteiro de Souza & Oliveira Magalhaes, 2010). La amilasa tiene la capacidad de degradar almidón, por lo que ha recibido mucha atención debido a sus beneficios económicos y significación tecnológica. En las últimas décadas, debido a su gran demanda y uso generalizado en la industria, la producción de la misma, está aumentando en muchos países del mundo (Gandhi et al., 2015).

El uso de microorganismos para la producción de alfa-amilasa ha reemplazado por completo la hidrólisis química del almidón, su importancia y utilidad radican en que es más estable que cuando se obtiene a partir de plantas y animales (Monteiro de Souza & Oliveira Magalhaes, 2010). Como ya se mencionó, la principal ventaja de utilizar microorganismos es la producción masiva de la enzima al obtener grandes cantidades de la misma debido a los vectores de expresión existentes, lo que es rentable económicamente, además los mismos son fáciles de manipular, siendo las bacterias las más utilizadas (Monteiro de Souza & Oliveira Magalhaes, 2010). Este proceso novedoso de producción enzimática, le otorga al producto de interés, un valor agregado, reduciendo tiempo y costos al omitir los pasos de optimización de parámetros físico-químicos y la proteína recombinante se puede obtener totalmente pura beneficiando a la industria, debido a la reducción de operaciones en el proceso.

Por lo tanto, cualquier mejora en el rendimiento de la producción de enzimas, la termoestabilidad o la actividad tendrá un impacto directo en la economía y viabilidad del proceso (Rivera, Lopez-Munguia, Soberon, & Saab-Rincon, 2003). Es por estas razones que el presente trabajo busca contribuir con el desarrollo de un protocolo que garantice el aumento en la producción de esta enzima mediante técnicas de Ingeniería Genética al conocer las limitaciones del proceso convencional, con este trabajo experimental se contribuirá a

solucionar el problema de importación de enzimas para usos industriales en el país, produciendo la proteína recombinante alfa-amilasa a partir de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 y expresándola en grandes cantidades en *E.coli* en menos tiempo y con un porcentaje de pureza elevado.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Producir alfa-amilasa recombinante de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 en *Escherichia coli* BL21 (DE3).

1.4.2. Objetivos específicos

- Obtener un clon de *Escherichia coli* BL21 (DE3) productor de la enzima recombinante alfa-amilasa *amyL* mediante técnicas de Ingeniería Genética.
- Verificar la producción y analizar la actividad enzimática de la enzima recombinante alfa-amilasa *amyL* producida a través de técnicas cualitativas y cuantitativas.

2. Capítulo II. Marco teórico

2.1. *Bacillus licheniformis* y sus potenciales usos en biotecnología

2.1.1. Descripción taxonómica, morfológica y fisiológica

Bacillus licheniformis es una bacteria gram-positiva formadora de esporas ampliamente distribuida como un organismo saprófito en el ambiente. Ha sido aislada del suelo y de plantas y no se ha reportado su patogenicidad frente a humanos y animales (Saima Aftab, 2012). Pertenece al dominio bacteria, filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Bacillaceae y del género *Bacillus* (UniProt, 2019). Se ha demostrado que este organismo se encuentra estrechamente relacionado con *Bacillus subtilis* y también con *Bacillus amyloliquefaciens* como se muestra en la Figura 1, con base a estudios comparativos y de filogenia entre las secuencias de nucleótidos de 16S rDNA y 16S-23S ITS de las especies conocidas, además se ha demostrado similitud entre características bioquímicas y fenotípicas (Paul, Lall, Jadhav, & Tiwari, 2017).

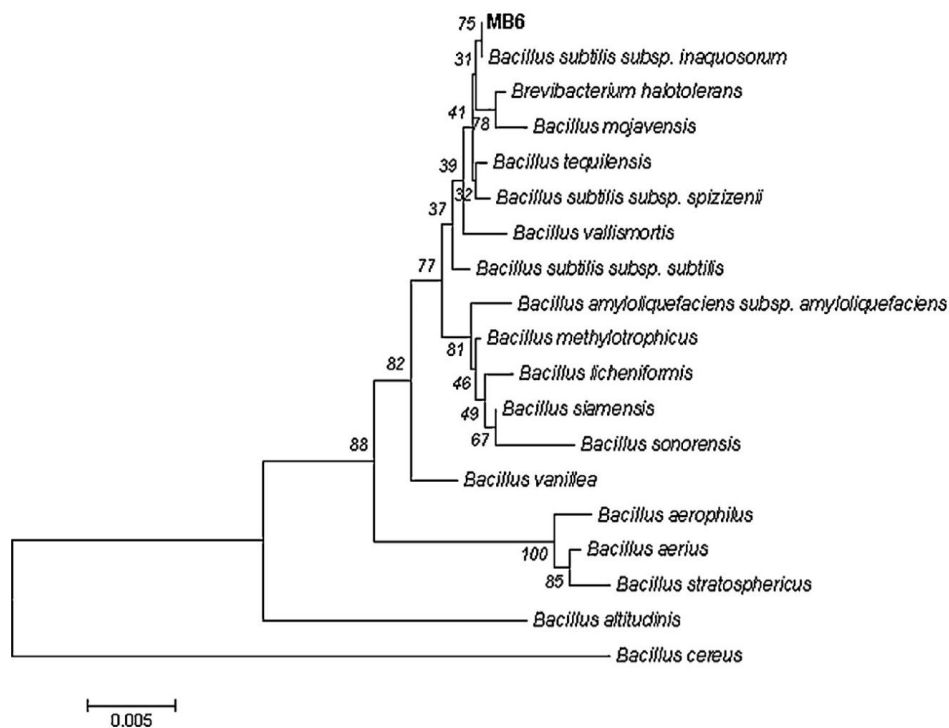


Figura 1. Árbol filogenético de especies de *Bacillus* en donde se observa *Bacillus licheniformis*. Tomado de (Paul et al., 2017).

Su tamaño es de 1,5-3 por 0,6-0,8 μm de diámetro y tiene una forma de bastón irregular y ligeramente curva, su desplazamiento es mótil por flagelo. Las

colonias son redondas e irregulares. Fisiológicamente, es una bacteria facultativa anaerobia comparada con otros bacilos en nichos ecológicos. Crece en medios de cultivo a pH 5.7-6.8 y con 2-7% de NaCl, pudiendo ser cultivado en medio basal como en agar nutriente o caldo nutriente (ATCC, 2016). En las pruebas bioquímicas, presenta resultados positivos para arginina hidrolasa, hidrólisis de esculina, β -galactosidasa, fenilalanina desaminada, arbutina, sacarosa, D-celobiosa, D-fructosa, reducción de nitrato, galactosa, sorbitol, β -gentibiosa, glicerina, trehalosa, glicina, glucógeno, lactosa, D-manosa, maltosa y ribosa; y negativos para lisina descarboxilasa, triptófano, L-arabitol, adonitol, L-fucosa y sorbosa (Wyrick & Rogers, 1973; Oyuntogtokh & Byambasuren, 2017; Choi et al., 2017).

2.1.2. Estructura génica

Bacillus licheniformis ATCC 14580, la cepa con la que se trabaja en este estudio, posee un genoma que comprende un cromosoma circular de 4,222,336 pares de bases con un contenido de GC de 46,2%. Contiene 4,208 genes codificantes (CDSs) con un tamaño promedio de 873 pb para proteínas codificantes, 7 operones de rRNA y 72 genes tRNA; además el cromosoma contiene regiones largas similares al genoma de *B.subtilis* y *B. halodurans* con un 80% de secuencias codificantes ortólogas con *B.subtilis* y *B.licheniformis* (Rey et al., 2004).

2.1.3. Usos potenciales en biotecnología

Bacillus licheniformis es considerada la mejor especie productora de compuestos de interés biotecnológico extracelulares (Rey et al., 2004) y ha sido ampliamente usada en la industria debido a este potencial. *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 posee numerosos usos industriales, siendo muy

relevantes dentro de estos, aplicaciones como la producción y purificación de sus enzimas extracelulares entre las que se incluyen mayormente proteasas y alfa-amilasas. En este contexto, las proteasas han sido utilizadas en la industria de los detergentes, así como para depilar y proteger el cuero en la industria textil; y las alfa-amilasas han sido utilizadas en la hidrólisis del almidón, en la producción de textiles y papel. Algunas cepas de esta bacteria han sido utilizadas adicionalmente para producir antibióticos como bacitracina y proticina y químicos como ácido cítrico, inosina, ácido inosínico y ácido poliglutámico (Shih, Van, & Chang, 2002; Choi et al., 2017).

Se ha observado que *B.licheniformis* puede reducir el efecto de los patógenos fúngicos en cultivos de maíz y otros vegetales; además, como bacteria formadora de esporas, este organismo tiene la habilidad de sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables lo que le otorga la capacidad de ser un potente agente de biocontrol natural (Rey et al., 2004; Pérez-García, Romero, & de Vicente, 2011).

Adicionalmente, el cromosoma de *B. licheniformis* ATCC 14580 codifica para un gran número de actividades carbohidrasas lo que permite que el organismo crezca frente a un rango de polisacáridos, xilanasas, endo-arabinosas y liasas, los mismos que están envueltos en la degradación de hemicelulosa, además alfa-amilasas y alfa-glucosidasas para la hidrólisis de almidón y quitinasas para la ruptura de oligosacáridos de hongos e insectos (Kirk, Borchert, & Fuglsang, 2002; Rey et al., 2004).

2.2. Enzima alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

2.2.1. Definición y reacción enzimática

La alfa-amilasa (endo-1,4- α -D-glucan-glucanohydrolase) EC 3.2.1.1 o también llamada glicogenasa (ExpASY Bioinformatics Resource Portal, n.d.) codificada por el gen *amyL* de 1539 pb, es una endo-enzima extracelular que hidroliza los enlaces glucosídicos α 1-4 en el almidón.

La alfa-amilasa es la enzima que descompone el almidón en azúcares más simples por medio de la reacción de hidrólisis de los enlaces glucosídicos α 1-4 presentes en los polisacáridos y algunos oligosacáridos de gran tamaño como son el almidón y el glucógeno, como se muestra en la Figura 2, como resultado se obtienen pequeños polímeros de azúcares como la glucosa y la maltosa (Divakaran et al., 2011). El almidón es un polisacárido compuesto de subunidades de glucosa que están unidas entre ellas a través de enlaces glucosídicos, en su mayoría las subunidades son la amilosa y la amilopectina; la amilosa es el compuesto lineal que forma enlaces glucosídicos α 1-4, mientras que la amilopectina es el polímero ramificado formado por enlaces glucosídicos α 1-6, estos enlaces son hidrolizados por la enzima amilasa (Olempska-Beer, 2004; Pervaiz, Malik, & Rashid, 2017). El almidón está compuesto usualmente de 20-25% de amilosa y de 75-80% de amilopectina (Held, 2013).

La alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (BLA) es una enzima usada en la tecnología del almidón, aunque es producida en bacterias no termófilas, se mantiene activa por varias horas a temperaturas sobre los 90 °C siendo naturalmente termoestable (“Enzymes for Research, Diagnostic and Industrial Use,” n.d.; Shahhoseini et al., 2003).

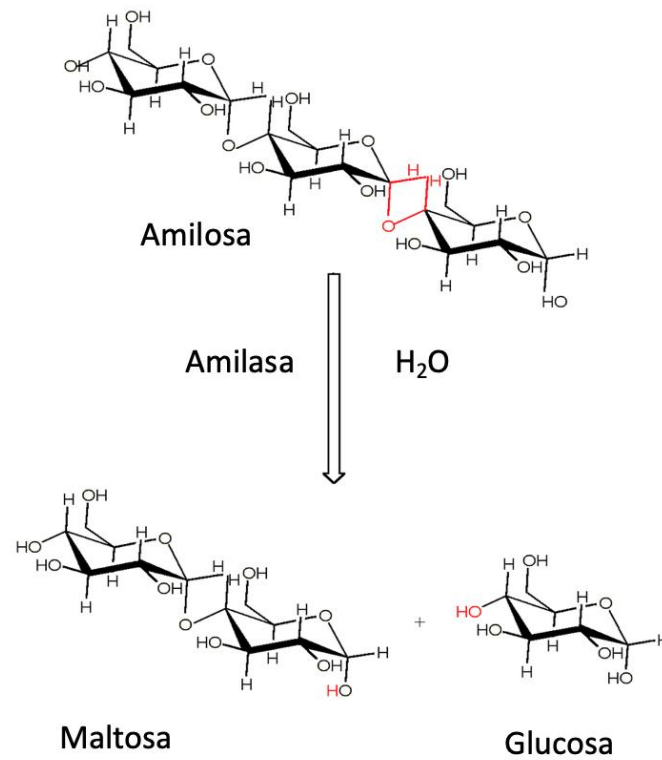


Figura 2. Reacción de hidrólisis de amilosa por la enzima alfa-amilasa. Adaptado de (Lehmann, 2001).

2.2.2. Organización estructural de la enzima alfa-amilasa

2.2.2.1. Estructura primaria

La enzima alfa-amilasa posee 512 aminoácidos y un peso molecular de 58,592 kDa e incluye el péptido señal en la posición 1 al 29 en número de aminoácidos. (UniProt, 2019). En la Figura 3 se muestran los porcentajes de aminoácidos de la enzima.

Amino acid composition:		
Ala (A)	41	8.0%
Arg (R)	24	4.7%
Asn (N)	24	4.7%
Asp (D)	37	7.2%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	22	4.3%
Glu (E)	25	4.9%
Gly (G)	46	9.0%
His (H)	25	4.9%
Ile (I)	21	4.1%
Leu (L)	36	7.0%
Lys (K)	31	6.1%
Met (M)	8	1.6%
Phe (F)	22	4.3%
Pro (P)	17	3.3%
Ser (S)	26	5.1%
Thr (T)	27	5.3%
Trp (W)	17	3.3%
Tyr (Y)	31	6.1%
Val (V)	32	6.2%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Figura 3. Porcentaje de aminoácidos importantes de la enzima alfa-amilasa amyL.

Tomado de (ExpASy Bioinformatics Resource Portal, 2019).

2.2.2.2. Estructura secundaria

La enzima posee 17 hélices alfa correspondientes al 32,69%, 28 láminas beta siendo el 53,84% y 7 giros con un 13,46%, lo cuales se encuentran formando la estructura secundaria de la proteína (UniProt, 2019).

2.2.2.3. Estructura terciaria

Esta enzima posee un dominio en la posición 34 hasta las 420 con una longitud de 387 aminoácidos lo que se define como una combinación de estructuras secundarias que se organizan para formar las estructura terciaria tal como se observa en la Figura 4 (UniProt, 2019). La alfa-amilasa generalmente se compone de tres dominios: un barril denominado TIM que posee los residuos del sitio activo de la enzima y el sitio de unión a iones (DOMINIO A), una región de bucle largo insertada en la tercera hebra beta β_{A3} y la hélice alfa α_{A3} del

dominio (DOMINIO B), que contiene el sitio de unión al calcio y un dominio de hoja beta en el extremo C-terminal al final de la secuencia (DOMINIO C) (Pujadas & Palau, 1999; InterPro, 2019).

Los residuos importantes del sitio activo son 3, identificados como Asp231, Glu261 y Asp328, se encuentran ubicados en el extremo C-terminal del centro catalítico rodeado de 8 barriles (Hwang et al., 1997).

Esta enzima posee sitios de unión importantes interactuando selectivamente y no covalentemente a iones metálicos como el calcio (Ca_{2+}), por ejemplo, unión de calcio 3 en los residuos correspondientes a las posiciones 329, 436, 459, calcio 2 en los residuos correspondientes a las posiciones 190, 210, 212, 231 y calcio 1 en los residuos correspondientes a las posiciones 133, 223, 229, 264. Además posee dos sitios activos, el primero de nucleófilo en el residuo correspondiente a la posición 260 y otro de donante de protones en el residuo correspondiente a la posición 290 (UniProt, 2019).

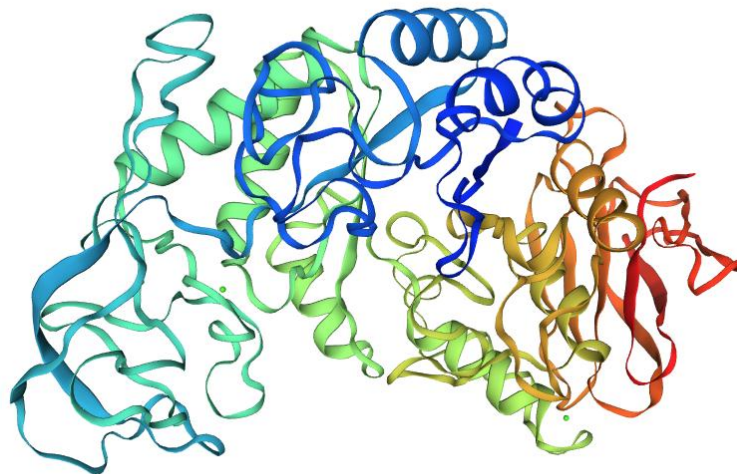


Figura 4. Estructura 3D de la enzima alfa-amilasa (A0A0S1M121). Tomado de (SWISS-MODEL, 2016).

2.2.4. Procesamiento y maduración de la enzima alfa-amilasa

El procesamiento de la enzima alfa-amilasa empieza en la posición 30 hasta la 512 con una amplitud de 483 aminoácidos (UniProt, 2019) correspondientes a la proteína madura. Esta enzima ha sido expresada en *E.coli* y se ha comprobado el reconocimiento del péptido señal por el sistema secretor de *E.coli* y su producción extracelular ha sido ampliamente estudiada (Shahhoseini et al., 2003).

2.2.5. Parámetros cinéticos

Se ha reportado que la velocidad de conversión de almidón en maltosa producida por la enzima alfa-amilasa incrementa cuando la temperatura es 55 °C, pH 5.6, Km de 9.6 μM y en enzimas inmovilizadas es 75 °C y pH 8, Km de 5 μM (Rasiah & Rehm, 2009). Mientras que en el estudio Pervaiz, Malik, & Rashid, (2017) la enzima alfa-amilasa demostró una actividad óptima entre 40 y 100 °C en un pH de 6.5. En el estudio de Al-Asady en el (2016) se reportaron valores constantes de la cinética de la alfa amilasa con un Km y Vmax de 1,12 mg/mL y 106 U/mL respectivamente.

A pesar de que el pH del almidón nativo es de 3.2-4.5, los procesos en los que se utiliza el almidón se trabajan a un pH alrededor de 6.5 con amilasas que dependen funcional y estructuralmente de iones de calcio y de sodio en algunas mutaciones en la estructura (Machius, Declerck, Huber, & Wiegand, 2003) que a pH bajos presentan inestabilidad. Por el contrario, las enzimas alfa-amilasas termoestables son activas a pH bajos (Asoodeh, Emtenani, Emtenani, & Jalal, 2014).

2.2.6. Usos de la enzima alfa-amilasa en biotecnología

La enzima alfa-amilasa ha recibido mucha atención debido a sus beneficios económicos y tecnológicos dentro de la industria biotecnológica (Tiwari, Shukla, Mishra, & Gaur, 2014; Gandhi et al., 2015). Como ya se mencionó anteriormente, esta enzima extracelular posee diversas aplicaciones en la industria. En la industria de los alimentos interviene en la elaboración de quesos, procesamiento de jugos de frutas y jarabe de maíz, fermentación para fabricación de cerveza y para hornear al reducir la viscosidad de la masa utilizada en la elaboración de pan. En la industria de los detergentes es aplicada como aditivo para mejorar el rendimiento de lavado al eliminar las manchas causadas por alimentos ricos en almidón. En la industria textil para decoloración de telas y para eliminar el almidón presente en la cubierta de las telas, lo que se conoce como desencolado. Además de intervenir en la industria del papel, farmacéutica, química, analítica y médica. (Ashabil, Burhan, Hatice, Sadik, & Ömer, 2008; Abdel-Fattah, Soliman, El-Toukhy, El-Gendi, & Ahmed, 2013; Tiwari et al., 2014; Deljou & Arezi, 2016; Paul et al., 2017; Han et al., 2018).

2.3. Producción de proteínas recombinantes por Ingeniería Genética

Gracias al descubrimiento de la tecnología del ADN recombinante en los años 70, en la actualidad es posible aislar y modificar genes, los mismos que pueden ser insertados en diferentes sistemas de expresión para fines de producción a escala industrial de proteínas de interés biotecnológico. Algunas de las biofactorías más ampliamente utilizadas incluyen bacterias, levaduras, hongos, algas, células de insectos y células de mamíferos, siendo *Escherichia coli* uno de los sistemas de expresión procariótico más ampliamente utilizado en la producción de proteínas recombinantes (Ferreira et al., 2018).

La predilección por el uso de *E. coli* en Ingeniería Genética tiene que ver con algunas ventajas que presenta tales como el rápido crecimiento que posee en medios de cultivo simples y baratos, bajos costos de producción, variedad de herramientas disponibles para implementar este proceso, el crecimiento en gran densidad celular y a que permite de forma general obtener altos títulos en la producción de proteínas heterólogas (Gifre, Arís, Bach, & Garcia-Fruitós, 2017).

2.3.1. Definición

La Ingeniería Genética se define como un conjunto de metodologías que permiten transferir material genético (ADN) heredable entre especies, de manera que se pueda obtener productos de interés biotecnológico e industrial de forma eficiente en organismos que no los producían de manera natural. Además, permite la modificación de características genéticas, lo que permite mejorar cualidades de un organismo (animal, vegetal o microorganismo) o corregir defectos genéticos (Zhang et al., 2017). Un protocolo de Ingeniería Genética, enfocado en la producción de proteínas de interés, consiste en siete pasos fundamentales: 1) selección de las células hospederas de mantenimiento y expresión, 2) selección del vector de transferencia, 3) incorporación del fragmento que contiene el gen de interés al vector, 4) transformación, selección y análisis de células de mantenimiento transformadas, 5) transformación, selección y análisis de células de expresión transformadas, 6) inducción de la expresión y análisis de la proteína recombinante, y 7) purificación de la proteína recombinante de interés (Brown, 2010; Granja, 2016; Zhang et al., 2017).

2.3.2. Pasos de Ingeniería Genética para la producción de alfa-amilasa recombinante

2.3.2.1. Selección de las células hospederas de mantenimiento y de expresión

La selección de la célula hospedera es un paso de gran importancia, como ya se mencionó anteriormente *Escherichia coli* es el organismo más utilizado en la tecnología del ADN recombinante por su gran facilidad de manipulación, por lo que se ha convertido en el principal hospedero para clonación (Primrose, Twyman, & Old, 2001). Para la producción recombinante de enzima se requiere poseer dos tipos de hospederos de *E. coli*, una cepa que será destinada solamente a la propagación del vector recombinante, es decir del vector que posee insertado el ADN de interés, y una cepa en la cual expresaremos la proteína de interés en grandes cantidades. Es reconocido como un potencial sistema de expresión debido a sus altos niveles de expresión de proteínas, bajo costo, condiciones de cultivo simple, facilidad de escalamiento y protocolos de transformación simple (Labome, 2012; S. Meyer et al., 2013).

Las células competentes *E.coli* Mach1-T1, usadas habitualmente para la transformación, mantenimiento y propagación del plásmido recombinante, poseen un tiempo de duplicación de 50 minutos más rápido en comparación con otras cepas de clonación, de forma que se pueden visualizar colonias 8 horas después de su cultivo en medio con el antibiótico que permite la selección. Esta cepa, modificada genéticamente posee el genotipo: F- ϕ 80 (*lacZ*) Δ M15 Δ *lacX74* *hsdR*(rK-mK+) Δ *recA1398* *endA1* *tonA*. La mutación (*lacZ*) Δ M15 se usa para la selección visual de los clones recombinantes con la coloración blanca/azul, *hsdR* comprende una mutación para una transformación eficiente de ADN no metilado proveniente de reacciones de PCR, Δ *recA1398* reduce la recombinación homóloga en el ADN clonado, *endA1* es una mutación que permite aumentar el rendimiento y la calidad del plásmido debido a la eliminación de la digestión no específica por la endonucleasa I y la mutación *tonA* que confiere resistencia a los fagos T1 y T5. Es importante recalcar que estas células no necesitan IPTG para inducir la expresión del promotor *lac*, y que la selección de las colonias transformadas se puede hacer mediante la coloración blanca/azul con X-Gal en formamida en la

superficie del medio de cultivo sólido con antibiótico, si el vector empleado permite la alfa complementación. Adicionalmente, la eficiencia de transformación de estas células es 1×10^9 cfu/ug ADN (Invitrogen, 2006).

Por otro lado, ya para la etapa de expresión se deben emplear cepas de *E. coli* que sean capaces de producir grandes cantidades de la proteína de interés debido a las modificaciones genéticas que poseen enfocadas a darles esta capacidad. Para este fin se utilizan habitualmente células competentes de *E. coli* cepa BL21 (DE3) las cuales poseen un genotipo: F- *ompT hsdSB* (rBmB-) *gal dcm* (DE3). DE3 indica que la cepa contiene el lisógeno DE3, el mismo que, insertado en el cromosoma de la bacteria se encarga de transportar el gen para la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor denominado *lacUV5*, el cual requiere de un compuesto llamado IPTG el mismo que induce la expresión de la ARN polimerasa T7, todos estos componentes permiten una mejor regulación en la expresión génica (Ravishankar et al., 2015). Por otro lado, esta cepa no contiene la proteasa Lon y la proteasa de la membrana externa llamada OmpT, esta deficiencia de proteasas es la clave que le permite reducir la degradación de las proteínas heterólogas expresadas en las cepas. Estudios han demostrado que hay una expresión basal de la ARN polimerasa a partir del promotor *lacUV5* aun en ausencia de un inductor. La eficiencia de transformación de estas células es mayor que 1×10^8 ufc/ug (Invitrogen, 2010).

2.3.2.2 Selección del vector de transferencia

Un vector muy utilizado en la producción de proteínas recombinantes es el Champion pET SUMO, el mismo que permite clonar y expresar en grandes cantidades genes de interés. Entre sus características más importantes como se muestra en la Figura 5 se encuentra el gen de resistencia a Kanamicina como marcador de selección, el bacteriógafo T7 para controlar la expresión de

genes heterólogos en *E.coli* y el origen pBR322 para la replicación de baja copia y mantenimiento (Labome, 2012).

Este vector incluye una proteína llamada SUMO la misma que permite la expresión, purificación y generación de proteínas nativas en *E. coli*, pertenece a la familia de proteínas de Smt3 de *Saccharomyces cerevisiae* con un tamaño de 11 kDa. Es una ubiquitina que regula algunos procesos celulares como la apoptosis, transporte en el núcleo y la progresión del ciclo celular, SUMO se une covalentemente a las cadenas laterales de lisina en las proteínas celulares diana y esta modificación conduce a cambios en la función y en la actividad de la proteína en lugar de su degradación, su función es la de incrementar la expresión de proteínas recombinantes y mejora la solubilidad de proteínas insolubles.

Por otro lado, este vector dispone en su casete de expresión del promotor T7 inducible por IPTG, el mismo que es reconocido con alta actividad y especificidad por la ARN polimerasa T7 y permite altos niveles de expresión del gen de interés, por lo que la proteína, será codificada por el lisógeno de una cepa de expresión BL21. Adicionalmente, posee una etiqueta de histidina N-terminal (6xHis) para la detección de la proteína recombinante, la cual consiste en residuos de histidina y permite utilizar un método de purificación de la proteína que implica el uso de estas etiquetas utilizando cromatografía de afinidad con una resina de níquel. También posee un estrategia de clonación de un paso para la inserción directa de los productos de PCR en el vector, la *Taq* polimerasa añade desoxiadenosinas (A) al extremo terminal 3' del producto de PCR y el vector lineal tiene una desotimidina (T) en el extremo 3' lo que permite la inserción y ligazón eficiente del producto de PCR en el vector (Bornhorst J.A. & J.J., 2000; Invitrogen, 2010; A Geno technology, 2015).

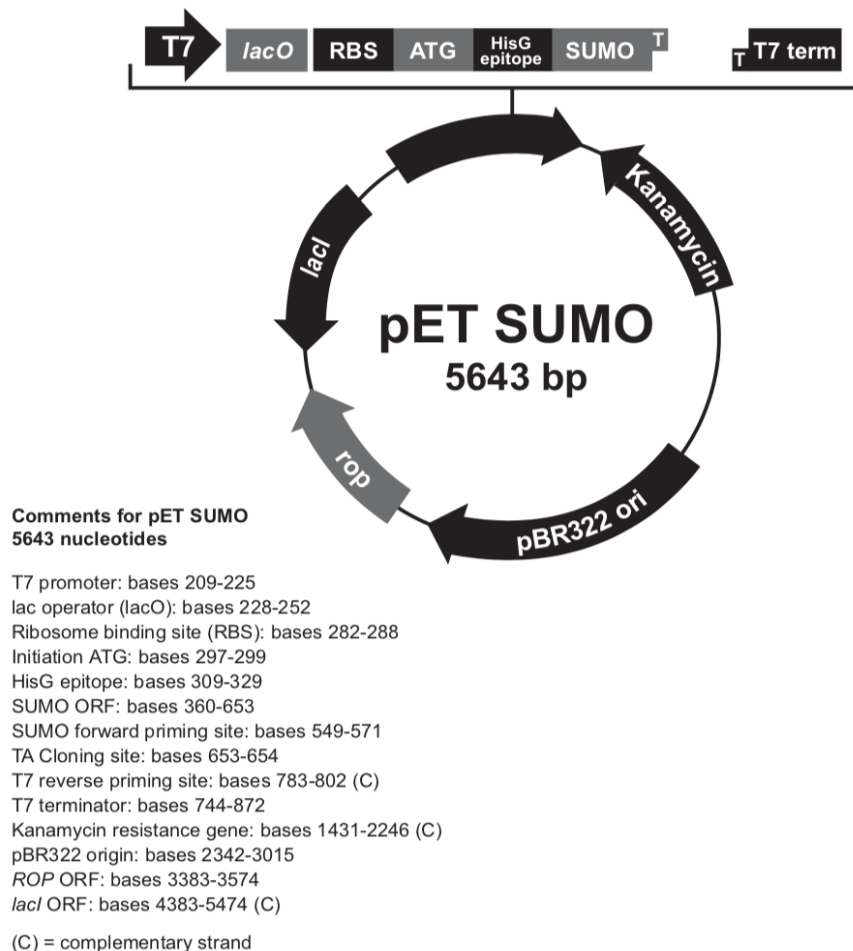


Figura 5. Vector de expresión pET SUMO.
Tomado de (Invitrogen, 2010).

2.3.2.3 Incorporación del fragmento que contiene el gen de interés al vector

Para la obtención del ADN exógeno de interés a ser insertado en el vector, se debe conocer en primer lugar el método de clonación que utiliza el vector para llevar el fragmento a ser compatible con el sitio de clonación del mismo, en el caso del vector pET SUMO este sitio es de tipo TA e inducible, por lo que requiere que el gen a ser insertado posea un residuo de Adenina en cada hidroxilo de los extremos 3'. Para esto, y una vez diseñados los cebadores adecuados que permitan amplificar el gen de interés por medio de PCR, se utilizará una polimerasa termoestable con actividad exonucleasa 3'-5', para que

esta adición sea ejecutada, lo que permitirá la adecuada inserción en el vector (Zhou, Gomez-Sanchez, & Montgomery, 2000; Invitrogen, 2010; Carson, Miller, & Witherow, 2012).

Una vez obtenido el amplicón con los extremos de adenina en 3', el mismo debe ser insertado en el vector, para esto, se realiza una reacción de ligazón con el uso de la ADN ligasa T4, tras lo cual se obtiene el llamado vector recombinante (Invitrogen, 2010a).

2.3.2.4 Transformación, selección y análisis de células de mantenimiento transformadas

Una vez obtenido el vector recombinante, el siguiente paso es la transformación celular. El proceso de transformación de *E.coli* fue descubierto por Mandel y Higa en 1970, cuando encontraron que el tratamiento con CaCl_2 permitió que las células captaran ADN del bacteriófago lambda, lo que les concede, a cualquier cepa, ser receptores efectivos de ADN plasmídico. Este paso es esencial en experimentos de clonación, ya que permite que un ADN ajeno se introduzca en una célula generalmente bacteriana, por lo que se ha descubierto que las células y el ADN plasmídico interactúan en ambientes con iones de calcio y bajas temperaturas (0-5 °C), seguido de un choque térmico (37-45 °C) (Primrose et al., 2001; Checa Rojas, 2018).

Después de la transformación, se procede a la selección de las células transformadas en medio con el antibiótico que corresponda al marcador de selección de resistencia del vector, en el caso de pET SUMO se utiliza kanamicina. De las células transformadas se deben escoger algunas para realizar el análisis de la inserción adecuada del material genético de interés en

el vector, para lo cual se pueden utilizar algunas técnicas tales como: la PCR de colonia y/o una secuenciación completa con cebadores con sitios de reconocimiento externos al gen de interés clonado (Alton et al., 2015).

La PCR de colonia es un método que permite determinar la presencia o ausencia de ADN foráneo insertado en plásmidos, y a la vez es una herramienta para la rápida y fácil detección de un gran número de colonias, permite distinguir entre colonias positivas y falsos positivos, pero no indica si el gen insertado tiene alguna mutación. Cada colonia puede ser sometida a lisis en agua con calentamiento o también se puede agregar directo a la reacción de PCR y el paso inicial con calor va a lisar las células, este paso permite la liberación del ADN plasmídico, lo que permite tener una plantilla o secuencia que será utilizada en la amplificación. Para esto, se usan los cebadores diseñados para amplificar la secuencia de forma que se determina si la colonias contiene el fragmento de interés o a su vez cebadores que flanqueen al inserto y se encuentren dentro del vector pueden ser usados para determinar si el inserto es o no del tamaño correcto, la presencia o ausencia de un amplicón y el tamaño del mismo de pueden determinar mediante electroforesis en gel de agarosa (Bergkessel & Guthrie, 2013; New England Biolabs, 2019).

A su vez, se debe realizar un análisis de restricción usando endonucleasas, enzimas producidas por las bacterias como un mecanismo de defensa contra los fagos, estas actúan como tijeras cortando ADN, no realizan cortes al azar sino cortan en secuencias específicas de ADN, cualquier molécula de ADN contiene sitios en donde las enzimas de restricción se unen produciendo fragmentos de tamaño definido adecuados para clonación (Freeman, 2000).

2.3.2.5 Transformación, selección y análisis de células de expresión transformadas

Para realizar la transformación en la célula hospedera de expresión, habitualmente se ejecuta el mismo procedimiento antes descrito en la sección 2.3.2.4 pero en medio líquido, partiendo de un ADN plasmídico recombinante de alta pureza proveniente de la célula de mantenimiento seleccionada en el paso anterior, tras lo cual se sigue el protocolo de expresión del gen de interés en el que el vial de células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) es directamente sembrado en medio líquido con el antibiótico que otorga la selección de las colonias transformadas y a partir de ese cultivo se realiza los pasos posteriores que son mencionados a continuación (Invitrogen, 2012).

2.3.2.6 Inducción de la expresión y análisis de la proteína recombinante

Para la inducción de la expresión de la proteína recombinante, como ya se mencionó anteriormente, se empleará el inductor IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopiranosido). El sistema de expresión está basado en la ARN polimerasa del bacteriófago T7 que tiene un alto rendimiento, el IPTG actúa como el inductor del operador *O_{lac}* presente en el vector pET SUMO (Ravishankar et al., 2015). La ARN polimerasa es expresada de tal forma que permite la transcripción del gen clonado aguas abajo del promotor T7 dentro del vector, por lo tanto la maquinaria celular puede traducir este ARNm resultando en la producción de grandes cantidades de la proteína recombinante (Invitrogen, 2010a). Para aumentar y maximizar la producción de la proteína recombinante se necesita optimizar este proceso ya que depende del tiempo de crecimiento de las células, la absorbancia, la temperatura de crecimiento y de la concentración de IPTG (Bruna, 2013).

Para realizar el análisis de la producción de la proteína recombinante, se utilizan métodos cualitativos y cuantitativos, generales y específicos de la proteína de interés, que serán explicados a continuación:

Dentro de los métodos cualitativos generales, encontramos en primer lugar a la visualización y verificación del tamaño de la proteína recombinante en gel de poliacrilamida SDS-PAGE. La electroforesis de proteínas se basa en su movimiento en un campo eléctrico (Bio-Rad, 2017). Cuando las proteínas son separadas en presencia de SDS y agentes denaturantes, son disociadas por este, el cual se une por un enlace no covalente a las proteínas otorgándoles carga negativa y deshace su conformación terciaria, lo que resulta en que las mismas migren en el gel hacia el polo positivo dependiendo únicamente de su tamaño y a su vez permite la estimación de su peso molecular (Oswald, 2016).

Esta técnica se realiza en una cámara de electroforesis vertical con un ánodo y un cátodo que contiene los electrodos. Para la visualización de las proteínas en el gel se debe elegir un tipo de gel que otorgue alta resolución, un standard de proteínas que provea la máxima resolución de un rango de tamaños. La poliacrilamida es estable, inerte químicamente y neutral eléctricamente, estas características hacen que la poliacrilamida sea ideal para separar proteínas ya que la matriz no interactúa con los solutos, el gel es preparado con la polimerización libre de radicales de la acrilamida y el entre cruzamiento de la bisacrilamida, se da cuando se añade persulfato de amonio (APS) con el tetrametiletilenediamina (TEMED) también depende de la temperatura y de la pureza de los reactivos (BIORAD, n.d.).

El gel discontinuo es en donde dos iones que se diferencian en la movilidad electroforética forman un límite cuando se aplica un voltaje, de manera que las proteínas tienen una movilidad intermedia lo que las hace colocarse o concentrarse en una misma zona del gel al comienzo de la electroforesis, seguido del movimiento a través del gel que hace que las proteínas de diferentes pesos moleculares se muevan a diferentes velocidades, esto ocurre ya que el voltaje se mantiene constante a lo largo de la separación y la corriente y el calor disminuyen a medida que aumenta la resistencia, esto

permite que las proteínas tengan más tiempo de difundirse, este voltaje constante es independiente del número de geles que se ejecuten (BIORAD, n.d.).

El último paso es el protocolo de tinción que consiste en tres pasos: el primero es la fijación de proteínas que usualmente se realiza en metanol o etanol, seguido de la exposición a una solución colorante y por último el lavado para remover el exceso de colorante lo que se conoce como destinción, la tinción se realiza con colorante aniónico de proteínas llamado azul brillante de Coomassie, para documentar las proteínas teñidas o bandas visibles se utiliza el fotodocumentador y un software para su análisis (Oswald, 2016; Bio-Rad, 2017).

Por otra parte, un segundo método cualitativo que permite de forma específica detectar la presencia de amilasas es el ensayo microbiológico de hidrólisis de almidón. El principio de esta prueba se basa en que el almidón es un polisacárido formado de subunidades de α -D-glucosa, amilosa y amilopectina, estas dos subunidades se encuentran unidas por enlaces 1,4- α -glicosídicos. Los organismos que producen y secretan la enzima extracelular alfa-amilasa son capaces de hidrolizar el almidón cuando rompen los enlaces glicosídicos entre las subunidades de azúcar, por lo que, cuando crecen en este medio de cultivo, hidrolizan el almidón presente y las subunidades del azúcar del almidón se solubilizan en el medio. El agar almidón está compuesto por extracto de carne o levadura, almidón soluble y agar y el yodo reactivo se usa para detectar la presencia o ausencia de almidón cerca del crecimiento de las bacterias, el yodo reacciona con el almidón y produce un color azul o marrón oscuro, de esta manera, la hidrólisis de almidón por parte de los microorganismos se observará como una zona clara rodeando el cultivo (MacFaddin, 2000).

Finalmente, existe un método cuantitativo específico que permite conocer la actividad enzimática y actividad enzimática específica de las enzimas amilasa mediante la hidrólisis de un sustrato comercial llamado ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) (Miller, 1959). Las moléculas de polisacáridos del almidón poseen un terminal reductor capaz de reducir el ácido dinitrosalisílico, por lo tanto, la medición de azúcares reductores es un método usado para determinar la concentración molar de las moléculas de almidón en una solución (Bezerra et al., 2006) A partir de la formación de maltosa, esta reduce el ácido alcalino del DNS de color amarillo a color rojo-anaranjado, en donde la intensidad de color es proporcional a la concentración de maltosa presente en la muestra analizada, la intensidad del color es medida por espectrofotometría a una absorbancia de 540 nm debido a que en esa región se mide la absorción del color naranja-rojo (El-Fallal, Abou Dohara, El-Sayed, & Omar, 2012). Con calor y azúcares reductores, el grupo 3-nitro (NO_2) del DNS es reducido al grupo amino (NH_2), el color del reactivo cambia de amarillo a naranja y a rojo dependiendo de la concentración de azúcares reductores presentes (Miller, 1959; National Centre for Biotechnology Education, 2016).

2.3.2.7 Purificación de la proteína recombinante de interés

Una vez comprobada la presencia e integridad de la proteína recombinante, el último paso para su obtención es la purificación de la proteína de interés se realiza por Cromatografía de afinidad a un metal inmovilizado en columnas de Níquel como ProBond™ o Ni-NTA, estas columnas contienen internamente resinas de agarosa cargadas de níquel, pueden ser usadas para purificación de proteínas de fusión que contienen la etiqueta 6xHis, ya que el níquel tiene una afinidad micromolar a la Histidina presente en la etiqueta, estas proteínas se unirán a la resina y luego serán eluidas con un buffer de pH bajo, imidazole (Invitrogen, 2010; A Geno technology, 2015).

Para la producción de la proteína nativa se utiliza la proteasa SUMO, que como ya se mencionó, se encuentra en el vector pET SUMO y específicamente posee un sitio de corte para proteasas, esta permite la eliminación de la proteína de fusión en el extremo amino de la proteína post-purificación mediante el corte que produce en SUMO (Invitrogen, 2010a).

3. Capítulo III. Metodología

3.1. Obtención de ADN genómico de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

3.1.1. Cultivo

Esta sección se muestra en el Anexo 1, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.1.2. Extracción de ADN genómico de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

Se extrajo ADN genómico de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 con el fin de utilizar este material genético como templado para amplificar el gen *amyL*. Se utilizó el kit de Invitrogen PureLink™ Genomic DNA Mini Kit para bacterias gram positivas (Invitrogen, 2013). El ADN fue almacenado a -80 °C.

3.1.3. Visualización del ADN genómico de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

Con el fin de verificar la integridad del ADN extraído, se visualizó el ADN mediante electroforesis en gel de Agarosa en la cámara de electroforesis Gel-

XL Enduro – Labnet. Posteriormente, el gel se corrió y se visualizó en el fotodocumentador Gel Doc™ XR Gel documentation system (BIO-RAD, USA).

3.1.4. Cuantificación del ADN genómico de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

Con el fin de conocer la concentración del ADN extraído y los ratios A260/280 y A260/230, se cuantificó por Nanodrop 2000 UV-VIS spectrophotometer. Los ratios considerados como adecuados para A260/280 fue de 1.8 y para A260/230 fue entre 2 y 2.2 (Leninger, 1975).

3.2. Obtención del gen *amyL* de la enzima alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 para clonación

3.2.1. Diseño y análisis de cebadores del gen *amyL* de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

Para amplificar la secuencia de interés, se diseñaron los cebadores específicos para el gen codificante de la enzima alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *amyL*. Esta sección se muestra en el Anexo 4, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.2.2. Optimización de la PCR con *Taq* Polimerasa Recombinante para amplificar el gen *amyL* de la enzima alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

3.2.2.1. Resuspensión de cebadores

Esta sección se muestra en el Anexo 5, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.2.2.2. Estandarización de temperatura de hibridación

Esta sección se muestra en el Anexo 6, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.2.2.3. Estandarización de adyuvantes

Con el fin de mejorar la eficiencia de la reacción de PCR se evaluaron los siguientes adyuvantes: glicerol, DMSO y BSA. Esta sección se muestra en el Anexo 7, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.2.3. Generación de ADN de interés a ser insertado en el vector pET SUMO

3.2.3.1. Amplificación del gen *amyL* de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 con la PCR optimizada

Esta sección se muestra en el Anexo 8, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.2.3.2. Purificación del producto de PCR del gen *amyL* de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

El producto de PCR fue purificado con el fin de mejorar la calidad del mismo para la clonación, se realizó con el kit de Invitrogen "PureLink Quick gel

Extraction and PCR Purification combo kit” (Invitrogen, 2011). Se almacenó el tubo a 4 °C.

3.2.3.3. Cuantificación del producto de PCR del gen *amyL* de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

Para conocer la concentración del producto de PCR purificado, se cuantificó por Qubit 2.0 con el kit dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, 2015), para esto se preparó la solución de trabajo en proporción 1:200. Para esto, se añadió 1 µL de fluoróforo y 199 µL de buffer, luego se colocó 1 µL de la muestra con 199 µL de solución de trabajo en un tubo Qubit de 0,6 mL. Posteriormente, se incubó el tubo por dos minutos a temperatura ambiente y finalmente se cuantificó por triplicado en el Qubit, los productos fueron almacenados a 4 °C.

3.3. Unión de ADN de interés al vector pET SUMO

3.3.1. Ligazón *in silico* del ADN de interés al vector pET SUMO

Esta sección se muestra en el Anexo 9, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.3.2. Ligazón *in vitro* del ADN de interés al vector pET SUMO

Con el fin de insertar la secuencia del gen *amyL* en el vector pET SUMO, se realizó la ligazón *in vitro* del ADN de interés en el vector. En primer lugar, se determinó la cantidad de producto de PCR a ser insertado en el vector con la siguiente fórmula:

$$\text{Inserto (ng)} = \frac{\text{Vector pET SUMO (ng)} * \text{tamaño del inserto (Kb)}}{\text{tamaño del vector (Kb)} * \text{radio molar (vector: inserto)}}$$

La cantidad de vector (ng) fue calculada con el volumen (μL) a añadir en la mezcla de ligazón tal como se describe en el manual “Champion pET SUMO protein expression system” (Invitrogen, 2010) Finalmente, se ensambló la mezcla de ligazón, en un volumen final de 10 μL . La mezcla de ligazón se realizó en un tubo de 0,2 mL y se homogeneizó por vórtex. Finalmente, se almacenó a -20 °C overnight.

3.4. Transformación en células de mantenimiento y selección de células transformadas *E.coli* Mach1T1 con el vector control pUC 19 y el vector recombinante pET SUMO-amyL

3.4.1. Transformación y selección de células transformadas *E.coli* Mach1T1 con el vector control pUC 19

Con el fin de comprobar la eficiencia de las células competentes *E.coli* Mach1T1, se siguió el protocolo del manual “Champion pET SUMO protein expression system” (Invitrogen, 2010) para realizar la transformación de las células de mantenimiento Mach1T1 con el vector control pUC19. En primer lugar, se descongelaron los viales de células *E.coli* Mach1T1 en hielo, se usó un vial para cada transformación. Se añadieron 10 ng del vector, es decir 1 μL directamente al vial y se homogeneizaron, se incubaron los viales en hielo y a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, se realizó el choque térmico a 42 °C por 30 segundos y se colocaron los viales en hielo, se añadieron 250 μL de medio S.O.C y se incubaron los viales a 37°C con 225 rpm de agitación por una hora. Adicionalmente, se prepararon las cajas de medio estéril LB Agar (32 g/L) enriquecido con NaCl y Kanamicina y finalmente se sembraron 100 μL del vial transformado en el medio. Se incubaron los platos a 37 °C por 18 horas,

transcurridas las 18 horas, se retiraron los platos de la incubadora y se contaron las colonias aisladas, los platos fueron almacenados a 4 °C. La eficiencia de transformación se calculó mediante la fórmula descrita en la sección 3.4.3.

3.4.2. Transformación y selección de células transformadas *E.coli* Mach1T1 con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

Para introducir el vector recombinante en las células de mantenimiento *E.coli* Mach1T1, se siguió el protocolo del manual “Champion pET SUMO protein expression system” (Invitrogen, 2010) para realizar la transformación en las células de mantenimiento Mach1T1 con la mezcla de ligazón que contenía el vector recombinante pET SUMO-*amyL*. Se siguió el protocolo de transformación descrito en la sección 3.4.1.

3.4.3. Eficiencia de transformación de células transformadas *E.coli* Mach1T1 con el vector control pUC 19 y el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

La eficiencia de transformación se calculó mediante la siguiente fórmula (Invitrogen, 2010a):

$$\frac{\# \text{ de colonias}}{10 \text{ pg}} * \frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} * \frac{V \text{ total de transformación}}{X \mu\text{L plaqueados}} * fd = \frac{\text{UFC}}{\mu\text{g de ADN plasmídico}}$$

Para el caso de las células transformadas *E.coli* Mach1T1 con el vector control pUC 19 la eficiencia de transformación se calculó con el fin de verificar la competencia de las células y para las células transformadas *E.coli* Mach1T1 con el vector recombinante pET SUMO-*amyL* se calculó con el fin de conocer cuántas unidades formadoras de colonia (UFC) son producidas por cada μg de ADN plasmídico utilizado para esta transformación.

3.5. Análisis a nivel de ADN de las células transformadas *E.coli* Mach1T1 con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

3.5.1. PCR de colonia con cebadores internos de las células transformadas con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

Con el fin de verificar la integridad del vector recombinante pET SUMO-*amyL*, se realizó el análisis a nivel de ADN de las células transformadas, en este caso la PCR de colonia. Esta sección se muestra en el Anexo 10, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.5.2. Análisis de restricción *in silico* e *in vitro* de colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

3.5.2.1. Subcultivo de colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

La otra mitad de las colonias se inoculó en medio líquido estéril de LB caldo (20 g/L) enriquecido con NaCl y Kanamicina. Posteriormente, los tubos fueron incubados a 37 °C por 18 horas con agitación.

3.5.2.2. Extracción, visualización y cuantificación de ADN plasmídico de las colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

Con el fin de continuar con el análisis a nivel de ADN de las colonias transformadas y tener un material genético de partida como el vector recombinante pET SUMO-*amyL*, se extrajo ADN plasmídico de las colonias que

mediante PCR amplificaron positivamente con el kit PureLink HQ Mini plasmid Purification kit (Invitrogen, 2012) y se almacenó a -80 °C.

Se visualizó el ADN plasmídico extraído con el protocolo descrito en la sección 3.1.3. Para conocer la concentración del ADN plasmídico extraído, se cuantificó por Qubit 2.0 con el kit dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, 2015), con el protocolo descrito en la sección 3.2.3.3.

3.5.2.3. Análisis de restricción *in silico* de colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

Se realizó el análisis de restricción *in silico* del vector recombinante pET SUMO-*amyL*. Esta sección se muestra en el Anexo 11, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.5.2.4. Análisis de restricción *in vitro* de colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

Con el fin de comprobar la integridad del vector recombinante pET SUMO-*amyL*, se analizaron las colonias transformadas que amplificaron por PCR mediante el análisis de restricción con el ADN plasmídico extraído. Esta sección se muestra en el Anexo 11, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.6. Preservación de las células transformadas *E.coli* Mach1T1 con el vector control pUC19 y el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

Una vez escogido el clon con el ADN insertado en el sentido correcto se procedió a preservar el material genético de las células Mach1T1 con el vector

recombinante pET SUMO-*amyL*, se preservaron las colonias transformadas. Se siguió el protocolo del manual de Invitrogen (Invitrogen, 2010) para almacenamiento a largo plazo. Una vez analizadas y escogidas las colonias, se realizó un aislamiento de las mismas en placas de LB Agar (32 g/L) con Kanamicina. Como siguiente paso, se incubaron las placas a 37 °C por 18 horas. Posteriormente, se tomó una colonia aislada y se inoculó en LB caldo (20 g/L) con Kanamicina y se incubó el tubo a 37 °C hasta que el cultivo esté en la fase estacionaria. Previamente, se añadieron 150 µL de glicerol ultrapuro en crioviales o microtubos de 1,5 mL estériles y se autoclavaron a 121 °C por 15 minutos. Finalmente, al criovial se añadieron 850 µL del cultivo a preservarse en condiciones estériles, se mezcló por inversión hasta asegurarse que el glicerol se homogeneizó con el cultivo e inmediatamente se almacenaron los tubos a -80 °C.

3.7. Transformación en células de expresión y selección de células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT y el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

3.7.1. Transformación y selección de células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT

Con el fin de comprobar la eficiencia de las células competentes *E.coli* BL21 (DE3), se realizó la transformación de las células con el vector control pET SUMO/CAT. Se siguió el protocolo descrito en la sección 3.7.2 pero se añadió 1 ng del vector, es decir, 1 µL directamente al vial de células competentes. Finalmente se sembraron 100 µL del vial en LB Agar (32 g/L) enriquecido con NaCl y Kanamicina. La eficiencia de transformación se calculó con la fórmula descrita en la sección 3.4.3.

3.7.2. Transformación y selección de células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

Para expresar la proteína recombinante alfa-amilasa en las células de expresión *E.coli* BL21 (DE3), se siguió el protocolo del manual “Champion pET SUMO protein expression system” (Invitrogen, 2010). Esta sección se muestra en el Anexo 12, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.8. Análisis cualitativo de la presencia de la enzima alfa-amilasa en células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*, con el vector control pET SUMO/CAT sin inducir y de las células sin transformar *E.coli* BL21 (DE3)

Esta sección se muestra en el Anexo 13, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.9. Inducción con IPTG a las células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT y con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

3.9.1. Inducción con IPTG a las células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT

Con el fin de comprobar el protocolo del ensayo de inducción con IPTG, se realizó la inducción de la expresión de la proteína control CAT, se siguió el protocolo del manual “Champion pET SUMO protein expression system” (Invitrogen, 2010). En primer lugar, se inocularon las células *E.coli* BL21 (DE3) pET SUMO/CAT un tubo de medio estéril LB caldo (20 g/L) más NaCl y Kanamicina. Se incubó a 37 °C hasta que la absorbancia a 600 nm del cultivo

fue de 0.4 a 0.6, en este momento, se añadió 1 mM de IPTG directo al cultivo. Se tomaron 1,5 mL de medio de cultivo cada hora y se midió la absorbancia a 600 nm. En cada punto, se tomaron 500 μ L del cultivo en las cubetas para el espectrofotómetro y se añadieron 500 μ L de medio estéril para finalmente medir 1 mL en el espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201 a 600 nm. Adicionalmente, se centrifugó 1 mL de cultivo a máxima velocidad por 1 minuto, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo microtubo. En este volumen, se cuantificaron las proteínas totales por el método de Bradford, se realizó la medición de actividad enzimática y el resto de medio extracelular fue almacenado a -80 °C para su posterior análisis.

3.9.2. Inducción con IPTG a las células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

Esta sección se muestra en el Anexo 14, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.10. Curvas de crecimiento de las células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO-*amyL* inducidas con el tratamiento 1 y 2, sin inducir y células *E.coli* BL21 (DE3) sin transformar

Esta sección se muestra en el Anexo 15, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.11. Análisis a nivel de proteínas de las células transformadas con el gen *amyL* sin inducir e inducidos

3.11.1. Precipitación con sulfato de amonio de la proteína recombinante alfa-amilasa

Esta sección se muestra en el Anexo 16, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.11.2. Visualización mediante SDS-PAGE de los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio de las células *E.coli* BL21 (DE3) con vector control pET SUMO/CAT, vector recombinante pET SUMO-*amyL* y de las células sin transformar *E.coli* BL21 (DE3)

Esta sección se muestra en el Anexo 17, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.11.3. Análisis cuantitativo de los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio de las células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO-*amyL* inducidas y sin inducir y células sin transformar *E.coli* BL21 (DE3)

3.11.3.1. Determinación de concentración de proteínas totales

Con el fin de conocer la concentración de proteínas totales presentes en los medios extracelulares sin precipitar y precipitados con sulfato de amonio, se realizó la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976), para lo cual, el reactivo de Bradford se preparó disolviendo 200 mg de azul brillante de Comassie G-250 en 50 mL de etanol 96%, a esta solución se añadieron 100 mL de ácido fosfórico y se aforo a 1L. Finalmente, se almacenó a 4 °C protegido de la luz. Se realizó la curva de calibrado con Albúmina de suero bovino. Las muestras de proteínas (medios extracelulares) se cuantificaron por este método a 595 nm. Esta sección se muestra en el Anexo 18, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.11.3.2. Determinación de actividad enzimática

Con el fin de comprobar la expresión de la proteína recombinante alfa-amilasa, se realizó la medición de actividad enzimática por el método de medición de azúcares reductores por DNS. Esta sección se muestra en el Anexo 19, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

3.11.3.3. Determinación de actividad específica

Para la determinación de actividad específica se obtuvieron los valores de actividad enzimática y los valores de concentración de proteínas de cada hora, estos resultados se realizaron dividiendo los valores de actividad enzimática para la concentración de proteínas totales.

4. Capítulo IV. Resultados y discusión

4.1. Obtención de ADN genómico de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

4.1.1. Extracción, visualización y cuantificación de ADN genómico de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

El resultado de la extracción de ADN de la cepa *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 usado como control positivo en la estandarización de la PCR en esta investigación, se puede visualizar en la Figura 6. En cuanto a la pureza, esta sección se muestra en el Anexo 20, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

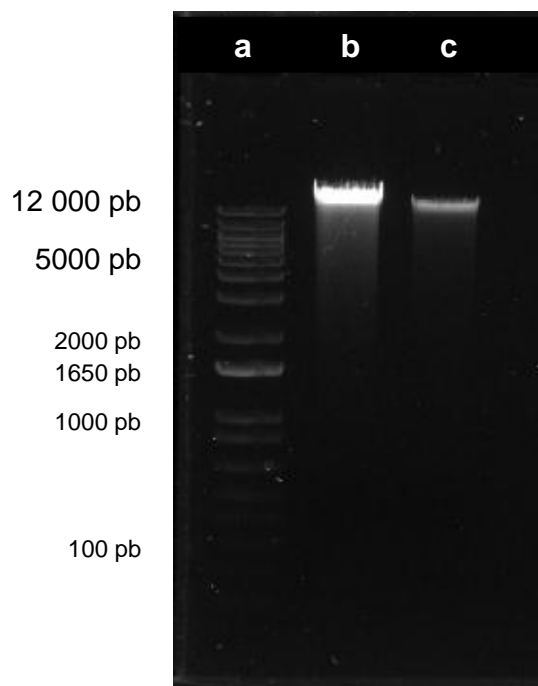


Figura 6. Visualización de ADN genómico de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 mediante electroforesis en gel de Agarosa

- a) Marcador de peso
- b) ADN extraído sin dilución
- c) ADN diluido

4.2. Obtención del gen *amyL* de la enzima alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 para clonación

4.2.1. Diseño y análisis de cebadores del gen *amyL* de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

Los resultados para el diseño de cebadores que amplificaron el gen *amyL* de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 codificante para la enzima alfa-amilasa se muestran en el Anexo 21, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.2.2. Optimización de la PCR con *Taq* Polimerasa Recombinante para amplificar el gen *amyL* de la enzima alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

Las condiciones de reacción y amplificación estandarizadas se muestran en el Anexo 22, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.2.3. Generación de ADN de interés a ser insertado en el vector pET SUMO

El producto de PCR de la amplificación del gen *amyL* de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 para ser insertado en el vector pET SUMO se puede observar en el Anexo 23, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.3. Unión de ADN de interés al vector pET SUMO

Como resultado de la clonación y expresión *in silico* del gen *amyL* en el vector pET SUMO se muestra en el Anexo 24, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.4. Transformación en células de mantenimiento y selección de células transformadas *E.coli* Mach1T1 con el vector control pUC19 y el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

Como resultado de la transformación de las células *E.coli* Mach1T1 con el vector control pUC19, se obtuvieron 93 colonias de color azul como se muestra en la Figura 7. Este fenotipo concuerda con lo esperado ya que existió la hidrólisis de X-Gal por la β -galactosidasa debido a la adecuada transcripción y traducción del gen *lacZ α* por parte del vector puc19 usado para la

transformación, verificando así la alfa complementación que ocurrió en este hospedero tal y como lo describe Invitrogen en el (2006).

La eficiencia de transformación calculada para esta transformación control fue un valor que se encuentra por debajo de lo descrito por el fabricante, el mismo que reporta una eficiencia de transformación con el control positivo que puede ser mayor o igual 1×10^9 UFC/ μ g (Invitrogen, 2010a). Esta diferencia pudo deberse a una inadecuada manipulación de las células en cuanto a su temperatura de transporte y mantenimiento, ya que se conoce que se debe ser extremadamente cuidadoso con estas, ya que suelen resultar muy sensibles a cambios de temperatura. Adicionalmente, durante la manipulación pudo existir lisis celular durante el pipeteo, o problemas en la homogenización de los viales, lo cual pudo desencadenar en que el ADN foráneo no haya entrado adecuadamente a las células a través de su membrana, lo que reduce la eficiencia de transformación (Invitrogen, 2006).

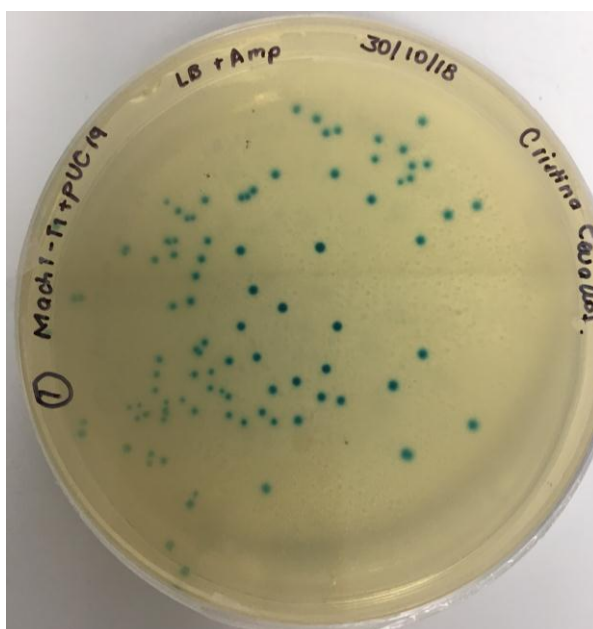


Figura 7. Transformación de las células *E.coli* Mach1T1 con el vector control pUC19.

Por otra parte, como resultado de la transformación de las células *E.coli* Mach1T1 con el gen *amyL* de la enzima alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, se muestra en el Anexo 25, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.5. Análisis a nivel de ADN de las células transformadas *E.coli* Mach1T1 con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

4.5.1. PCR de colonia con cebadores internos de las células transformadas con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

Esta sección, se muestra en el Anexo 26, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.5.2. Análisis de restricción *in silico* e *in vitro* de colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

4.5.2.1. Extracción, visualización y cuantificación de ADN plasmídico de las colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

En la Figura 8, se muestra el resultado de la extracción de ADN plasmídico de cada colonia por triplicado. Se observa un ADN plasmídico sin contaminación con ADN genómico, diferenciándose claramente 3 bandas visibles de diferente tamaño correspondientes a las formas circular, superenrollada y lineal de ADN plasmídico, desde arriba hacia abajo, respectivamente (Surzycki, 2000). Estos resultados fueron adecuados ya que al aislar ADN plasmídico se pueden obtener hasta 4 formas visibles en un gel de electroforesis según la velocidad de migración (Lodish, Berk, & Zipursky, 2000; Andreou, 2013). La forma que se obtuvo en gran cantidad corresponde a la superenrollada la cual fue adecuada

para la transformación realizada en las células de expresión debido a la integridad de la misma (Stadler, Lemmens, & Nyhammar, 2004).

La cuantificación del ADN plasmídico extraído de las diferentes colonias se muestra en la Tabla 1, los valores de concentración para las colonias 3, 4 y 7 en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ fueron de 0,01642; 0,01296 y 0,0145 respectivamente; la diferencia de concentración del ADN plasmídico entre las colonias se pudo deber, como ya se mencionó anteriormente, a que la cantidad inicial de inóculo en el cultivo fue distinta; por esta razón, visualmente se encuentra diferencias entre las colonias. Estos valores están dentro de los esperados por el fabricante del kit de extracción que permite el aislamiento de ADN de alta calidad adecuado para ser utilizado en restricción enzimática, secuenciación, PCR y transformación bacteriana (Invitrogen, 2012).

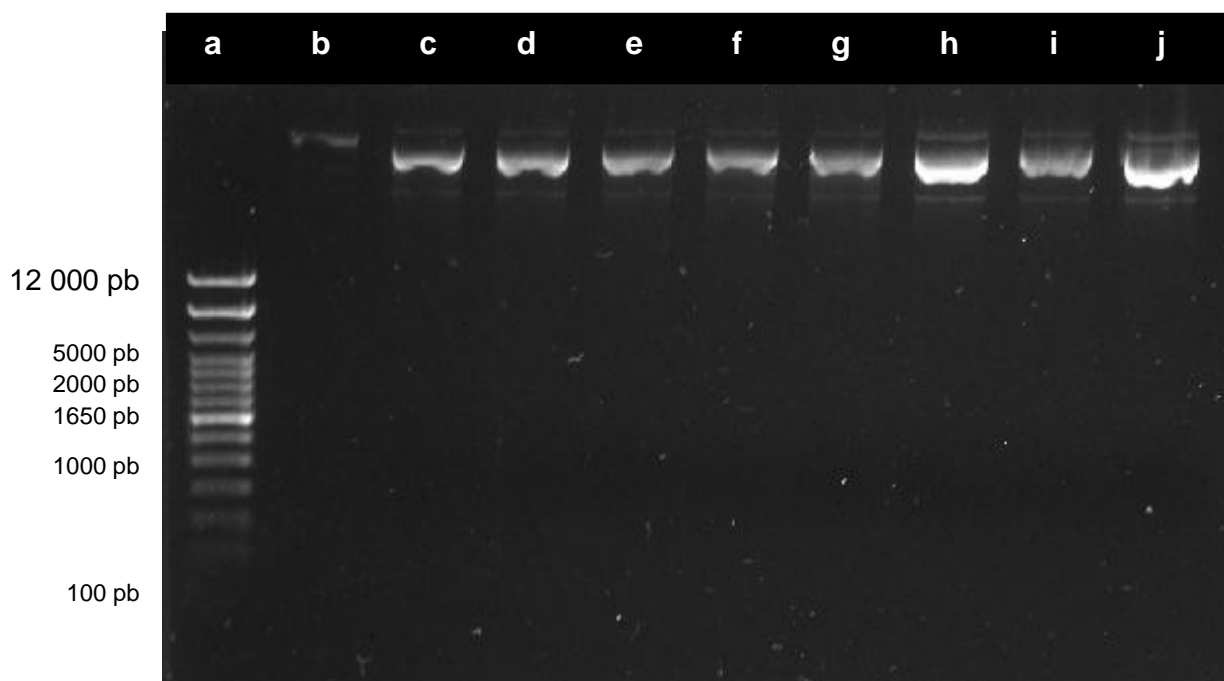


Figura 8. ADN plasmídico de las colonias transformadas con el gen *amyL*

- a)** Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen)
- b)** colonia 3
- c)** colonia 3
- d)** colonia 3
- e)** colonia 4

- f) colonia 4
- g) colonia 4
- h) colonia 7
- i) colonia 7
- j) colonia 7

Tabla 1.

Cuantificación de ADN plasmídico de colonias transformadas con el gen amyL

Número de colonia	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
3	0,01642
4	0,01296
7	0,0145

4.5.2.2. Análisis de restricción *in silico* e *in vitro* de colonias transformadas con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

Esta sección, se muestra en el Anexo 27, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.6. Transformación en células de expresión y selección de células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT y el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

4.6.1. Transformación y selección de células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT

En la Figura 9 se muestran las colonias transformadas de *E.coli* BL21 con el vector control pET SUMO/CAT, como se puede visualizar de un vial de

transformación se obtuvieron 30 colonias, valor que corresponde a una eficiencia de transformación de 9×10^6 UFC/ μg . A su vez, el valor descrito por el fabricante para estas células es de 1×10^8 UFC/ μg por lo que el valor obtenido en este estudio es menor al esperado, esta diferencia como ya se mencionó anteriormente, pudo deberse a una inadecuada manipulación de las células en cuanto a su temperatura de transporte y mantenimiento, ya que se conoce que se debe ser extremadamente cuidadoso con estas células que son sensibles a cambios de temperatura (Invitrogen, 2010b).

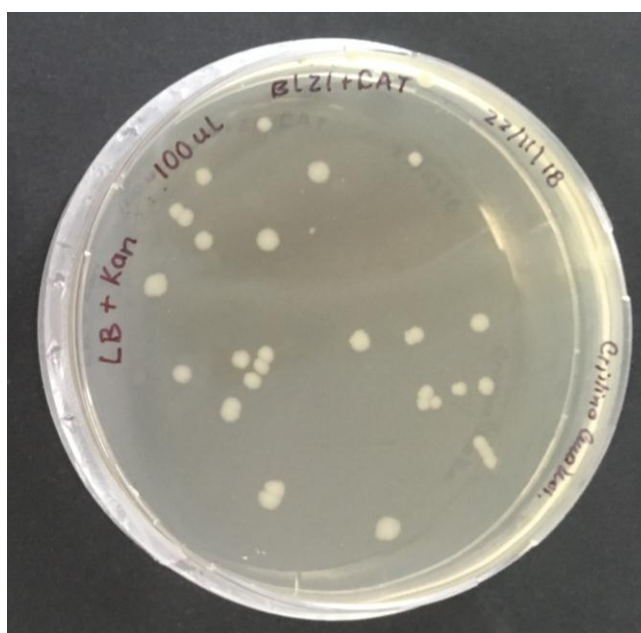


Figura 9. Células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector control pET SUMO/CAT en donde se visualizan 30 colonias.

4.6.2. Transformación y selección de células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO-*amyL*

Esta sección, se muestra en el Anexo 28, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.7. Análisis cualitativo de la presencia de la enzima alfa-amilasa en células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector recombinante pET

SUMO-amyL, con el vector control pET SUMO/CAT sin inducir y de las células sin transformar *E.coli* BL21 (DE3)

Esta sección, se muestra en el Anexo 29, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.8. Curvas de crecimiento de las células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO-amyL inducidas con el tratamiento 1 y 2, sin inducir y células *E.coli* BL21 (DE3) sin transformar

Las curvas de calibrado de *E.coli* sin transformar BL21 (DE3) y *E.coli* BL21 (DE3) transformadas con el vector recombinante pET SUMO amyL y las ecuaciones que permitieron construir las curvas de crecimiento de las células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector pET SUMO-amyL se muestran en el Anexo 30, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.9. Análisis a nivel de proteínas de las células transformadas con el gen amyL sin inducir e inducidos

4.9.1. Visualización mediante SDS-PAGE de los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio de las células *E.coli* BL21 (DE3) con vector control pET SUMO/CAT, vector recombinante pET SUMO-amyL y de las células sin transformar *E.coli* BL21 (DE3)

Los resultados de la visualización por SDS-PAGE de los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio de las células *E.coli* BL21 (DE3) con vector control pET SUMO/CAT se muestran en el Anexo 31, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.9.2. Análisis cuantitativo de los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio de las células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector recombinante pET SUMO-*amyL* inducidas y sin inducir y células sin transformar *E.coli* BL21 (DE3)

4.2.9.1. Determinación de concentración de proteínas totales

Las curvas de calibrado y las ecuaciones que permitieron construir las curvas de concentración de proteínas totales de los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio de las células transformadas *E.coli* BL21 (DE3) con el vector pET SUMO-*amyL* inducidas a las 2 y 10 horas, sin inducir y *E.coli* BL21 (DE3) sin transformar se muestran en el Anexo 32, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.2.9.2. Determinación de actividad enzimática

En cuanto a la medición de actividad enzimática de los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio, se realizaron las curvas de calibrado de actividad enzimática que se muestran en el Anexo 33, ya que esta información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

4.2.9.3. Determinación de actividad específica

Los resultados de los valores de actividad específica de la producción de la enzima recombinante alfa-amilasa, se muestran en el Anexo 34, ya que esta

información será utilizada para publicación, por lo que se mantiene como Anexo confidencial.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

El límite de detección de la PCR estandarizada para amplificar el gen *amyL*, fue la dilución 1:10000 que corresponde a una concentración de 1,5 pg/ μ L, denotando una alta sensibilidad de este sistema optimizado.

La eficiencia de transformación obtenida de las células *E.coli* Mach1T1-pUC19 fue de $5,58 \times 10^7$ UFC/ μ g, valor que resultó adecuado para llevar a cabo exitosamente el experimento desarrollado en este estudio.

El sistema desarrollado de clonación y expresión empleando el vector pET SUMO en células de *E.coli* BL21 (DE3), fue capaz de producir satisfactoriamente la enzima alfa-amilasa, demostrando valores detectables de actividad enzimática y específica para la misma.

La inducción con IPTG con el tratamiento 2 de crecimiento de las células *E.coli* BL21 (DE3), influyó en la expresión de la proteína presentando los mejores resultados de actividad enzimática y específica de la enzima alfa-amilasa debido al uso del promotor T7 que permite su expresión.

La integridad de la enzima *amyL* con un tamaño de 55,9 kDa correspondiente a la proteína nativa sin péptido señal, se demostró mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en los medios extracelulares precipitados con sulfato de amonio a las 30 y 36 horas de crecimiento.

La enzima *amyL* producida en las células *E.coli* BL21 (DE3) inducidas con el tratamiento 2 y precipitadas con sulfato de amonio, presentó el mejor valor de actividad específica a las 30 horas de crecimiento, siendo este de 3,66 U/mg y actividad enzimática de 0,1955 U/mL.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda analizar la fracción insoluble o pellet celular para evaluar si la proteína no se está secretando completamente.

Se recomienda visualizar la formación de cuerpos de inclusión que posiblemente se formaron dentro de la célula disminuyendo la actividad enzimática.

Se recomienda hacer una curva de *salting in* y *salting out* para determinar el mejor porcentaje de saturación con sulfato de amonio para la enzima alfa-amilasa.

Se recomienda hacer diálisis luego de la precipitación con sulfato de amonio para evitar que las sales restantes afecten en la visibilidad de la proteína en los geles de SDS-PAGE.

Se recomienda tomar más puntos de crecimiento para evaluar luego de las 48 horas si la producción y expresión de la proteína aumenta.

Se recomienda utilizar un coctel inhibidor de proteasas y trabajar a 4 °C para evitar la degradación de las proteínas.

Es recomendable purificar la enzima alfa amilasa mediante técnicas como purificación con columnas de Níquel o por técnicas cromatográficas.

REFERENCIAS

- A Geno technology. (2015). Ni-NTA Resin.
- AL-ASADY, A. K. G. (2016). *Optimization of A-Amylase Production From a Local Isolate of Bacillus Licheniformis and Characterization of Purified Enzyme. International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)*, 6(2), 301–312. Recuperado el 12 de Mayo de 2019 de <http://www.tjprc.org/view-archives.php>
- Alton, E., Armstrong, D., Ashby, D., Bayfield, K., Bilton, D., & Wolstenholme-Hogg, P. (2015). *Bacterial transformation & selection. Khan Academy.*
- Andreou, L. V. (2013). *Isolation of plasmid DNA from bacteria. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 529). Elsevier Inc. Recuperado el 2 de Junio de 2019 de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00010-0>
- Ashabil, A., Burhan, A., Hatice, K., Sadik, D., & Ömer, Ç. (2008). *Highly thermostable and alkaline α -amylase from a halotolerant-alkaliphilic Bacillus sp. AB68. Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 547–553.
- Asoodeh, A., Emtenani, S., Emtenani, S., & Jalal, R. (2014). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic Molecular cloning and biochemical characterization of a thermoacidophilic , organic-solvent tolerant alpha-amylase from a Bacillus strain in Escherichia coli. "Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic,"* 99, 114–120. Recuperado el 15 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.10.025>
- ATCC. (2016). *Bacillus licheniformis ATCC 14580 Live Culture*, 10341.
- Bergkessel, M., & Guthrie, C. (2013). *Colony PCR. Methods in Enzymology*, 529, 299–309. Recuperado el 19 de Marzo de 2019 de <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2>
- Bezerra, R. P., Borba, F. K. S. L., Moreira, K. A., Lima-Filho, J. L., Porto, A. L. F., & Chaves, A. C. (2006). *Extraction of amylase from fermentation broth in poly (ethylene glycol) salt aqueous two-phase system. Brazilian Archives*

of Biology and Technology, 49(4), 547–555. Recuperado el 2 de Abril de 2019 de <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000500003>

Bio-Rad. (2017). *A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection BEGIN*. Recuperado el 12 de Marzo de 2019 de http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf

BIORAD. (n.d.). *Tetra Mini-PROTEAN Tetra Cell plus recommended protocols*.

Bornhorst J.A., & J.J., F. (2000). *Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. Methods in Enzymology*, 326(1), 245–254. Recuperado el 25 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. Recuperado el 14 de Marzo de 2019 de [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brown, T. (2010). *Gene cloning and DNA analysis, an introduction* (6th ed.). Manchester: Wiley-Blackwell.

Bruna, C. (2013). *What is the optimal OD600 and IPTG concentration?* Recuperado el 23 de Abril de 2019 de https://www.researchgate.net/post/What_is_the_optimal_OD600_and_IPTG_concentration

Carson, S., Miller, H. B., & Witherow, D. S. (2012). *PCR Amplification of egfp and Completion of Vector Preparation. Molecular Biology Techniques*, 21–29. Recuperado el 13 de Junio de 2019 de <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385544-2.00003-x>

Castillo Rosales, E., & Rodríguez, M. E. (2014). Enzimas aplicadas en procesos industriales. *Revista Digital Universitaria. Universidad Autónoma de México*, 15, 1–11.

Celińska, E., Białas, W., Borkowska, M., & Grajek, W. (2015, March 15). *Cloning, expression, and purification of insect (Sitophilus oryzae) alpha-*

amylase, able to digest granular starch, in Yarrowia lipolytica host. Applied Microbiology & Biotechnology. Recuperado el 15 de Abril de 2019 de <http://10.0.3.239/s00253-014-6314-2>

Checa Rojas, A. (2018). Método: células competentes y transformación.

Choi, Y.-E., Roh, S. W., Nam, Y.-D., Song, H. S., Kim, Y. B., Yoon, C., ... Kim, J. Y. (2017). *Genomic Analysis of Bacillus licheniformis CBA7126 Isolated from a Human Fecal Sample. Frontiers in Pharmacology*, 8(October), 1–5. Recuperado el 13 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00724>

Deljou, A., & Arezi, I. (2016). *Production of thermostable extracellular α -amylase by a moderate thermophilic Bacillus licheniformis-AZ2 isolated from Qinarje Hot spring (Ardebil prov. of Iran). Periodicum Biologorum*, 118(4), 405–416. Recuperado el 8 de Junio de 2019 de <https://doi.org/10.18054/pb.v118i4.3737>

Divakaran, D., Chandran, A., & Pratap Chandran, R. (2011). *Comparative study on production of α -amylase from Bacillus licheniformis strains. Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1397–1404. Recuperado el 11 de Marzo de 2019 de <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400022>

El-Fallal, A., Abou Dohara, M., El-Sayed, A., & Omar, N. (2012). *Starch and Microbial alfa-amylases: from concepts to biotechnological applications. School of Enviromental Sciences*.

Enzymes for Research, Diagnostic and Industrial Use. (n.d.).

ExpASY Bioinformatics Resource Portal. (n.d.). Enzyme EC 3.2.1.1.

ExpASY Bioinformatics Resource Portal. (2019). ProtParam.

Ferreira, R. D. G., Azzoni, A. R., & Freitas, S. (2018). *Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using E. coli: The case of recombinant β -glucosidase. Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–14. Recuperado el 11 de Abril de 2019 de <https://doi.org/10.1186/s13068->

018-1077-0

- Freeman, W. (2000). Una introducción al análisis genético. Recuperado el 1 de Junio de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21881/>
- Gandhi, S., Salleh, A. B., Noor, R., Raja, Z., Rahman, A., Leow, T. C., & Oslan, S. N. (2015). *Expression and Characterization of Geobacillus stearothermophilus SR74 Recombinant alpha-Amylase in Pichia pastoris, 2015.*
- Gifre, L., Arís, A., Bach, À., & Garcia-Fruitós, E. (2017). *Trends in recombinant protein use in animal production. Microbial Cell Factories, 16(1), 1–17.* Recuperado el 13 de Abril de 2019 de <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0654-4>
- Granja, G. (2016). Ingeniería genética, una herramienta transversal en el desarrollo de la Biotecnología. *Revista Economundo, 78, 12–15.*
- Guerrero, S. (2018). Investigando en el tercer mundo. *Redacción Médica: Enfoque Científico.*
- Han, Y., Song, Q., Du, R., Zhang, Q., Zhou, Z., Kim, R.-C., & Zhao, F. (2018). *Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent α-amylase produced by Bacillus amyloliquefaciens BH072. International Journal of Biological Macromolecules, 115(2017), 1151–1156.* Recuperado el 19 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.004>
- Held, P. (2013). *Enzymatic digestion of polysaccharides. Part II: Optimization of polymer digestion and glucose production in microplates. Biofuel Research, 1–5.* Recuperado el 9 de Mayo de 2019 de <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Enzymatic+Digestion+of+Polysaccharides+Part+II+:+Optimization+of+Polymer+Digestion+and+Glucose+Production+in+Microplates#0>
- Hwang, K., Song, H., Chang, C., Lee, J., Lee, S., Kim, K., ... Suh, S. (1997). *Crystal structure of thermostable alpha-amylase from Bacillus licheniformis*

refined at 1.7 Å resolution.

InterPro. (2019). *Alpha-amylase, thermostable.*

Invitrogen. (2006). *One shot Mach1-T1 chemically competent E.coli, (October), 1–2.*

Invitrogen. (2010a). *Champion™ pET SUMO Protein Expression System, (25).*

Invitrogen. (2010b). *One Shot® BL21(DE3) One Shot® BL21(DE3)pLysS One Shot® BL21(DE3)pLysE Competent Cells.*

Invitrogen. (2011). *PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit For purification of DNA fragments from agarose gels and rapid, efficient purification of PCR products, (100006472).*

Invitrogen. (2012). *PureLink® HQ Mini Plasmid Purification Kit For isolating high-quality plasmid DNA, (25).* Recuperado el 8 de Marzo de 2019 de https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_man.pdf

Invitrogen. (2013). *PureLink® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA. PureLink Genomic DNA Kits For Purification of Genomic DNA, (25), 1–48.*

Invitrogen. (2015). *LifeTech: Qubit™ dsDNA HS Assay Kits. Manual, 1–9.* Recuperado el 12 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti553>

Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). *Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology, 13(4), 345–351.* Recuperado el 15 de Abril de 2019 de [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00328-2)

Labome. (2012). *Recombinant Protein Expression: Vector-Host Systems.*

Lehmann, C. (2001). *Hydrolytic Enzymes: Amylases, Proteases, Lipases.*

- Leninger, A. L. (1975). T042-TECHNICAL BULLETIN *NanoDrop Spectrophotometers. Biochemistry, 2nd Edition, 2nd*, 2–3. Recuperado el 8 de Junio de 2019 de www.nanodrop.com
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). *Technology Prospecting on Enzymes : Application , Marketing and Engineering*, (September).
- Lodish, H., Berk, A., & Zipursky, S. (2000). *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York, USA.
- MacFaddin, J. (2000). *Starch hydrolysis. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 412.
- Machius, M., Declerck, N., Huber, R., & Wiegand, G. (2003). *Kinetic stabilization of Bacillus licheniformis α -amylase through introduction of hydrophobic residues at the surface. Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11546–11553. Recuperado el 2 de Junio de 2019 de <https://doi.org/10.1074/jbc.M212618200>
- Meyer, S., Lorenz, C., Baser, B., Wördehoff, M., Jäger, V., & van den Heuvel, J. (2013). *Multi-Host Expression System for Recombinant Production of Challenging Proteins. PLoS ONE*, 8(7), 1–9. Recuperado el 17 de Junio de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068674>
- Miller, G. L. (1959). *The history and challenge of HIV prevention*. [see comment]. [Review] [88 refs]. *Lancet*, 372(9637), 475–488. Recuperado el 21 de Junio de 2019 de [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60884-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60884-3)
- Mobini-dehkordi, M., & Javan, F. A. (2012). *Aplication of alpha-amylase in biotechonology*. Recuperado el 12 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.15412/J.JBTW>.
- Monteiro de Souza, P., & Oliveira Magalhaes, P. (2010). *APPLICATION OF MICROBIAL -AMYLASE IN INDUSTRY – A REVIEW* Paula Monteiro de Souza; Pérola de Oliveira e Magalhães Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de

Brasília, Brasília, DF, Brasil., 850–861.

National Centre for Biotechnology Education. (2016). *DNSA reagent Instructions for preparation and use*, (July), 1–2.

New England Biolabs. (2019). *Colony PCR*. Recuperado el 23 de Junio de 2019 de <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-analysis/colony-pcr>

Olempska-Bier, Z. (2004). *Alpha-Amylase From Bacillus Licheniformis Containing a Genetically Engineered Alpha- Amylase Gene From B. licheniformis (Thermostable)*. *Chemical and Technical Assessment: FAO 61st JECFA*, 1(6), 1–6. Recuperado el 23 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1038/nrc2106>

Oswald, N. (2016). How SDS-PAGE Works. *Fluidic Analytics*.

Oyuntogtokh, B., & Byambasuren, M. (2017). *Morphological and molecular based identification of Antifungal bacillus licheniformis*. *Mongolian Journal of Agricultural Sciences*, 17(1), 31–35. Recuperado el 29 de Abril de 2019 de <https://doi.org/10.5564/mjas.v17i1.724>

Paul, J. S., Lall, B. M., Jadhav, S. K., & Tiwari, K. L. (2017). *Parameter's optimization and kinetics study of α -amylase enzyme of Bacillus sp. MB6 isolated from vegetable waste*. *Process Biochemistry*, 52, 123–129. Recuperado el 17 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.10.005>

Pérez-García, A., Romero, D., & de Vicente, A. (2011). *Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture*. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 187–193. Recuperado el 11 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>

Pervaiz, A., Malik, B., & Rashid, N. (2017). *Enhancing Soluble Gene Expression of α -amylase Bacillus licheniformis and Purification of*

- Recombinant Protein. Advances in Life Sciences*, 7(1), 5–10. Recuperado el 1 de Junio de 2019 de <https://doi.org/10.5923/j.als.20170701.02>
- Primrose, S. B., Twyman, R. M., & Old, R. W. (2001). *Principles of Gene Manipulation. Gene* (Vol. 1). Recuperado el 23 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1136/jmg.19.5.397-a>
- Pujadas, G., & Palau, J. (1999). *Evolution of Alpha -Amylases: Architectural Features and Key Residues in the Stabilization of the (Beta/ alpha) 8 Scaffold. Molecular Biological Evolution*, 18(1), 38–54. Recuperado el 12 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003718>
- Rasiah, I. A., & Rehm, B. H. A. (2009). *One-Step Production of Immobilized alpha-Amylase in Recombinant Escherichia coli*, 75(7), 2012–2016. Recuperado el 2 de Junio de 2019 de <https://doi.org/10.1128/AEM.02782-08>
- Ravishankar, S., Ambady, A., Ramu, H., Mudugal, N. V., Tunduguru, R., Anbarasu, A., Ramaiah, S. (2015). *An IPTG inducible conditional expression system for mycobacteria. PLoS ONE*, 10(8), 1–23. Recuperado el 12 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134562>
- Rey, M. W., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpin, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, M. Berka, R. M. (2004). *Complete genome sequence of the industrial bacterium Bacillus licheniformis and comparisons with closely related Bacillus species. Genome Biology*, 5(10), R77. Recuperado el 15 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r77>
- Rivera, M. H., Lopez-Munguia, A., Soberon, X., & Saab-Rincon, G. (2003). *Alfa-Amylase from Bacillus licheniformis mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. Protein Engineering Design and Selection*, 16(7), 505–514. Recuperado el 11 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1093/protein/gzg060>
- Roy, J. K., Borah, A., Lata, C., & Mukherjee, A. K. (2013). *Enzymatic Cloning*

and overexpression of raw starch digesting alpha-amylase gene from *Bacillus subtilis* strain AS01 a in *Escherichia coli* and application of the purified recombinant alpha-amylase (AmyBS-I) in raw starch dig. "Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic," 97, 118–129. Recuperado el 8 de Junio de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.07.019>

Saima Aftab. (2012). Cloning and expression of endo-1,4- β -glucanase gene from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 into *Escherichia coli* BL21 (DE 3). *African Journal of Biotechnology*, 11(12), 2846–2854. Recuperado el 11 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.5897/ajb11.2902>

Shahhoseini, M., Ziaee, A. A., & Ghaemi, N. (2003). Expression and secretion of an α -amylase gene from a native strain of *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* by T7 promoter and putative signal peptide of the gene. *Journal of Applied Microbiology*, 95(6), 1250–1254. Recuperado el 18 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02082.x>

Shih, I. L., Van, Y. T., & Chang, Y. N. (2002). Application of statistical experimental methods to optimize production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(3), 213–220. Recuperado el 12 de Mayo de 2019 de [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00103-5)

Stadler, J., Lemmens, R., & Nyhammar, T. (2004). Plasmid DNA purification. *Journal of Gene Medicine*, 6(SUPPL. 1), 54–66. Recuperado el 18 de Abril de 2019 de <https://doi.org/10.1002/jgm.512>

Sun, L., Qin, T., Liu, Y., Zhao, H., Xia, X., & Lei, X. (2018). Cloning , expression , and characterization of a porcine pancreatic alpha-amylase in *Pichia pastoris*. *Animal Nutrition*, 1–7. Recuperado el 20 de Junio de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.11.004>

Sundarram, A., Pandurangappa, T., & Murthy, K. (2014). α -Amylase Production and Applications : A Review, 2(4), 166–175. Recuperado el 11 de Junio de 2019 de <https://doi.org/10.12691/jaem-2-4-10>

- Surzycki, S. (2000). *Basic Techniques in Molecular Biology* (1th ed.). USA: Springer Lab. Manuals.
- SWISS-MODEL. (2016). *Alpha-amylase A0A0S1M121_BACLI*. Recuperado el 14 de Mayo de 2019 de <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot//A0A0S1M121>
- Tiwari, S., Shukla, N., Mishra, P., & Gaur, R. (2014). *Enhanced production and characterization of a solvent stable amylase from solvent tolerant bacillus tequilensis RG-01: Thermostable and surfactant resistant*. *Scientific World Journal*, 2014. Recuperado el 15 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1155/2014/972763>
- UniProt. (2019). UniProtKB-A0A0S1M121 Alpha-amylase.
- Wyrick, P. B., & Rogers, H. J. (1973). *Isolation and characterization of cell wall defective variants of Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis*. *Journal of Bacteriology*, 116(1), 456–465.
- Zafar, A., Aftab, M. N., Din, Z., Aftab, S., Iqbal, I., & Haq, I. (2015). *Cloning , Purification and Characterization of a Highly Thermostable Amylase Gene of Thermotoga petrophila into Escherichia coli*. Recuperado el 18 de Mayo de 2019 de <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1912-8>
- Zhang, Q., Han, Y., & Xiao, H. (2017). *Microbial alpha-amylase : A biomolecular overview*. *Process Biochemistry*, 53, 88–101. Recuperado el 1 de Junio de 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.012>
- Zhou, M.-Y., Gomez-Sanchez, C. E., & Montgomery, S. (2000). *Universal TA Cloning 1 Curr. Issues Mol. Biol*, 2(1), 1–7. Recuperado el 21 de Junio de 2019 de <http://www.caister.com/cimb/v/v2/1.pdf>

ANEXOS

Los anexos se mantienen de forma confidencial, debido a que la información va a ser utilizada para publicación.

