



**UNIVERSIDAD  
DEL AZUAY**

**Facultad de Ciencia y Tecnología**

**Escuela de Ingeniería en Alimentos**

**Clonación y producción en *Escherichia coli* de la enzima alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* para su potencial uso en la industria de alimentos**

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:**

**INGENIERA EN ALIMENTOS**

**Autora:**

**JÉSSICA ALEXANDRA GUERRERO IZQUIERDO**

**Director:**

**RODRIGO SEBASTIÁN CAROCA CÁCERES**

**Cuenca – Ecuador**

**2021**

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a las personas más importantes en mi vida, a mis padres, gracias a su apoyo constante desde el principio, inculcarme valores, enseñarme a superarme todos los días, y su amor incondicional yo he podido llegar a donde estoy ahora.

Así mismo, dedico mi tesis a todas las personas que han estado a mi lado en cada proceso, motivándome, estando en las buenas y en las malas y su compañía para salir adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Rodrigo Caroca, por guiarme en cada paso en esta investigación, por su paciencia, enseñanza constante en todo el proceso para así poder cumplir con los objetivos planteados.

Agradezco a todo el personal de la Universidad del Azuay, por su ayuda, apoyo y paciencia, los cuales también fueron de una gran ayuda en mi desarrollo profesional y personal.

También, agradezco a toda mi familia por sus fuerzas, consejos y atención, los cuales me han ayudado a crecer y ser lo que soy día a día, siendo mi ejemplo, y constante inspiración para seguir adelante y nunca abandonar mis metas y sueños.

Finalmente, agradezco a mis amigos, que han hecho más fácil esta etapa, con sus consejos, apoyo, y fuerzas estando a mi lado en los buenos y malos momentos.

**Clonación y producción en *Escherichia coli* de la enzima alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* para su potencial uso en la industria de alimentos**

**RESUMEN**

Las alfa – amilasas son enzimas muy utilizadas a nivel mundial en distintas industrias. En esta investigación se obtuvo el gen que codifica una alfa – amilasa a partir del ADN genómico de *Bacillus amyloliquefaciens* y se clonó en dos plásmidos: pET15b y pET28a, los cuales se utilizaron para transformar cepas de expresión de *Escherichia coli* y así producir la alfa – amilasa recombinante. Se obtuvo la enzima y se determinó que tenemos la actividad esperada. Además, se realizó una revisión bibliográfica para determinar su potencial uso en la industria alimentaria.

**Palabras claves:** *Bacillus amyloliquefaciens*, pET15b, pET28a, *Escherichia coli*.



Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

**Director de tesis**



María Fernanda Rosales Medina

**Directora de escuela**



Jéssica Alexandra Guerrero Izquierdo

**Autora**

**Cloning and production of *Escherichia coli* with the *Bacillus amyloliquefaciens* alphaamylase enzyme for its potential use in the food industry**

**ABSTRACT**

Alpha-amylases are enzymes widely used worldwide in different industries. In this investigation the gene encoding an alpha-amylase was obtained from the genomic DNA of *Bacillus amyloliquefaciens* and it was cloned into two plasmids: pET15b and pET28a, which were used to transform strains of *Escherichia coli* and thus produce recombinant alpha-amylase. The enzyme was obtained, and it was determined that we achieved the expected activity. In addition, a bibliographic review was carried out to determine its potential use in the food industry.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens*, pET15b, pET28a, *Escherichia coli*.



---

Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres

**Thesis Director**



---

María Fernanda Rosales Medina

**Faculty Director**



---

Jéssica Alexandra Guerrero Izquierdo

**Author**

## TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
TABLA DE CONTENIDOS .....	vi-vii
LISTA DE FIGURAS .....	8 y 9
LISTA DE TABLAS .....	10
LISTA DE ANEXOS .....	11
INTRODUCCIÓN .....	12-14
CAPÍTULO I: MATERIALES Y METODOS .....	15
1.1. Crecimiento de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	15
1.2. Preparación del constructo para la producción recombinante de la alfa-amilasa..	15
1.2.1. Extracción de ADN genómico.....	15
1.2.2. PCR con ADN de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	15 y 16
1.2.3. Clonación molecular y reacción de amplificación mediante PCR.....	16
1.2.3.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	17 y 18
1.2.3.2. Secuenciación y análisis de secuencias.....	18 y 19
1.3. Análisis de ADN mediante electroforesis y cuantificación espectrofotométrica...	19 y 20
1.4. Inducción de la expresión de alfa – amilasa.....	20
1.5. Precipitación de proteínas .....	20
1.6. Determinación de actividad enzimática .....	21
1.7. Gel de proteínas.....	21
CAPÍTULO II: RESULTADOS .....	22
2.1. Extracción de ADN genómico de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	22
2.2. Digestión de plásmidos y amplificación de la alfa – amilasa .....	22 y 23
2.3. Clonación del gen de alfa-amilasa y transformación de cepas de <i>E. coli</i> .....	24
2.3.1. Secuenciación .....	24-26
2.3.2. Comparación de secuencias de proteínas .....	26 - 28
2.3.3. Segunda transformación .....	28
2.4. Producción de la enzima y ensayos de actividad.....	28 y 29
2.4.1. Ensayos cualitativos de actividad alfa - amilasa.....	29
2.4.1.1. Ensayo en placas para detección de actividad alfa - amilasa.....	30

2.5. Gel de proteínas.....	30
CAPÍTULO III: DISCUSIONES.....	31-33
CONCLUSIONES .....	34
BIBLIOGRAFÍA .....	35-40
ANEXOS .....	41-43

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Plásmido posterior a la clonación de pET15b-AAM con su tamaño y sitios de corte con la enzima de restricción HindIII.....18
- Figura 2.** Plásmido posterior a la clonación de pET28a-AAM con su tamaño y sitios de corte con las enzimas de restricción HindIII y XbaI.....19
- Figura 3.** Gel de electroforesis de agarosa cargado con las reacciones de PCR para el gen que codifica la enzima alfa amilasa: 1) Marcador de peso 1Kb Plus 2) Producto de PCR del ADN de *Bacillus amyloliquefaciens*, 3) Producto de PCR por duplicado del gen de ADN de *Bacillus amyloliquefaciens*.....22
- Figura 4.** Gel de electroforesis de agarosa cargado con los plásmidos digeridos con enzimas de restricción: 1) Marcador de peso 1KB (Thermo Scientific™) 2) Plásmido pET15b sin digerir, 3) Plásmido pET15b digerido con NcoI y BamHI, 4) Plásmido pET15b digerido con NcoI y BamHI (réplica), 5) Plásmido pET28a sin digerir, 6) Plásmido pET28a digerido con NcoI y XhoI, 7) Plásmido pET28a digerido con NcoI y XhoI (réplica).....23
- Figura 5.** Gel de electroforesis de agarosa cargado con los productos de PCR de AAM: 1) Marcador de peso 1Kb (Thermo Scientific™), 2) PCR de AAM para clonación en pET15b, 3) PCR de AAM para clonación en pET15b (réplica), 4) PCR de AAM para clonación en pET15b (blanco sin ADN), 5) PCR de AAM para clonación en pET28a, 6) PCR de AAM para clonación en pET28a (réplica), 7) PCR de AAM para clonación en pET28a (blanco sin ADN).....23
- Figura 6.** Análisis mediante digestión con enzimas de restricción de los plásmidos aislados desde cepas TOP10 de *E. coli*. Las muestras en cada carril son: 1) Marcador de peso 1Kb, 2-6) pET15b-AAM obtenido de cinco colonias independientes y digerido con HindIII, 7-11) pET28a-AAM obtenido de cinco colonias independientes y digerido con XbaI+HindIII.....24
- Figura 7.** Comparación de la secuencia de ADN del clon 1 de pET15b-AAM con la secuencia de AAM-BD. Los rectángulos azules muestran los lugares que tienen los nucleótidos diferentes...25
- Figura 8.** Comparación de la secuencia de ADN del clon 2 de pET15b-AAM con la secuencia del clon 2 de pET28a-AAM. Los rectángulos azules muestran los lugares que tienen los nucleótidos diferentes.....25
- Figura 9.** Comparación de la secuencia de proteína del clon 1 de pET15b-AAM con la secuencia de AAM-BD. Los rectángulos azules nos muestran los lugares que tienen los aminoácidos diferentes.....27
- Figura 10.** Comparación de la secuencia de aminoácidos del clon 2 de pET15b-AAM con la secuencia del clon 2 de pET28a-AAM.....27
- Figura 11.** Análisis mediante digestión con enzimas de restricción de los plásmidos aislados desde cepas C41 de *E. coli*. Las muestras en cada carril son: 1. Ladder 1Kb Plus, 2. Plásmido pET28a sin digerir, 3. Digestión del plásmido pET28a con las enzimas HindIII y XbaI, 4. Plásmido pET15b sin digerir, 5. Digestión 1 del plásmido pET15b con la enzima HindIII, 6. Digestión 2 del plásmido pET15b con la enzima HindIII. 7. Blanco y 8. Ladder 1KB Plus.....28
- Figura 12.** Gel de electroforesis SDS-PAGE de las proteínas del sobrenadante y pellet sonificado de *E. coli* transformada con pET15b-AAM y pET28a-AAM: 1) Ladder BenchMark™ Protein Ladder. 2) Sobrenadante inducido pET15b-AAM dializado. 3) Sobrenadante sin inducir de pET15b-AAM dializado. 4) Pellet pET15b-AAM inducido después de la centrifugación. 5) Sobrenadante inducido pET28a-AAM dializado 6) Sobrenadante sin inducir de pET28a-AAM dializado. 7) Pellet pET28a-AAM inducido después de la centrifugación. 8) Lacasa inducida y



dializada. 9) Lacasa sin inducir y dializada. 10) Ladder BenchMark™ Protein Ladder.....30

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diferencias de nucleótidos de las secuencias de alfa – amilasa en el plásmido pET15b.	26
<b>Tabla 2.</b> Diferencias de nucleótidos de las secuencias de alfa – amilasa en el plásmido pET28a.	26
<b>Tabla 3.</b> Comparación de las secuencias de proteínas de cada vector con la alfa – amilasa del GenBank y características de los aminoácidos reemplazados.....	28
<b>Tabla 4.</b> Resultados de la prueba cualitativa en líquido. Como control positivo se usó alfa amilasa comercial (++++) y control negativo una muestra de lacasa (-).....	29

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Vector pET15b y sus sitios de corte con las distintas enzimas de restricción.....	41
<b>Anexo 2.</b> Región de expresión/clonación del pET15b.....	41
<b>Anexo 3.</b> Vector pET28a y sus sitios de corte con las distintas enzimas de restricción.....	42
<b>Anexo 4.</b> Región de expresión/clonación del pET28a (Novagen).....	42
<b>Anexo 5.</b> Pruebas cualitativas de actividad alfa – amilasa en ensayo líquido: a) Mezcla de almidón y yodo antes de colocar la enzima obteniendo una solución de color azul oscuro. b) Decoloración a causa de los pellets lisados en la mezcla de almidón y yodo. Siendo el de la izquierda el pET15b-AAM y el de la derecha pET28a-AAM ambos previamente inducidos y realizado por triplicado. c) Control positivo de alfa amilasa comercial.....	42
<b>Anexo 6.</b> Ensayo de actividad alfa – amilasa de pellets y sobrenadantes inducidos provenientes de <i>E. coli</i> transformada con pET15b-AAM y pET28a-AAM: 1) Sobrenadante pET28a-AAM. 2) Pellet pET28a-AAM. 3) Sobrenadante pET15b-AAM. 4) Pellet pET15b-AAM. 5 y 6) Controles negativos ( <i>E. coli</i> productora de la enzima lacasa).....	43
<b>Anexo 7.</b> Ensayo de actividad alfa – amilasa de sobrenadantes y pellets provenientes de <i>E. coli</i> transformada con pET15b-AAM y pET28a-AAM. En la figura 14a se presentan los resultados de los sobrenadantes inducidos, sin inducir y sus controles negativos siendo: 1) Sobrenadante sin inducir de pET28a-AAM. 2) Sobrenadante inducido de pET28a-AAM. 3 y 4) Controles negativos de la enzima lacasa. 5) Sobrenadante inducido de pET15b-AAM. 6) Sobrenadante sin inducir de pET15b-AAM. En la figura 14b se presenta el ensayo de pellets inducidos y sonicados antes y después de la centrifugación siendo: 1) Pellet pET28a-AAM después de la centrifugación. 2) Pellet pET28a-AAM antes de la centrifugación. 3) Pellet pET15b-AAM antes de la centrifugación. 4) Pellet pET15b-AAM después de la centrifugación. 5 y 6) Controles negativos con la enzima lacasa de <i>E. coli</i> .....	43
<b>Anexo 8.</b> Aminoácidos de las secuencias de proteínas con sus respectivas características. (Navas (2009); Mckee & Mckee (2020)).....	43

Jéssica Alexandra Guerrero Izquierdo

Trabajo de Graduación

Rodrigo Sebastián Caroca Cáceres, PhD.

Noviembre, 2021

## **CLONACIÓN Y PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE ALFA-AMILASA DE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* PARA SU USO EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS**

### **INTRODUCCIÓN**

La biotecnología es un área que se encuentra en un desarrollo constante y en Ecuador aún no se explota a pesar de que aprovecha las tendencias actuales que buscan el uso de productos biológicos estables, eficaces y con un bajo impacto ambiental (Mendoza & Martínez, 2018). Las enzimas son uno de estos productos biológicos las cuales son catalizadores biológicos debido a que aceleran la velocidad de varias reacciones químicas que tienen lugar dentro de las células (Prasad, 2011). A nivel industrial, una de las enzimas más usadas es la alfa – amilasa constituyendo alrededor de un 25% del mercado enzimático industrial (Rajagopalan & Krishnan, 2008) y cuya función es hidrolizar las moléculas de almidón generando productos de bajo peso molecular como la maltosa, glucosa y unidades de maltotriosa. En la industria alimenticia se usan en elaboración de cerveza, zumos de frutas, jarabes de almidón, panificación y pretratamiento de piensos (Gurung, Ray, Bose, & Rai, 2013).

Las alfa – amilasas pueden obtenerse de diversas fuentes como animales, plantas y microorganismos (MO); pero se consideran las amilasas microbianas las más capaces de cumplir los requisitos industriales (Pandey, y otros, 2000). Los mecanismos de acción y propiedades de estas enzimas dependen de las variaciones en su producción y de los microorganismos que sean empleados (Muralikrishna & Nirmala, 2005). Algunos factores importantes que podrían afectar o mejorar el rendimiento son: A) pH óptimo de la alfa – amilasa proveniente de *B. amyloliquefaciens* se encuentra entre 6.0 – 7.0 (Nusrat & Rahman, 2007). B) Las amilasas bacterianas provenientes de *Bacillus* se producen en un amplio rango de temperaturas (37 – 60 °C) (Mendu y otros, 2005). C) Se ha demostrado que *B. amyloliquefaciens* usa el calcio para producir altos niveles de alfa – amilasa (Zhao y otros, 2011). D) El nitrógeno influye en gran medida a la producción de la enzima y el extracto de levadura es uno de los más utilizados (McMahon, Kelly, & Fogarty, 1999), también glicina la cual, en el caso de *B. amyloliquefaciens*, aumenta la producción de alfa – amilasa y también ayuda a controlar el pH (Zhang, Tsukagoshi, Miyashiro, & Udaka, 1983).

El uso de MO en la producción de enzimas recombinantes tiene importantes ventajas, como es la facilidad de manipulación para obtener enzimas con características deseadas y en gran escala.

Las alfa – amilasas de origen bacteriano son producidas especialmente por el género *Bacillus*, en especies como: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. stearothermophilus*. Estas bacterias son productoras de alfa – amilasas resistentes a un amplio rango de temperatura (25 - 90 °C) y a valores extremos de pH (1.0 - 11.5) (Abd-Elhalem B. et al, 2015). Así mismo, usar *Escherichia coli* como organismo huésped tiene ventajas como el gran conocimiento de su genoma, fisiología, metabolismo y características moleculares. Adicionalmente, se cuenta con muchas herramientas para su manipulación genética y, gracias a su rápido crecimiento, permite la producción de grandes cantidades de enzimas (Lara, 2011).

La producción de enzimas recombinantes consiste en la clonación de un fragmento del ADN de interés, y este pueda ser replicado y expresado en bacterias o levaduras. En este trabajo se utilizó el método In-Fusion que se basa en el apareamiento de los extremos complementarios de un inserto el cual se amplifica por PCR y un vector digerido con enzimas de restricción, dando como resultado una recombinación en los extremos de los ADN (Zhu et al, 2018). Se seleccionó los plásmidos pET15b y pET28a, debido a que, pET15b confiere a la bacteria resistencia a ampicilina y pET28a resistencia a kanamicina. Además, ambos plásmidos nos ayudarán a expresar el gen de alfa – amilasa de forma inducible por el operador Lac en el cassette de expresión (Raman & Martín, 2014), debido a que en el genoma de *E. coli* se encuentra una copia del gen que codifica para LacI la cual es una proteína que se une al operador Lac y reprime la expresión de los genes. Obtenidos los extremos homólogos se combina el vector con el inserto con la mezcla de enzimas de In-Fusion, que permiten la hibridación de nucleótidos sin la necesidad de ligasa, polimerasa o añadir más nucleótidos. La reacción toma 15 minutos y tiene una eficacia de un 95% debido a que, sin ligasa, el vector vacío no se cierra por sí mismo (Raman & Martín, 2014).

Para inducir la expresión se usa isopropil- D- tiogalactopiranosido (IPTG) (Hannig & Makrides, 1998), la cual se une a LacI para liberarlo del operador lac, dejando el paso libre para que ARN polimerasa lleve a cabo la transcripción (Calos, 1978).

La alfa – amilasa de *B. amyloliquefaciens* puede ser una enzima extracelular (Burhan, y otros, 2003), debido a que los péptidos señal de proteínas del género *Bacillus* son fácilmente reconocidas por la maquinaria celular de *E. coli* exportando de manera eficiente las proteínas al medio celular (Yamabhai, y otros, 2008). Esto es una ventaja debido a que necesita menos pasos como es el caso de la sonicación o cualquier mecanismo de rompimiento de paredes celulares para poder obtener la enzima intracelular. Por otro lado, la purificación depende del mercado, costo, calidad y tecnología. Cuando se tiene una enzima extracelular se realiza una precipitación utilizando disolventes orgánicos como etanol, acetona y sulfato de amonio seguido de diálisis (Khoo et al, 1994); y para aumentar el grado de pureza tanto de enzima extracelular como intracelular se realiza con cromatografía de intercambio iónico, adsorción por afinidad o de lecho expandido (Amritkar et al , 2004).

Finalmente, la actividad enzimática se realiza mediante ensayos cualitativos y cuantitativos. Los ensayos cualitativos se basan en la reacción entre almidón y yodo que al mezclarse forman un complejo azul, y al hidrolizar el almidón cambia a marrón rojizo (Gupta et al, 2003). Algunos ensayos cuantitativos que se pueden mencionar: a) Incubación de la enzima con almidón soluble y tampón de glicina-NaOH, mide la actividad mediante espectrofotometría y se define como la cantidad de enzima que libera 1 mmol de azúcares reductores por minuto (Ashabil et al, 2008). b) Incubación de almidón soluble al 1%, tampón citrato, extracto enzimático, se adiciona HCl 0,1 N y finalmente yodo (Quintero et al, 2010).

Teniendo en cuenta las ventajas que presenta la producción recombinante de enzimas y la importancia de la alfa – amilasa en la industria, el objetivo de este trabajo fue clonar la alfa – amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* para llevar a cabo su producción de manera recombinante en *Escherichia coli*. Además, se determinará su potencial aplicabilidad en la industria de los alimentos a partir de una revisión bibliográfica.

## CAPITULO I: MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1. Crecimiento de *Bacillus amyloliquefaciens*

Se creció *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM7-0318-001, DSMZ Leibniz.Institut, Alemania) que se encontraba almacenada en crioviales con crioperlas que conservan a los microorganismos dentro de ellas. Se inoculó en cajas Petri con agar nutritivo por 24 h a 30 °C. Una vez obtenidas colonias, algunas de estas se picaron y se colocaron en tubos que contenían caldo nutritivo dejándolos crecer a 30 °C por 24 h con agitación de 180 rpm. Pasado ese tiempo se formó pellets mediante centrifugación a 10,000 x g por 5 min descartando el líquido sobrante y se los almacenó en congelación.

### 1.2. Preparación del constructo para la producción recombinante de la alfa – amilasa

#### 1.2.1. Extracción de ADN genómico

Se extrajo el ADN genómico de *Bacillus amyloliquefaciens* con el uso del PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™) basándose en el protocolo propuesto por el fabricante con algunas modificaciones. Se resuspendió el pellet en 180 µL de Buffer de digestión genómica. Se agregó 30 µL de lisozima y se dejó incubando por 1 h 30 min a 37 °C. Después se agregó 25 µL de Proteinasa K para lisar las células; se mezcló bien mediante vortex y se incubó a 55 °C por 2 h. Se agregó 20 µL RNasa A, se mezcló nuevamente con el vortex y se incubó por 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 255 µL de Buffer lisis/unión genómica y se mezcló bien hasta obtener una solución homogénea, a continuación, se agregó 255 µL de etanol al 97% y se mezcló con el vortex durante 5 segundos. Seguidamente se tomó un tubo de recolección del kit y se colocó dentro del mismo una columna de centrifugado PureLink® y se agregó el lisado preparado anteriormente dentro de la columna de centrifugado PureLink® y se centrifugó a 10,000 x g por 1 min a temperatura ambiente. Se descartó el tubo de recolección y se colocó uno nuevo. El lavado se realizó como lo propone el fabricante. Finalmente, la elución se realizó agregando 30 µL del buffer de elución.

#### 1.2.2. PCR con ADN de *Bacillus amyloliquefaciens*

El ADN genómico obtenido se utilizó como molde para realizar una PCR con el objetivo de amplificar la región codificante, del gen de alfa – amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, la cual tiene un tamaño de alrededor de 1545 pb. Para obtener extremos homólogos en la amplificación del gen de alfa – amilasa, y que se unan a los extremos de los plásmidos pET15b y pET28a previamente cortados con enzimas de restricción, se diseñaron dos pares de primers específicos para cada uno de ellos. Los primers para la clonación del gen de alfa – amilasa (AAM) en el plásmido pET15b fueron pET15AAM SP-F

(5'AGGAGATATACCATGATGATTCAAAAACGAAAGCGG 3') y pET15AAM SP-R (5'GTTAGCAGCCGGATCTTATTTCTGAACATAAATGGAGACG 3'). Para el plásmido pET28a se usó los primers pET28AAM SP-F (5' AGGAGATATACCATGATGATTCAAAAACGAAAGCGG 3') y pET28AAM SP-R (5' GGTGGTGGTGCTCGAGTTTCTGAACATAAATGGAGACGG 3'). Lo subrayado representa la secuencia homóloga al sitio de inserción en los plásmidos. Para la amplificación de AAM para su clonación en pET15 y pET28 se usó la enzima Phusion DNA polimerasa (Thermo Scientific) en una reacción de 50 µl, preparada de la siguiente manera: 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM de cada primers (pET15AAM SP-F y pET15AAM SP-R para clonar en pET15b; pET28AAM SP-F y pET28AAM SP-R para clonar en pET28a), 5 µL del ADN molde, 1x Phusion Buffer, 0,5 µL de Phusion DNA pol y 20 µL de agua.

El programa en el termociclador para la reacción de PCR fue como se describe a continuación. Un paso de desnaturalización inicial de 30 segundos a 98 °C, seguido de 35 ciclos con una desnaturalización por 10 segundos a 98 °C, alineamiento por 30 segundos a 60 °C y extensión por 1 minuto a 72 °C. Finalmente se realizó una extensión final por 5 minutos a 72 °C y su almacenamiento a 4 °C. La amplificación resultante fue sometida a un gel de electroforesis de agarosa al 1% para interpretar los resultados obtenidos.

### 1.2.3. Clonación molecular y reacción de amplificación mediante PCR

Los productos de PCR del paso 1.2.2. se clonaron en los plásmidos, pET15b y pET28a mediante el sistema In-Fusion. Estos plásmidos se analizaron mediante herramientas bioinformáticas para obtener sus mapas de restricción y así conocer que fragmentos de ADN se debería obtener con ciertas enzimas de restricción (anexo 1, 2, 3 y 4). Linealizar los plásmidos con enzimas de restricción es necesario para generar los extremos homólogos compatibles con los productos de PCR generados según se describe en la sección 1.2.2.

Para el plásmido pET15b con un tamaño de 5708 bp, se usó las enzimas NcoI y BamHI (Thermo Scientific) las cuales cortan en las posiciones 389 pb y 319 pb respectivamente. Por otro lado, el plásmido pET28a con un tamaño de 5369 bp se digirió con NcoI y XhoI (Thermo Scientific) que cortan en las posiciones 296 pb y 158 pb respectivamente.

La reacción de clonación In-Fusion se llevó a cabo en un volumen total de 10 µL como se describe a continuación. Para clonar AAM en pET15b: 1,5 µL de producto de PCR de alfa – amilasa, 3,4 µL de plásmido digerido (linealizado) con las enzimas de restricción, 2 µL de 5x InFusion HD, 3,1 µL de agua ultra pura. Para clonar AAM en pET28a: 1,5 µL de producto de PCR de alfa – amilasa, 2,8 µL de plásmido digerido (linealizado) con las enzimas de restricción, 2 µL de 5x InFusion HD, 3,7 µL de agua ultra pura. En ambos casos la incubación fue a 50 °C durante 15 minutos.



### 1.2.3.1. Transformación de *Escherichia coli*

Los productos clonados fueron utilizados para llevar a cabo una transformación la cual se basa en la aplicación de calor abriendo los poros en la membrana bacteriana permitiendo el ingreso de los plásmidos y posteriormente los poros se cierran aplicando frío. Se usaron dos cepas competentes de *Escherichia coli* diseñadas con distintos propósitos como se explica más abajo. Primeramente, se transformó cepas de *E. coli* TOP10 la cual tiene una gran eficiencia en la transformación permitiendo una réplica estable de plásmidos con un alto número de copias y se busca esta estabilidad debido a que nos ayuda a evitar mutaciones en el proceso (Thermo Fisher Scientific, 2006). Comprobado que se tenía los clones correctos, se procedió a utilizar estos para transformar la cepa OverExpress™ C41 (DE3) de *Escherichia coli* (BL21) debido a que las células competentes TOP 10 no posee la función de expresar y las C41 si están diseñadas para expresar proteínas (Merck, 2020).

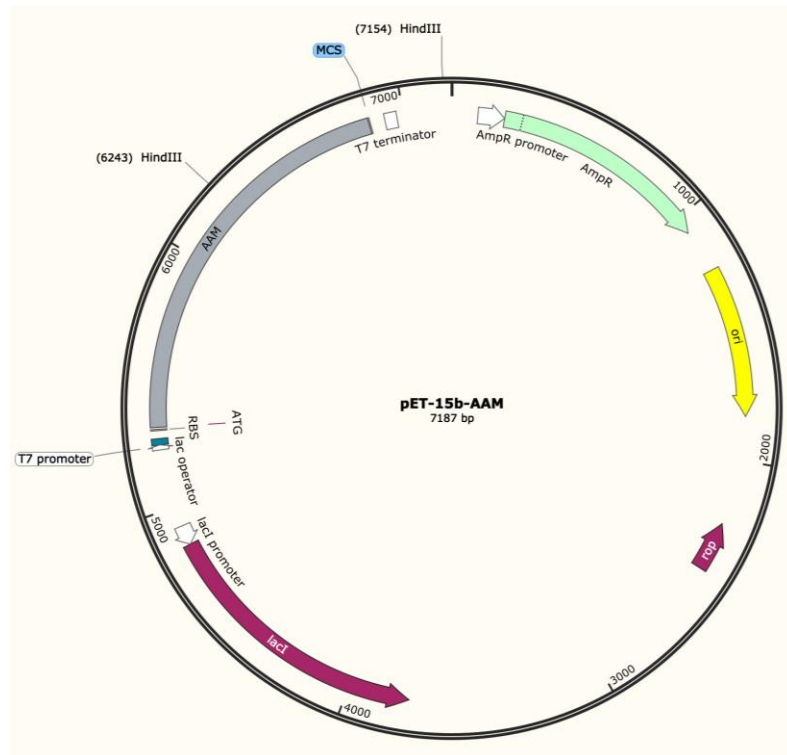
El procedimiento de transformación es como sigue: se descongeló las células competentes TOP10 debido a que se encontraban almacenadas a -80°C y se subió la temperatura con hielo y posteriormente se agregó 2,5 µL de la reacción In-Fusión. Se incubó en hielo por 15 minutos, se aplicó un shock térmico durante 30 segundos a 42°C e inmediatamente se colocó en hielo. Más adelante, se inoculó la mezcla en tubos de ensayo que contenían caldo LB por 1 h a 37 °C con agitación de 200 rpm. Finalmente, se retiró de la incubadora y se sembró en cajas Petri con antibiótico, para el plásmido pET15b se colocó ampicilina y para el pET28a se colocó kanamicina. Se sembró con 3 volúmenes diferentes (50 µL, 150 µL y 300 µL) debido a que si la transformación fue eficiente debe de haber muchas colonias en 300 µL y se verá mejor con un volumen menor como 50 o 150 µL; sin embargo, si no fue eficiente las colonias deben aparecer a 300 µL. Se incubaron las placas a 37 °C por 24 h para permitir el crecimiento de las bacterias que han incorporado el plásmido. Trascorrido este tiempo se picaron colonias de las placas incubadas y se puso a crecer en tubos de ensayo con caldo LB y antibiótico a 37 °C con agitación de 180 rpm por 24 h. A partir de los tubos en los que se observó crecimiento se formaron pellets mediante centrifugación a 10,000 rpm por 5 min, descartando el líquido sobrenadante. Se realizó una miniprep con el S.N.A.P miniprep kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante a excepción de la elución que se realizó con 40 µL de buffer de elución y se guardó en congelación.

Para comprobar que la transformación funcionó y se tiene los plásmidos correctos dentro de *E. coli*, se analizó este ADN mediante una digestión con las enzimas de restricción Hind-III y XbaI (Thermo Fisher Scientific) y con Buffer Tango. Las enzimas de restricción se seleccionaron dependiendo de en qué parte de la secuencia cortan, obteniendo así un corte en el plásmido y otro en el inserto, es por ello que después de cortar con enzimas de restricción posterior a las transformaciones si no generan 2 bandas es porque no se encontraba el inserto en su interior. La incubación fue a 37 °C por 2 h y pasado ese tiempo se corrió un gel de electroforesis a 120 voltios por 45 min para comprobar que los fragmentos corresponden a los esperados. Una vez

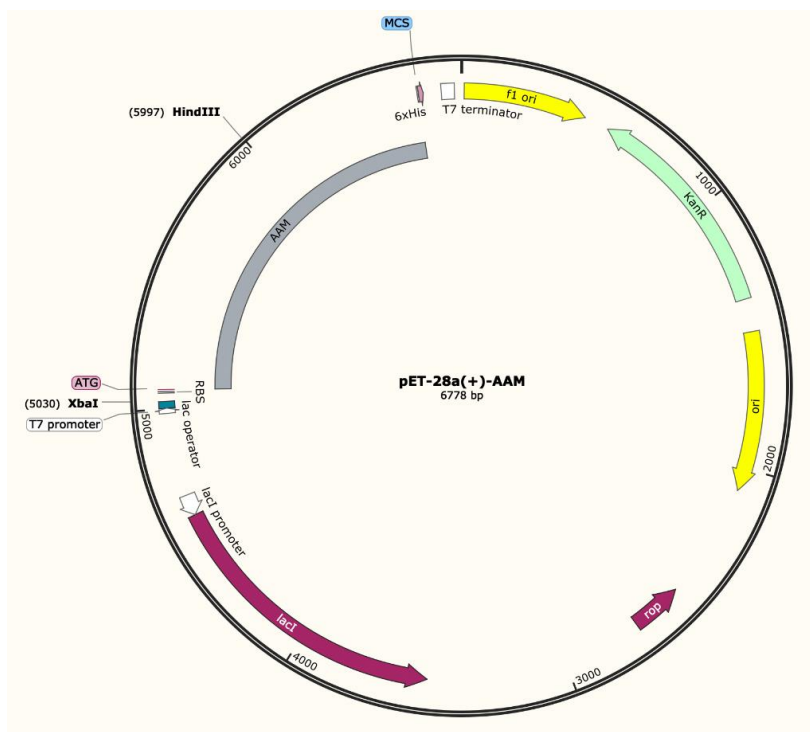
analizadas las colonias mediante la digestión y haber seleccionado las que tuvieron una clonación exitosa se enviaron a secuenciar para su posterior comparación con la secuencia de alfa –amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* depositada en la base de datos de ADN del GenBank. Finalmente, se procedió a la segunda transformación con las células competentes OverExpress™ C41 (DE3). Se usó el mismo protocolo y la digestión fue con las mismas enzimas para asegurar que los plásmidos introducidos en esta cepa son los correctos.

### 1.2.3.2. Secuenciación y análisis de secuencias

Después de la primera transformación y habiendo seleccionado dos colonias de cada plásmido se envió a secuenciar el inserto (AAM) de cada plásmido para su comparación con la secuencia disponible en el GenBank del gen clonado. Los plásmidos seleccionados se analizaron mediante un programa llamado SnapGene en donde se puede visualizar el tamaño de cada uno con el inserto en su interior. En la figura 1 se observa el plásmido pET15b-AAM y sus sitios de corte con la enzima de restricción y en la figura 2 se observa el plásmido pET28a-AAM de igual forma con sus sitios de corte con las enzimas de restricción. En la figura 1 el sitio etiquetado como “HindIII” representa los sitios de restricción para esta enzima de restricción en el plásmido y en la figura 2 se encuentran “HindIII” y “XbaI”.



**Figura 1.** Plásmido posterior a la clonación de pET15b-AAM con su tamaño y sitios de corte con la enzima de restricción HindIII



**Figura 2.** Plásmido posterior a la clonación de pET28a-AAM con su tamaño y sitios de corte con las enzimas de restricción HindIII y XbaI

La secuencia teórica tanto de ADN como de aminoácidos del gen de alfa – amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* se puede encontrar en bases de datos. Estas secuencias se bajaron y se utilizaron para compararlas con la secuenciación obtenida a partir de los clones generados en este trabajo. De los 4 clones se secuenció ambas hebras de ADN (Forward y Reverse) y mediante el programa de CAP3 (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>) se formó una sola secuencia la cual posteriormente se comparó con la secuencia de la base de datos mediante el programa de MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Por otra parte, se usó la aplicación Translate de ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) para conseguir la traducción del ADN, es decir, la secuencia de la proteína que este codifica. Con esto fue posible comparar la secuencia de proteína teórica de alfa – amilasa (obtenida de bases de datos) con la secuencia de proteína codificada por el gen clonado en este trabajo. La comparación se realizó con el programa MultAlin.

### 1.3. Análisis de ADN mediante electroforesis y cuantificación espectrofotométrica

Los análisis de ADN se llevaron a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer tris-acetato-EDTA (TAE)1X y teñidos con SYBR Safe (Invitrogen). Para la estimación de tamaño de las bandas se usó Ladder 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific) y las muestras se mezclaron con buffer de carga 6X (Thermo Scientific™) y se llevó a cabo la corrida en el equipo de Owl™ EasyCast™ B2 Mini Gel Electrophoresis Systems (Thermo Fisher Scientific) acoplado a una fuente de poder (PowerPac™ 200; BioRad) a 110 voltios por 35 minutos.

El ADN se cuantificó con el Espectrofotómetro para Microplacas Epoch™ midiendo la absorbancia a 260nm y se determinó la contaminación con proteínas mediante la relación de absorbancia 260nm/280nm. Este equipo se encuentra unido al software Gen5 el cual facilita la cuantificación, haciéndola más precisa. Se colocó como blanco 2 µL del buffer de elución que se utilizó en la extracción de ADN, y 2 µL de muestra con una réplica cada una.

#### **1.4. Inducción de la expresión de alfa – amilasa**

Con las células competentes OverExpress™ C41 (DE3) confirmadas respecto al plásmido que contiene clonado el gen de alfa – amilasa, se procedió a la inducción de la producción de proteínas según Demirkan et al., (2004) usando IPTG. Primero, se preparó un pre-cultivo mediante incubación de las cepas transformadas con pET15b-AAM y con pET28a-AAM, y con un control negativo que corresponde a bacterias transformadas que contiene el plásmido pET28 laccasa (una enzima que no tiene actividad sobre el almidón). El cultivo se realizó, en tubos de ensayo con 5 ml de caldo LB y antibiótico (ampicilina o kanamicina para pET15b o pET28a, respectivamente) a 37 °C con agitación a 180 rpm por 18 - 24 h. Después, los 5 ml de pre-cultivo se añadieron a matraces Erlenmeyer previamente esterilizados que contenían 20 ml de caldo LB más antibiótico según corresponda, CaCl<sub>2</sub> (0,005%) y 5 mg/ml glicina, y se reguló el pH a 7.0 controlando periódicamente que su pH no baje de 6.5 ni suba de 7.0. Se los dejó incubando a 37 °C con agitación a 200 rpm por 3 h hasta que la absorbancia medida a 600 nm sea de mínimo 0,6. En este punto, se agregó 1 mM de IPTG a algunos matraces y a otros no se les añadió para contar con un control sin inducción. Después de la inducción se incubó los matraces por 48 h a 18 °C con agitación de 180 rpm. Pasado ese tiempo las células se recolectaron por centrifugación a 10,000 x g por 3 min usando una centrifugadora (Eppendorf, modelo 5804), y se separaron tanto los sobrenadantes como los pellets. Los pellets se resuspendieron con 3 ml de buffer fosfato de sodio (0,1 M) a pH 7.0 y luego se lisaron las células para liberar las proteínas citoplasmáticas con el sonicador Q125 (Qsonica) con unas condiciones de intensidad del 50% por 20 segundos y pausa de 20 segundos durante 2 min y finalmente se centrifugaron a 10,000 x g por 3 min.

#### **1.5. Precipitación de proteínas**

Para lograr la precipitación de las proteínas presentes en los sobrenadantes de las bacterias transformadas con pET15b-AAM y pET28a-AAM e inducidas según lo previamente descrito (1.4), se saturó la solución con sulfato de amonio al 80%, manteniendo las muestras a 4°C. La recolección de las proteínas precipitadas se realizó mediante centrifugación a 10,000 x g por 3 minutos eliminando el sobrenadante y manteniendo el pellet. Después de la centrifugación se resuspendió el pellet con buffer fosfato de sodio (0,1 M) a pH 7.0 y se realizó una diálisis con este mismo buffer durante 16 - 20 h con agitación a 10 °C y con una humedad relativa del 71% para de esta manera disminuir las sales que se quedaron de la precipitación previa.

### **1.6. Determinación de la actividad enzimática**

Para conocer si existe producción de actividad alfa – amilasa y determinar si esta tiene actividad se realizaron ensayos cualitativos los cuales se basan en la hidrólisis de almidón por acción de la enzima. Se realizaron dos pruebas; una en líquido y otra en sólido. Para la prueba líquida se mezcló 0,5 g de almidón y 50 ml de agua, que previa ebullición, se dejó enfriar hasta una temperatura media; posteriormente se colocó 100 µl de yodo, formando un color azul marino. Finalmente se colocó 500 µl de la muestra con alfa – amilasa y se observó la pérdida del color azul la cual nos muestra que sí hay actividad alfa – amilasa. Por otro lado, la prueba sólida, se realizó mediante placas Petri preparadas con agar LB suplementadas con 2% de almidón. En el agar se realizaron pocillos por duplicado (teniendo máximo 6 muestras por placa); se colocaron 30 µl de la muestra con alfa – amilasa y se incubó entre 16 - 20 h a 37 °C. Pasado ese tiempo se colocó 5 ml de yodo en cada placa, observándose posteriormente la presencia de halos decolorados a los alrededores de los pocillos lo cual nos muestra la presencia de actividad. Como control negativo se usaron las cepas de *Escherichia coli* productoras de la enzima Laccasa.

### **1.7. Gel de proteínas**

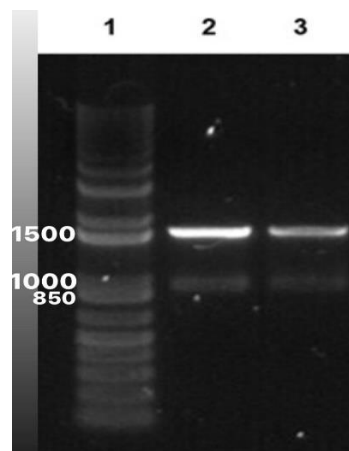
Se realizaron geles de electroforesis de proteínas SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Thermo Scientific) para comprobar si la proteína se encuentra en el sobrenadante (extracelular), o dentro del pellet (intracelular). En cada pocillo se colocó 40 µg de proteína totales de cada una de las muestras (sobrenadantes y pellets), cuya concentración fue previamente determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para teñir el gel se usó una preparación con 45% de etanol, 9,2% de ácido acético glacial, 46% de agua destilada y 0.025% de commasie brilliant blue G-250 (Thermo Scientific) colocando el gel por 1 h a 37 °C y con agitación de 180 rpm. Posteriormente se realizó el desteñido con 10% de ácido acético glacial y 90% de agua con agitación de 100 rpm durante 24 h.

## CAPITULO II: RESULTADOS

### 2.1. Extracción de ADN genómico de *Bacillus amyloliquefaciens*

Se extrajo el ADN cromosómico de *Bacillus amyloliquefaciens*, y mediante la clonación de ADN de *B. amyloliquefaciens* en los plásmidos pET15b y pET28a los cuales promovieron la expresión de la enzima alfa – amilasa, mediante el operador Lac presente en cada uno de ellos. En la bacteria *Escherichia coli* se pueda producir y expresar esta enzima.

Se realizó una reacción de PCR para dicho gen con Primer F (10  $\mu$ M) y Primer R (10  $\mu$ M), cuyo tamaño esperado es de 1545pb. En el gel de electroforesis de la figura 3 se puede observar que el tamaño del producto de PCR obtenido se ajusta a lo esperado.

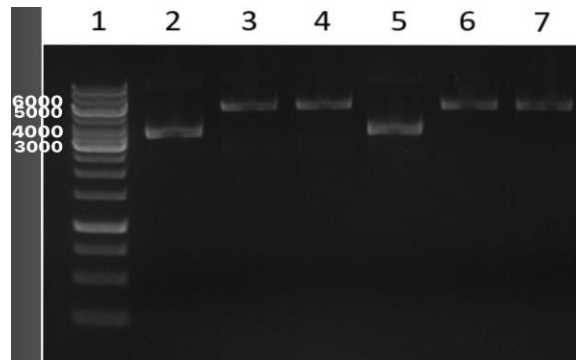


**Figura 3.** Gel de electroforesis de agarosa cargado con las reacciones de PCR para el gen que codifica la enzima alfa amilasa: 1) Marcador de peso 1Kb Plus (Invitrogen) 2) Producto de PCR del ADN de *Bacillus amyloliquefaciens*, 3) Producto de PCR por duplicado del gen de ADN de *Bacillus amyloliquefaciens*.

### 2.2. Digestión de plásmidos y amplificación de la alfa – amilasa

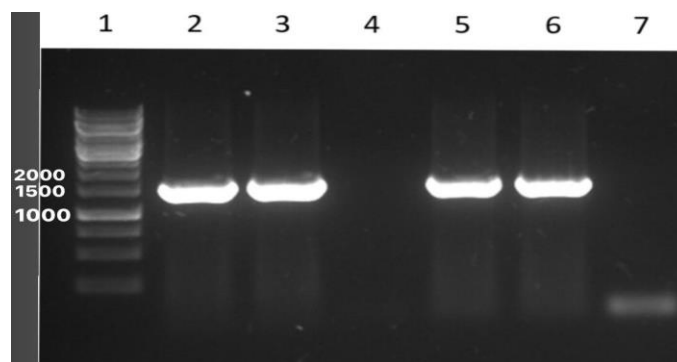
La digestión se llevó a cabo experimentalmente y como se puede observar en la figura 4 (pocillos 3 y 4) se obtuvo bandas del tamaño esperado. No obstante, cabe recalcar que solo se aprecia la banda de 5638pb ya que el otro fragmento (70pb) es muy pequeño para ser detectado con el tipo de electroforesis realizada. En el pocillo 2 que se encuentra el plásmido pET15b sin digerir, el cual presenta un tamaño aparentemente menor respecto al plásmido digerido. Esto se explica por el súper enrollamiento de los plásmidos no digeridos que, al estar en una estructura muy compacta, poseen un tamaño aparentemente menor en comparación a un plásmido cortado que está en forma lineal y relajada. Para el plásmido pET28a los tamaños esperados después del corte con las enzimas de restricción NcoI y XhoI debería ser de 138 pb y 5231 pb. Como se puede observar en los pocillos 6 y 7 (Figura 4) se obtuvo las bandas del tamaño esperado, sin embargo,

la banda de 138 pb no se puede observar por su tamaño tan pequeño, pero la banda alrededor de 5231 pb se aprecia fácilmente.



**Figura 4.** Gel de electroforesis de agarosa cargado con los plásmidos digeridos con enzimas de restricción: 1) Marcador de peso 1KB (Thermo Scientific™) 2) Plásmido pET15b sin digerir, 3) Plásmido pET15b digerido con NcoI y BamHI, 4) Plásmido pET15b digerido con NcoI y BamHI (réplica), 5) Plásmido pET28a sin digerir, 6) Plásmido pET28a digerido con NcoI y XhoI, 7) Plásmido pET28a digerido con NcoI y XhoI (réplica).

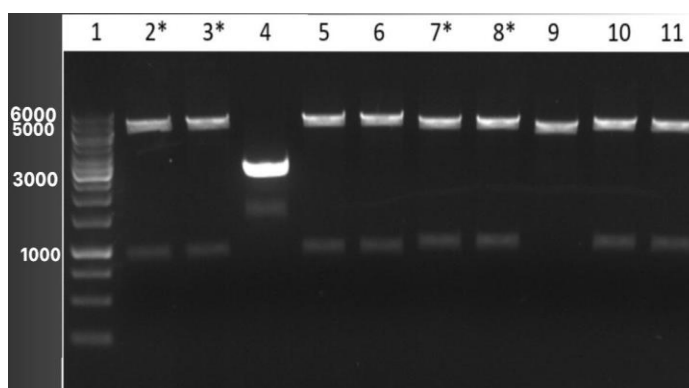
Por otro lado, la amplificación del gen de alfa – amilasa con los primers adecuados para obtener los extremos homólogos permitieron su inserción en los plásmidos pET15b y pET28a. Los productos de PCR obtenidos anteriormente los cuales se usaron como molde ADN genómico extraído de *Bacillus amyloliquefaciens*, mostraron un tamaño ligeramente superior a 1500 pb (Figura 5), lo que se ajusta muy bien a los 1545 pb que se esperaba según el tamaño reportado para el gen de alfa – amilasa de *B. amyloliquefaciens* (AAM).



**Figura 5.** Gel de electroforesis de agarosa cargado con los productos de PCR de AAM: 1) Marcador de peso 1Kb (Thermo Scientific™), 2) PCR de AAM para clonación en pET15b, 3) PCR de AAM para clonación en pET15b (réplica), 4) PCR de AAM para clonación en pET15b (blanco sin ADN), 5) PCR de AAM para clonación en pET28a, 6) PCR de AAM para clonación en pET28a (réplica), 7) PCR de AAM para clonación en pET28a (blanco sin ADN).

### 2.3. Clonación del gen de alfa – amilasa y transformación de cepas de *E. coli*

Se tomaron 5 colonias de cada plásmido crecidas en cajas Petri después de la clonación y transformación; se extrajo su ADN plasmídico mediante MiniPrep y los plásmidos con el inserto de AAM se sometieron a un análisis con enzimas de restricción. Al plásmido pET15b-AAM se lo cortó con HindIII debido a que esta enzima corta tanto al plásmido como al gen de alfa – amilasa que se encuentra en su interior. El tamaño del inserto con el vector es de 7187 pb y con los cortes con la enzima se forman dos fragmentos de 911 pb y 6276 pb aproximadamente. Por otro lado, al pET28a-AAM se lo cortó con XbaI y HindIII debido a que la enzima XbaI corta en el plásmido y la enzima HindIII corta en el inserto. El tamaño del inserto con el vector es de 6778 pb y al cortarse forma dos fragmentos de 967 pb y 5811pb aproximadamente. Como se puede observar en la figura 6, la clonación del gen de alfa – amilasa en ambos plásmidos fue exitosa ya que se obtuvo clones con los tamaños esperados. Se seleccionaron los clones de los carriles 2 y 3 para pET15b-AAM y los clones de los carriles 7 y 8 para pET28a-AAM (Figura 6), para secuenciar el gen de alfa – amilasa insertado.



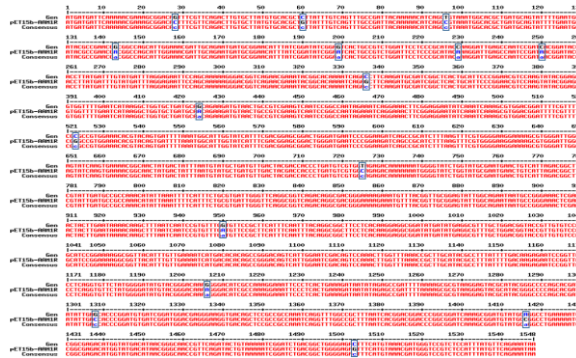
**Figura 6.** Análisis mediante digestión con enzimas de restricción de los plásmidos aislados desde cepas TOP10 de *E. coli*. Las muestras en cada carril son: 1) Marcador de peso 1Kb (Thermo Scientific™), 2-6) pET15b-AAM de cinco colonias independientes y digerido con HindIII, 7-11) pET28a-AAM obtenido de cinco colonias independientes y digerido con XbaI+HindIII.

#### 2.3.1. Secuenciación

Posterior a la primera transformación se secuenciaron los insertos de los plásmidos de dos colonias tanto del pET15b-AAM como del pET28a-AAM, para comparar con la secuencia de la enzima alfa – amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* publicada en las bases de datos del GenBank. Esto para comprobar que durante la clonación no se produjo mutaciones en la secuencia del gen de alfa – amilasa. La comparación de las secuencias de ADN se realizó mediante el programa de MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), el cual nos presenta una imagen con ambas secuencias y sus diferencias en color azul como se observa en las figuras

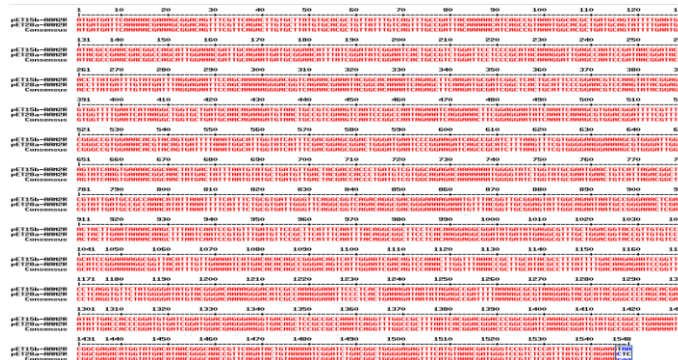


7 y 8. Las diferencias y similitudes entre la secuencia del gen alfa – amilasa y los clones de pET15b-AAM se pueden observar en la figura 7. El análisis de la secuencia nos revela que ambos clones tienen una alta semejanza con alfa – amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* obtenida de la base de datos (AAM-BD). Se obtuvo una diferencia de 16 nucleótidos en el clon 1 (figura 7) y de 15 nucleótidos en el clon 2. Por otra parte, se compararon también entre los dos clones de pET15b-AAM que dio como resultado una diferencia de 1 nucleótido.



**Figura 7.** Comparación de la secuencia de ADN del clon 1 de pET15b-AAM con la secuencia de AAM-BD. Los rectángulos azules muestran los lugares que tienen los nucleótidos diferentes.

Al comparar la secuencia del gen de alfa – amilasa clonado en pET28 con la secuencia de alfa – amilasa obtenida desde bases de datos, se observó también diferencias en algunos nucleótidos. Para descartar que las diferencias obtenidas sean producto de mutaciones durante el proceso de clonación, se procedió a la comparación de las secuencias obtenidas para los insertos en pET15b-AAM y pET28a-AAM. Al tratarse de insertos que se obtuvieron a partir de reacciones independientes de PCR, se esperaba que, si las secuencias son idénticas, entonces las diferencias observadas con la secuencia obtenida de la base de datos no se deben a mutaciones, sino que más bien el gen de alfa – amilasa clonado proviene probablemente de una cepa distinta de *Bacillus amyloliquefaciens*.



**Figura 8.** Comparación de la secuencia de ADN del clon 2 de pET15b-AAM con la secuencia del clon 2 de pET28a-AAM. Los rectángulos azules muestran los lugares que tienen los nucleótidos diferentes.

La comparación entre los clones de pET28a-AAM y pET15b-AAM muestra que no existen diferencias en la región codificante (figura 8). Solo hay variaciones de nucleótidos en el último codón, lo cual fue de hecho parte del diseño para clonar el gen en uno y otro plásmido. En la tabla 1 se encuentran las diferencias entre el gen alfa – amilasa obtenido del GenBank y la secuencia del gen de alfa – amilasa clonado en el plásmido pET15b. Se puede observar que hay las mismas diferencias con ambos clones a excepción del primero (\*), el cual solo se encuentra en el clon 1. En la tabla 2 se encuentran las diferencias con el plásmido pET28a, teniendo las mismas diferencias en ambos clones.

**Tabla 1.** Diferencias de nucleótidos de las secuencias de alfa – amilasa en el plásmido pET15b.

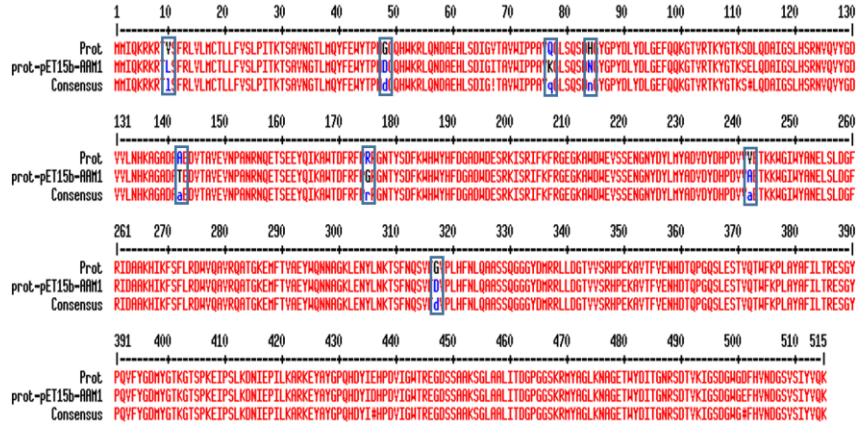
Clon	Plásmido	Diferencia de nucleótidos	Posición
1 y 2	pET15b-AAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• G y C</li> <li>• C y G</li> <li>• T y C</li> <li>• G y A</li> <li>• G y A</li> <li>• C y A</li> <li>• C y A</li> <li>• C y G</li> <li>• G y A</li> <li>• C y G</li> <li>• T y C</li> <li>• G y A</li> <li>• G y A</li> <li>• G y C</li> <li>• A y C</li> <li>• C y G</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 28*</li> <li>• 60</li> <li>• 96</li> <li>• 143</li> <li>• 199</li> <li>• 229</li> <li>• 250</li> <li>• 336</li> <li>• 424</li> <li>• 523</li> <li>• 725</li> <li>• 950</li> <li>• 1206</li> <li>• 1308</li> <li>• 1416</li> <li>• 1503</li> </ul>
	Entre clones de pET15b-AAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C y G</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 28</li> </ul>

**Tabla 2.** Diferencias de nucleótidos de las secuencias de alfa – amilasa en el plásmido pET28a.

	Entre clones de pET28a-AAM	No hay diferencias	
1 y 2	pET28a-AAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• C y G</li> <li>• T y C</li> <li>• G y A</li> <li>• G y A</li> <li>• C y A</li> <li>• C y A</li> <li>• C y G</li> <li>• G y A</li> <li>• C y G</li> <li>• T y C</li> <li>• G y A</li> <li>• G y A</li> <li>• G y C</li> <li>• A y C</li> <li>• C y G</li> <li>• T y C</li> <li>• A y T</li> <li>• A y C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 60</li> <li>• 96</li> <li>• 143</li> <li>• 199</li> <li>• 229</li> <li>• 250</li> <li>• 336</li> <li>• 424</li> <li>• 523</li> <li>• 725</li> <li>• 950</li> <li>• 1206</li> <li>• 1308</li> <li>• 1416</li> <li>• 1503</li> <li>• 1546</li> <li>• 1547</li> <li>• 1548</li> </ul>

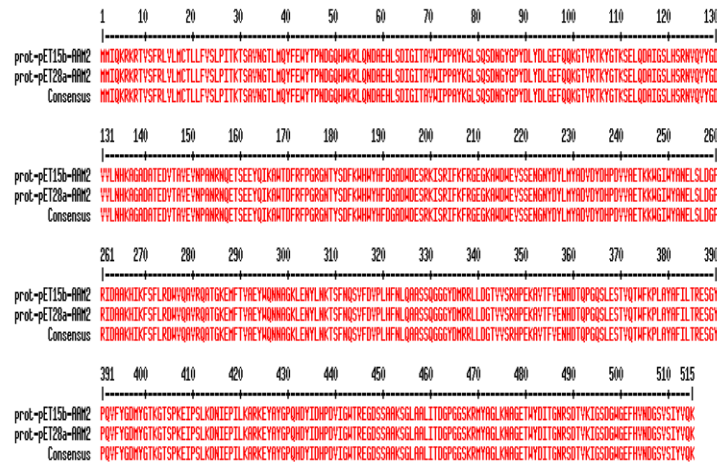
### 2.3.2. Comparación de secuencias de proteínas

En vista que se observaron diferencias a nivel de secuencias de ADN, se analizaron las secuencias de proteínas de ambos clones para evaluar si esto afecta a sus aminoácidos. Al comparar las secuencias de aminoácidos se puede analizar si existe diferencias. Específicamente el clon 1 de pET15b-AAM (prot-pET15b-AAM1) tiene 8 aminoácidos distintos (figura 9), mientras que el clon 2 muestra diferencias en 7 aminoácidos.



**Figura 9.** Comparación de la secuencia de proteína del clon 1 de pET15b-AAM con la secuencia de AAM-BD. Los rectángulos azules nos muestran los lugares que tienen los aminoácidos diferentes.

De igual forma al comparar las secuencias de proteínas del pET28a-AAM con la de AAM-BD; en ambos clones se encontraron 7 diferencias. Finalmente, cuando se comparó las secuencias de ambos vectores, se observó que hubo cambio solo en dos aminoácidos de los clones 1, pero en la comparación con los clones 2 no hubo ninguna diferencia, lográndose así determinar que los clones 2 tienen la secuencia correcta (figura 10).



**Figura 10.** Comparación de la secuencia de aminoácidos del clon 2 de pET15b-AAM con la secuencia del clon 2 de pET28a-AAM.

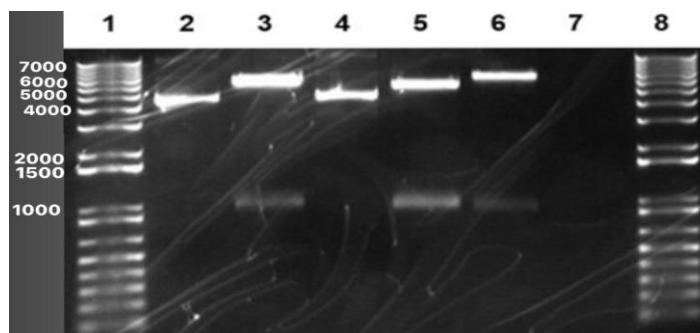
En la tabla 3, se presenta las diferencias de aminoácidos de las AAM clonadas con AAM-BD y sus distintas características. Las características de cada aminoácido se encuentran en el anexo 8. En la tabla se comparan los clones 2 de ambos plásmidos siendo estos iguales.

**Tabla 3.** Comparación de las secuencias de proteínas de cada vector con la alfa – amilasa del GenBank y características de los aminoácidos reemplazados.

Clon	Plásmido	Diferencia de aminoácidos	Posición	Diferencias de características
2	pET15b-AAM y pET28a-AAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>Glicina a Ácido aspártico</li> <li>Glutamina a Lisina</li> <li>Histidina a Asparagina</li> <li>Alanina a Treonina</li> <li>Arginina a Glicina</li> <li>Valina a Alanina</li> <li>Glicina a Ácido aspártico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>48</li> <li>77</li> <li>84</li> <li>142</li> <li>175</li> <li>242</li> <li>317</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Glicina es hidrofóbico, apolar y sin carga. Ácido aspártico es polar y carga negativa.</li> <li>Glutamina es no esencia, amida, sin carga. Lisina es esencial, dibásico, carga positiva.</li> <li>Histidina es esencial, dibásico, carga positiva. Asparagina es no esencia, amida, sin carga.</li> <li>Alanina no esencial, neutro, hidrofóbico, apolar. Treonina es esencial, hidroxiaminoácido, polar, sin carga.</li> <li>Arginina es dibásico, polar, carga positiva. Glicina es neutro, hidrofóbico, apolar, sin carga.</li> <li>Valina es esencial y Alanina es no esencial.</li> <li>Glicina es hidrofóbico, apolar y sin carga. Ácido aspártico es polar y carga negativa.</li> </ul>

### 2.3.3. Segunda transformación

Después de comprobar que la clonación y la primera transformación fue exitosa, se realizó la segunda transformación usando células competentes OverExpress™ C41 (DE3) y posteriormente se extrajo el ADN mediante miniprep. Se analizaron los plásmidos extraídos mediante digestión con HindIII (pET15b-AAM) y HindIII y XbaI (pET28a). El patrón de bandas obtenido demuestra que los clones son correctos (figura 11).



**Figura 11.** Análisis mediante digestión con enzimas de restricción de los plásmidos aislados desde cepas C41 de E. coli. Las muestras en cada carril son: 1. Ladder 1Kb Plus, 2. Plásmido pET28a sin digerir, 3. Digestión del plásmido pET28a con las enzimas HindIII y XbaI, 4. Plásmido pET15b sin digerir, 5. Digestión 1 del plásmido pET15b con la enzima HindIII, 6. Digestión 2 del plásmido pET15b con la enzima HindIII. 7. Blanco y 8. Ladder 1KB Plus.

### 2.4. Producción de la enzima y ensayos de actividad

La inducción de la expresión se realizó sobre cultivos de células OverExpress™ C41 (DE3) transformadas con ambos plásmidos mediante la adición de IPTG. También para mejorar su actividad enzimática se añadió cloruro de calcio al medio con el fin de aumentar la producción y la estabilidad de la enzima. Sin embargo, no se analizaron los cambios que tuvo el añadir glicina

y calcio al medio de cultivo, debido a que no se realizaron análisis sin añadir estos componentes. En los resultados de actividad enzimática que se presentan a continuación se puede observar una mayor actividad después de la inducción.

#### 2.4.1. Ensayos cualitativos de actividad alfa – amilasa

En el ensayo líquido, previo a añadir la enzima se puede apreciar el color azul oscuro que se forma al reaccionar el almidón con el yodo (anexo 5a). Se tienen distintas muestras las cuales a unas se las indujeron y a otras no. Así mismo, al centrifugar se obtuvo sobrenadantes y pellets. Al agregar la enzima del pellet inducido, sonificado y centrifugado, se observa un evidente cambio en la coloración (anexo 5b), demostrando que efectivamente se está detectando actividad alfa – amilasa en los extractos crudos. Sin embargo, no presenta tanta actividad en comparación con la enzima comercial que se encuentra en el anexo 5c. Cabe destacar que el ensayo se realizó por triplicado tanto para el pET15b-AAM como para el pET28a-AAM.

En la tabla 4 se puede observar un resumen de resultados de los ensayos realizados, teniendo un control negativo pET28a-LAC y un control positivo correspondiente a una enzima alfa – amilasa comercial. Para las bacterias transformadas con cada plásmido se realizó cuatro ensayos con sus diferentes productos los cuales fueron: a) el sobrenadante obtenido después de la inducción de la expresión, b) el sobrenadante obtenido sin inducción, c) sobrenadante concentrado mediante precipitación con sulfato de amonio al 80% y el cual pasó por diálisis para eliminar el exceso de sales d) los pellets inducidos que después se sonicaron y fueron centrifugados nuevamente. Se puede observar una comparación de actividad teniendo como referencia la enzima alfa – amilasa comercial siendo esta la que más actividad tiene debido a que su resultado es totalmente translúcido. Los pellets inducidos de bacterias transformadas con ambos plásmidos muestran un cambio de color sin llegar a ser translúcido, mientras que los sobrenadantes inducidos tienen un color ligeramente celeste. Finalmente, los sobrenadantes sin inducir e inducidos pero precipitados y realizado la diálisis que no presentan un cambio de color tan notable. Cabe mencionar que la observación del cambio de color se realizó después de 5 minutos de incubación.

**Tabla 4.** Resultados de la prueba cualitativa en líquido. Como control positivo se usó alfa amilasa comercial (++++) y control negativo una muestra de lacasa (-).

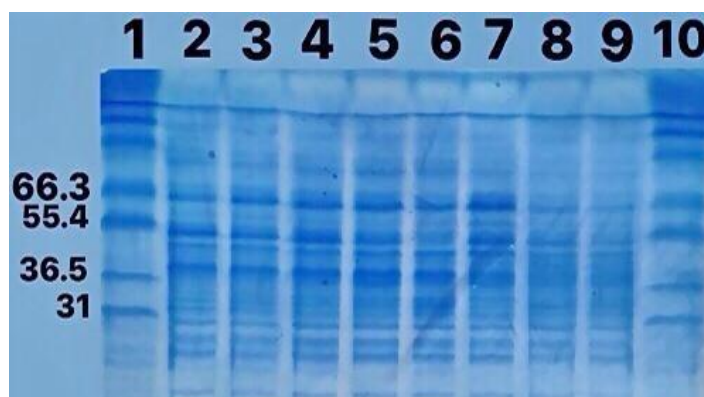
Muestra	Resultado
Alfa amilasa comercial	++++
pET28a-LAC	-
pET15b-AAM sobrenadante inducido	++
pET15b-AAM sobrenadante sin inducir	+
pET15b-AAM sobrenadante inducido/diálisis	+
pET15b-AAM pellet inducido	+++
pET28a-AAM sobrenadante inducido	++
pET28a-AAM sobrenadante sin inducir	+
pET28a-AAM sobrenadante inducido/diálisis	+
pET28a-AAM pellet inducido	+++

#### 2.4.1.1. Ensayo en placas para detección de actividad alfa – amilasa

La enzima alfa – amilasa producida tanto de sobrenadantes como de pellets pudo hidrolizar el almidón, lo que se evidencia por la aparición de una zona de hidrólisis alrededor de los pocillos en medio de agar suplementado con almidón (anexo 6). Las bacterias que fueron inducidas con IPTG tienen una expresión más eficiente, mostrando una actividad enzimática mayor. Finalmente, hay una mayor actividad después de la centrifugación ya que se eliminó cualquier ruido que pueda encontrarse en los fragmentos después de la sonicación (anexo 7).

#### 2.5. Gel de proteínas

La alfa – amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* tiene un peso molecular estimado de 58kDa (Gangadharan, y otros, 2009). Al observar la figura 12 hay unas bandas intensas entre 55.4 - 66.3 kDa que se encuentran dentro del rango de nuestra enzima de interés en las cepas productoras de esta alfa – amilasa y, por el contrario, las bandas en ese rango de peso molecular son tenues en las muestras de proteínas de *E. coli* productora de lacasa (pocillos 8 y 9). Así mismo, como se puede observar las bandas de los pellets (pocillos 4 y 7) tienen un color más oscuro que los sobrenadantes, por lo que a simple vista se puede decir que la enzima es intra-celular.



**Figura 12.** Gel de electroforesis SDS-PAGE de las proteínas del sobrenadante y pellet sonicado de *E. coli* transformada con pET15b-AAM y pET28a-AAM: 1) Ladder BenchMark™ Protein Ladder (Novex by Life technologies). 2) Sobrenadante inducido pET15b-AAM dializado. 3) Sobrenadante sin inducir de pET15b-AAM dializado. 4) Pellet pET15b-AAM inducido después de la centrifugación. 5) Sobrenadante inducido pET28a-AAM dializado 6) Sobrenadante sin inducir de pET28a-AAM dializado. 7) Pellet pET28a-AAM inducido después de la centrifugación. 8) Lacasa inducida y dializada. 9) Lacasa sin inducir y dializada. 10) Ladder BenchMark™ Protein Ladder (Novex by Life technologies).

### CAPITULO III: DISCUSIONES

Con los análisis realizados pudimos comprobar que las diferencias entre la secuencia clonada y la obtenida de la base de datos no se deben a mutaciones. Esto porque la secuencia de los genes de AAM presentes en el pET15b-AAM y el pET28a-AAM, que fueron obtenidas por reacciones independientes de PCR, resultaron ser idénticas. Esto indicaría que la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* que usamos corresponde probablemente a una diferente respecto a la cepa cuyo gen de AAM está depositado en la base de datos del GenBank. Las únicas diferencias entre las secuencias clonadas en ambos plásmidos están al final de la región codificante y estas fueron introducidas de manera deliberada. Específicamente, en el plásmido pET28a-AAM la secuencia del gen de alfa – amilasa fue modificada en el último codón para reemplazar el codón de “Stop” y permitir que la traducción continúe y se incluya un His-Tag en el extremo C-terminal.

En las secuencias de proteínas si hubo diferencias como era de esperarse por los distintos nucleótidos presentes en las secuencias de ADN. En todos los casos los aminoácidos cambiados se encuentran en las mismas posiciones y son los mismos en ambos vectores. Estos cambios pueden o no cambiar la actividad de la enzima debido a que, si hay algunos cambios principalmente entre aminoácidos polares, apolares y también en sus cargas (positivas, negativas y neutras). Por otro lado, no hubo codones de stop en la secuencia del gen clonado de alfa – amilasa, lo que implica que la proteína de interés se puede producir íntegramente en el organismo huésped.

La inducción de la expresión se realizó a 18°C debido a que, como indica Demirkan, Mikami, Adachi, Higasa, & Utsumi (2005), a 30°C la producción de la enzima no es eficiente y a 18°C tiene una actividad enzimática de 95%. La inducción se puede optimizar modificando cantidades de IPTG y los tiempos de inducción para conocer cuáles son las condiciones óptimas para alfa – amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens*. Según Demirkan y otros (2005) y Montor, y otros (2013), las enzimas amilasas son metaloenzimas de calcio y la enzima proveniente de *B. amyloliquefaciens* es una de las que se une fuertemente a cuatro iones de este mineral, dando como resultado mayor estabilidad enzimática, también ayuda a incrementar la actividad de la enzima aumentando en un 21,72% su actividad y su termoestabilidad. Así mismo, según Demirkan, Mikami, Adachi, Higasa, & Utsumi (2005) la cantidad de calcio que contenga influye en las características de la enzima ya que a mayor cantidad de calcio se vuelve más resistente a altas temperaturas y mejora su estabilidad. En este trabajo se añadió calcio, pero no se realizó un seguimiento para comprobar si al añadirlo hubo un incremento en la actividad. Es por ello que se debería de realizar un análisis más profundo para conocer si el calcio ayudó con la producción y cuánto calcio se unió a la enzima.

El género *Bacillus amyloliquefaciens* se caracteriza por producir a la enzima alfa – amilasa de manera extracelular (Avalos Zavaleta, Llenque-Díaz, & Segura-Vega, 2016). Sin embargo, en los

ensayos cualitativos tanto en cajas Petri como de forma líquida nos mostraron que la producción de la enzima alfa – amilasa fue efectiva, pero de manera intracelular, ya que los sobrenadantes tienen poca actividad, es decir, la enzima se secreta ligeramente por el péptido señal del género *Bacillus*, pero no por completo. Presumiblemente el péptido señal no está funcionando de manera eficiente, y en base a esto se puede decir que habría que ajustar el péptido señal.

La reducción evidente de actividad de la alfa – amilasa en los sobrenadantes se debe a la concentración que se realizó durante la pre-purificación, la cual se realizó al 80 % de saturación con sulfato de amonio y posterior diálisis para eliminar todas las sales. Para evitar esta disminución de actividad se podría precipitar las proteínas a distintas concentraciones ya que según Montor, y otros (2013) la actividad amilasa se mantiene con una fracción del 60%, mientras que otros autores reportaron que para la recuperación de amilasas de *Bacillus sp.* se puede saturar al 40%, 50%, 70% y 80% (Quintero, Montoya, & Gutiérrez, 2010; Bano, y otros, 2011; Shaw, Jei-Fu, Lin Fu-Pang, Chen Su-Chiu, & Chen Hasing-Chen, 1995; Gangadharan, y otros, 2009). En el gel SDS-PAGE (figura 13) hay varias bandas alrededor del tamaño esperado, sin embargo, como no se realizó una purificación, sino todos los análisis se hicieron en extracto crudo, no se puede observar con claridad una sola banda que correspondería a la de alfa - amilasa. La purificación depende de a qué mercado es orientado, el costo, calidad final y la tecnología que va a usarse, sin embargo, según Saini, Dahiya, & Mehta (2016) nos demuestran que hay una pérdida de actividad enzimática después de cada proceso que se le aplique.

Por otro lado, para obtener una enzima pura son muy utilizadas las técnicas de cromatografía como puede ser de afinidad, intercambio iónico o de exclusión molecular (Erdal & Taskin, 2010). Como la proteína producida en este estudio está fusionada con una etiqueta de polihistidinas (His-Tag), se puede realizar la purificación mediante cromatografía de afinidad a metales en columnas de níquel como ProBond™ o Ni-NTA. Esto, debido a que el níquel tiene una afinidad micromolar a la histidina presente en la etiqueta. Las proteínas se unen a la resina y luego pueden ser eluidas con un buffer que contenga imidazole (Cevallos & Granja, 2019).

Finalmente, después de obtener la enzima se debe de conocer el uso que se le puede dar en la industria alimenticia de acuerdo a sus características y la alfa – amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* según Quintero, Montoya, & Gutiérrez (2010) y Montor y otros (2014) tiene un pH óptimo de funcionamiento de 6.0, pero conservan un 72% de actividad a pH ácido (4.0-5.0), lo que representa una ventaja si necesita la resistencia a pH bajo. Por otro lado, la temperatura óptima de funcionamiento está alrededor de 40°C-50°C perdiendo su actividad con el aumento de temperatura. Al tener una baja resistencia a temperaturas altas presenta limitaciones de uso en algunas funciones de las industrias alimenticias. Sin embargo, son favorables en el caso de la industria de panificación la cual requiere que se inactive la enzima a altas temperaturas (alrededor de 60-65°C) y es una de las industrias que más utilizan la alfa – amilasa debido a que le da



características especiales al pan como: miga más jugosa, coloración de la corteza, aumento en el volumen del pan, alargan el tiempo de vida útil de los productos, firmeza de la miga, evita la pérdida de la crujencia de la corteza, y ayuda a que el sabor sea homogéneo (Ronquillo, 2012; Kulp, Ponte Jr, & D'Appolonia, 1991; Chi, Liu, Wang, Ju, & Zhang, 2009). También, son utilizadas para el aclaramiento de jugos de frutas que sean ricas en almidón, obteniendo un sabor agradable y evitando el enturbiamiento (Cortés, 2004; Reddy, 2010). No obstante, según Demirkan y otros, (2005) mediante algunas técnicas de mutagénesis dirigida en la enzima se puede alcanzar más estabilidad a mayor temperatura y a un rango más amplio de pH.

## CONCLUSIONES

En la actualidad el desarrollo sostenible ha motivado el uso de enzimas debido a que son biodegradables y se pueden producir utilizando fuentes biológicas; lo cual ha determinado cada vez el menor uso de catalizadores químicos. Las características específicas de las enzimas nos permiten en la industria tener un mayor control, menor consumo de energía, entre otros beneficios. Las alfa – amilasas son una de las enzimas más utilizadas en la industria debido a sus propiedades térmicas, perfil de pH, su estabilidad las cuales son importantes para su aplicación.

La alfa – amilasa de extracto crudo en los ensayos de actividad mostró diferencias importantes. Primeramente, hay mayor capacidad de hidrolizar al almidón con la enzima alfa – amilasa obtenida de cultivos de *E. coli* inducidos versus a cultivos sin inducir. Así mismo, una mayor actividad en los pellets sonificados que en los sobrenadantes por lo que obtuvimos una enzima intracelular. Al comparar entre los sobrenadantes se perdió una gran parte de la actividad después de ser precipitados con sulfato de amonio y dializados que antes del mismo.

En un futuro para mayor entendimiento tanto de la producción y actividad final de la alfa – amilasa; las condiciones de cultivo y su composición se podrían modificar con unos análisis previos para así comprobar lo que la literatura nos demuestra.

Finalmente, se puede concluir que el uso de *Escherichia coli* para producir alfa – amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* puede ser de gran importancia para la industria alimenticia. Sin embargo, éste estudio exploratorio debería ser, en una segunda fase, complementado con estudios enzimáticos cuantitativos complementarios para optimizar el proceso de purificación y caracterización. Este tipo de enzima se puede producir en grandes cantidades, pero su estabilidad es baja a pH muy ácidos y muy básicos, así como también a altas temperaturas. En vista de ello, sería muy interesante implementar una técnica de mutagénesis para mejorar estos aspectos de la alfa – amilasa de *B. amyloliquefaciens*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Konsoula, Z., & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2007). *Coproducción de alfa-amilasa y beta-galactosidasa por Bacillus subtilis en sustratos orgánicos complejos*. Bioresour Technol.
- Abd-Elhalem, B., El-Sawy, M., Gamal, R., & Abou-Taleb, K. (2015). *Production of amylases from Bacillus amyloliquefaciens under submerged fermentation using some agro-industrial by-products*. Ann. Agric. Sci.
- Abd-Elhalem, B., El-Sawy, M., Gamal, R., & Abou-Taleb, K. (2015). *Production of amylases from Bacillus amyloliquefaciens under submerged fermentation using some agro-industrial by-products*. Annals of Agricultural Sciences.
- AMGEN Biotech Experience. (2019). *Biotechnología*. Amgen Foundation, Inc.
- Amritkar, N., Kamat, M., & Lali, A. (2004). *Expanded bed affinity purification of bacterial alpha-amylase and cellulase on composite substrate analogue-cellulose matrices*. Process Biochem.
- Arauza, L., Jozalaa, A., Mazzolab, P., & Penna, T. (2009). *Producción y aplicación biotecnológica de nisina*. Trends Food Sci Technol 20, 146-154.
- Ashabil, A., Burhan, A., & Hatice, K. (2008). *Highly thermostable and alkaline alpha amylase from a halotolerant alkaliphilic Bacillus sp. AB68*. Turkey.
- Austin, C. (2020). *National Human Genome Research Institute*.
- Avalos Zavaleta, R., Llenque-Díaz, L., & Segura-Vega, R. (Julio de 2016). *Isolation and selection of native Bacillus sp. cultures amylase-producers from amylaceous-waste starch from La Hermelinda Market, Trujillo, Peru*. Trujillo.
- Ballschmiter, M., Fütterer, O., & Liebl, W. (2006). *Identification and characterization of a novel intracellular alkaline  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritima MSB8*. Applied and environmental microbiology.
- Bano, Saeeda, Qader, Shah, Ali Ul, Aman Afsheen, . . . Abid. (2011). *Purification and characterization of novel  $\alpha$ -amylase from Bacillus subtilis KIBGE HAS*. AAPS Pharmscitech.
- Bradford, M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*.
- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. (20 de Abril de 2016). *Plásmido*. Enciclopedia Británica. Obtenido de <https://www.britannica.com/science/plasmid>
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., & Osman, G. (2003). *Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp isolate ANT-6*. Process Biochem.
- Calos, M. (1978). *DNA sequence for a low-level promoter of the lac repressor gene and an 'up' promoter mutation*.
- Castro, J. (26 de Abril de 2014). *Live Science*. Obtenido de <https://www.livescience.com/45145-how-do-enzymes-work.html>

- Cevallos, A., & Granja, M. (2019). *Producción de alfa amilasa recombinante de Bacillus licheniformis ATCC 14580 en Escherichia coli BL21 (DE3)*. Guayaquil.
- Chi, Z., Liu, G., Wang, F., Ju, L., & Zhang, T. (2009). *Saccharomycopsis fibuligera and its applications in biotechnology*. Biotechnology advances.
- Connell, S., Tracz, D., Nierhaus, K., & Taylor, D. (2003). *Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance*.
- Coronado, M., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A., & Nieto, J. (2000). *Production and biochemical characterization of an alpha-amylase from the moderate halophile Halomonas meridiana*. FEMS Microbiol Lett.
- Cortés, A. (2004). *Aplicación de enzimas en la producción industrial*. Tecnología, Mundo alimentario.
- Daban, M., & Querol, E. (2003). Expresión recombinante en E. coli de antígenos de Actinobacillus pleuropneumoniae para vacunación y diagnóstico. Universitat Autònoma de Barcelona.
- De Lera Santín, A. (2011). *Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa*.
- Demirkan, E., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T., & Utsumi, S. (2005). *alpha-Amylase from B. amyloliquefaciens: purification, characterization, raw starch degradation and expression in E. coli*. Kyoto: Ankara University, Faculty of Science, Biology Department, 06100 Besevler-Ankara.
- Dobrevá, E., Ivanova, V., & Emanuliova, E. (1994). *Effect of temperature on some characteristics of the thermostable alpha-amylase from B. licheniformis*. World J Microbiol Biotechnol.
- Drauz, K., Groger, H., & May, O. (2012). *Enzyme catalysis in organic synthesis: a comprehensive Handbook*, John Wiley & Sons.
- Erdal, S., & Taskin, M. (2010). *Production of alpha-amylase by Penicillium expansum MT-1 in solid-state fermentation using waste Loquat (Eriobotrya japonica Lindley) kernels as substrate*. Romanian Biotechnological Letters.
- Espinel, E., & López, E. (2009). *Purificación y caracterización de alfa amilasa de Penicillium commune producida mediante fermentación en fase sólida*. Revista Colombiana de Química.
- Faith, W., Neubeck, C., & Reese, E. (1971). *Production and application of enzymes*. Adv. Biochem.
- Fathima Benazir, J., & et al. (2011). *“Amylase production by Aspergillus Niger under solid state fermentation using agroindustrial wastes*. Int. J. Eng. Sci. Technol.
- Gangadharan, Dhanya, Nampoothiri, K. Madhavan, Sivaramakrishnan, Ashok, & Swetha y Pandey. (2009). *Biochemical characterization of raw-starch-digesting alpha amylase purified from Bacillus amyloliquefaciens*. Applied Biochemistry and Biotechnology.
- Green, E. (2020). *National Human Genome Research Institute*.
- Green, E. D. (17 de Agosto de 2020). *National Human Genome Research Institute*. Obtenido de <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Plasmid>
- Guadarrama, A., Orozco, J., & Morales, M. (2007). *Obtención de alfa amilasa a partir de Aspergillus oryzae*.

- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V., & Chauhan, B. (2003). *Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective*. Process Biochemistry.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). *A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond*. Biomed Res. Int.
- Hannig, G., & Makrides, S. (1998). *Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli*.
- Jorgensen, S., Vorgias, C., & Antranikian, G. (1997). *Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus in Escherichia coli and Bacillus subtilis*. J Biol Chem.
- Khoo, S., Amirul, A., Kamaruzaman, M., Nazalan, N., & Azizan, M. (1994). *Purificación y caracterización de alfa-amilasa de Aspergillus flavus*. Folia Microbiol (Praha).
- Kilikian, B., Suárez, I., Liria, C., & Gombert, A. (Mayo de 2000). *Process strategies to improve heterologous protein production in Escherichia coli under lactose or IPTG induction*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959200001370?via%3Dihub>
- Kulp, K., Ponte Jr, J., & D'Appolonia, B. (1991). *Staling of white pan bread: Fundamental causes*. Critical Reviews in Food Science & Nutrition.
- Lamabam, S., Polashree, K., & S. R. J. (2010). Meghalaya: Microbiology Laboratory, Department of Biotechnology and Bioinformatics North Eastern Hill University.
- Láñez, E. (15 de Febrero de 2005). *Universidad de Granada*.
- Lara, Á. (2011). Recombinant protein production in Escherichia coli. México.
- Lestini, R., & et al. (2013). *Investigación de ácidos nucleicos*.
- López, S. (2015). *Bacillus un género que alberga especies que cumplen diversos roles biológicos*.
- Lulek, J. (s.f.). *"Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new alpha-amylase inhibitor from Secale cereale*. Int. J. Biochem. Cell Biol.
- Mazzola, P., Lopes, A., Hasmann, F., Jozala, A., Penna, T., Magalhaes, P., . . . Pessoa, A. (2008). *Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques*. J Chem Technol Biotechnol.
- Mckee, T., & Mckee, J. (2020). Bioquímica, las bases moleculares de la vida. McGraw-Hill Interamericana de España S.L.; N.º: 7 edición.
- McMahon, H., Kelly, C., & Fogarty, W. (1999). *High maltose producing amyolytic system of a Streptomyces sp.* .
- Mendoza, E., & Martínez, M. (Septiembre de 2018). *Producción de alfa amilasa por fermentación en estado sólido de residuos agroindustriales (cáscaras de banana) utilizando Bacillus subtilis*. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/33219/1/401-1324%20-%20Fermentac%20en%20estado%20solido%20residuos%20agroindustr.pdf>
- Mendu, D., Ratnam, B., Purnima, A., & Ayyanna, C. (2005). *Affinity chromatography of  $\alpha$ -amylase from Bacillus licheniformis*. Enzyme Microb Technol.
- Merck. (2020). *OverExpress™ C41(DE3) Chemically Competent Cells*.

- Mergulhao, F., Summers, D., & Monteiro, G. (2005). Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv.*
- Monteiro, P., & Magalhaes, O. (2010). *Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry*. *Braz J Microbiol.*
- Montor Antonio, J., Olvera Carranza, C., Reyes Duarte, D., Sachman Ruiz, B., Ramírez Coutiño, L., & Del Moral, S. (2014). *Biochemical characterization of AmiJ33 an amylase from Bacillus amyloliquefaciens isolated of sugarcane soils at the Papaloapan region*. Oaxaca: Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan.
- Montor, J. J. (2015). *ESTUDIO DE LA  $\alpha$ -AMILASA RECOMBINANTE AmiJ33r Y DEL GEN QUE LA CODIFICA*. Oaxaca: Universidad del Papaloapan.
- Montor, J., Olvera, C., Reyes, D., Sachman, B., Ramírez, L., & del Moral, S. (2013). *Biochemical characterization of AmiJ33 an amylase from Bacillus amyloliquefaciens isolated of sugarcane soils at the Papaloapan region*. México DF.
- Moraes, L., Filho, S., & Ulhoa, C. (1999). *urificación y algunas propiedades de una proteína de fusión  $\alpha$ -amilasa glucoamilasa de Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 561-564.
- Muralikrishna, G., & Nirmala, M. (2005). *Cereal  $\alpha$ -amylases—an overview*. *Carbohydr. Polym.*
- Navas, J. (2009). *Bioquímica estructural y metabólica*. Universidad de Cantabria.
- Nielsen, J., & Borchert, T. (2000). *Ingeniería de proteínas de alfa-amilasas bacterianas*. *Biochim Biophys Acta* 1543, 253-274.
- Novagen. (s.f.). *ADN de pET-15b*.
- Novagen. (s.f.). *ADN de pET-28a*.
- Nusrat, A., & Rahman, S. (2007). *Comparative studies on the production of extracellular  $\alpha$ -amylase by three mesophilic Bacillus isolates*. *Bangladesh J Microbiol.*
- Ogasahara, K., Imanishi, A., & Isemura, T. (1970). *Studies on thermophilic alpha-amylase from B. stearothermophilus*. *J Biochem.*
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Soccol, V., Singh, D., & Mohan, R. (2000). *Advances in microbial amylases*. *Biotechnol Appl Biochem.*
- Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M., Muralikrishna, G., & Sreeramulu, K. (2009). *Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable  $\alpha$ -amylases from Chromohalobacter sp*. *Process Biochemistry*.
- Prakash, O., & Jaiswal, N. (2009). *alfa-amilasa: un representante ideal de enzimas termoestables*. *Appl Biochem Biotechnol.*
- Prasad, K. (2011). *Enzyme Technology: Pacemaker of Biotechnology*. PHI Learning Pvt. Ltd.
- Prescott, S., & Dunn, C. (1962). *Microbiología Industrial*. Editorial Aguilar.
- Quintero, M., Montoya, O., & Gutiérrez, P. (2010). *PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A  $\alpha$  AMYLASE PRODUCED BY Bacillus sp. BBM1*. *Medellin.*
- Rabhi, E., Sadok, A., Khalaf, N., & Fathallah, D. (2007). *A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon alpha as a GST-fusion protein in E. coli*. *Protein Eng Des Se.*

- Rajagopalan, G., & Krishnan, C. (2008).  *$\alpha$ -Amylase production from catabolite derepressed Bacillus subtilis KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate*. Bioresour. Technol.
- Raman, M., & Martín, K. (28 de Agosto de 2014). *One solution for cloning and mutagenesis: In-Fusion® HD Cloning Plus*. Obtenido de Nature Methods.
- Reddy, R. (2010). *Agricultural Process Engineering*. Delhi: Global Media.
- Ronquillo, H. (2012). *Estudio del efecto de la adición de la enzima alfa amilasa en un pan tipo muffin, elaborado con diferentes tipos de harina de trigo*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.
- Rose, A. (1961). *Industrial Microbiology*. London: Butterworths.
- Saini, H., Saini, R., Dahiya, A., & Mehta, S. (2016). *Extraction and Partial Purification and Characterization of Amylase from Apple (Malus Pumila)*. International Journal of Food and Nutritional Science.
- Saito, N. (1973). *A thermophilic extracellular from B. licheniformis*. Arch Biochem Biophys.
- Shaw, Jei-Fu, Lin Fu-Pang, Chen Su-Chiu, & Chen Hasing-Chen. (1995). *Purification and properties of an extracellular  $\alpha$ -amylase from Thermus sp*. Botanical Bulletin of Academia Sinica.
- Shih, N., & Labbe, R. (1995). *Purification and Characterization of an Extracellular  $\alpha$ -Amylase from Clostridium perfringens Type A*. Applied and Environmental Microbiology.
- Siddiqui, K., Poljak, A., De Francisci, D., Guerriero, G., Pilak, O., Burg, D., & et al. (2010). *A chemically modified alpha-amylase with a molten-globule state has entropically driven enhanced thermal stability*. Protein Eng Des Sel.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampootheri, K., Soccol, C., & Pandey, A. (2006). *Alpha-amylases from microbial sources—an overview on recent developments*. Food Technol Biotechnol.
- Skimer, J. (1975). *A wider array of large and small scale, uses is opening up of multidisciplinary research now under way on biological catalysis*.
- Sørensen, H., & Mortensen, K. (2005). *Advanced genetic strategies for recombinant expression in Escherichia coli*.
- Souza, P. (2010). *Application of microbial alfa amylase in industry-A review*. Brazilian journal of microbiology.
- Stevens, R. (2000). *Design of high-throughput methods of protein production for structural biology*.
- Sundarram, A., & Murthy, T. (2014). *Alpha-amylase production and applications*. J Appl Environ Microbiol.
- Takara. (2020). *In-Fusion Cloning*.
- Terpe, K. (2003). *Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*.
- Thermo Fisher Scientific. (2006). *TOP 10 Chemically Competent E. coli*.
- ThermoFisher Scientific. (s.f.). *SNAP Plasmid DNA MiniPrep Kit*.
- Townshend, A. (1981). *Uses on enzymes in analitical chemistry* .

- Van Der Maarel, M., Van Der Veen, B., Uitdehaag, H., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). *Properties and applications of starch converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family*. J. Biotechnol.
- Van Der Veen, M., Veelaert, S., Van Der Goot, A., & Boom, R. (2006). *Starch hydrolysis under low water conditions: A conceptual process design*. J Food Eng.
- Vihinen, M., & Mantsala, P. (1989). *Microbial amyolytic enzymes*.
- Wang, S., Lin, C., Liu, Y., Shen, Z., Jeyaseelan, J., & Qin, W. (2016). *Characterization of a starch-hydrolyzing  $\alpha$ -amylase produced by Aspergillus niger WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment*. Biochem. Mol. Biol., vol. 7, no. 1.
- Yamabhai, M., Emrat, S., Sukasem, S., Pesatcha, P., Jaruseranee, N., & Buranabanyat, B. (2008). *Secretion of recombinant Bacillus hydrolytic enzymes using Escherichia coli expression systems*. J Biotechnol.
- Yubero, F. (2013). *Semillas de Moringa oleifera cultivadas en el chaco central como fuente de enzimas para la alimentación animal*.
- Yuuki, T., Nomura, T., Tezuka, H., Tsuboi, A., Yamagata, H., Tsukagoshi, N., & et al. (1995). *Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat and pH stable  $\alpha$ -amylase of B. licheniformis: comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying  $\alpha$ -amylase deduced from the DNA sequences*. J Biochem.
- Zhang, Q., Tsukagoshi, N., Miyashiro, S., & Udaka, S. (1983). *Increased production of  $\alpha$ -amylase by Bacillus amyloliquefaciens in the presence of glycine*.
- Zhao, W., Zheng, J., Wang, Y., & Zhou, H. (2011). *A marked enhancement in production of amylase by Bacillus amyloliquefaciens in flask fermentation using statistical methods*. J Cent South Univ Technol.
- Zhu, B., Cai, G., Hall, E., & Freeman, G. (16 de Mayo de 2018). *In-Fusion™ assembly: seamless engineering of multidomain fusion proteins, modular vectors, and mutations*. Obtenido de BioTechniques.

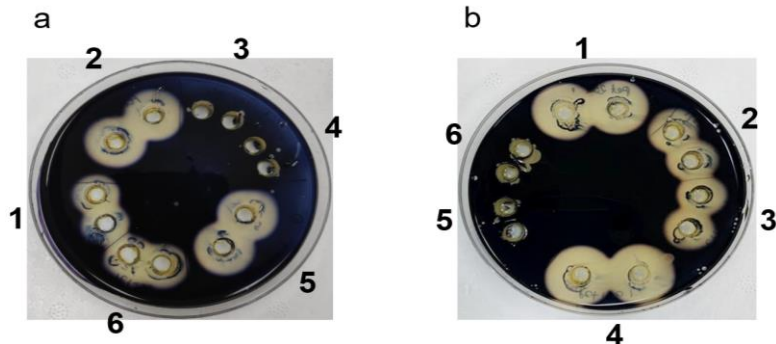








**Anexo 7.** Ensayo de actividad alfa – amilasa de sobrenadantes y pellets provenientes de *E. coli* transformada con pET15b-AAM y pET28a-AAM. En la figura 14a se presentan los resultados de los sobrenadantes inducidos, sin inducir y sus controles negativos siendo: 1) Sobrenadante sin inducir de pET28a-AAM. 2) Sobrenadante inducido de pET28a-AAM. 3 y 4) Controles negativos de la enzima lacasa. 5) Sobrenadante inducido de pET15b-AAM. 6) Sobrenadante sin inducir de pET15b-AAM. En la figura 14b se presenta el ensayo de pellets inducidos y sonicados antes y después de la centrifugación siendo: 1) Pellet pET28a-AAM después de la centrifugación. 2) Pellet pET28a-AAM antes de la centrifugación. 3) Pellet pET15b-AAM antes de la centrifugación. 4) Pellet pET15b-AAM después de la centrifugación. 5 y 6) Controles negativos con la enzima lacasa de *E. coli*.



**Anexo 8.** Aminoácidos de las secuencias de proteínas con sus respectivas características.  
(Navas (2009); Mckee & Mckee (2020))

Aminoácido	Características
A (Alanina)	No esencial. Aminoácido neutro, hidrofóbico, apolar, alifático.
D (Ácido aspártico)	No esencial. Aminoácido dicarboxílico, polar, carga negativa, alifático.
G (Glicina)	No esencial. Aminoácido neutro, hidrofóbico, apolar, sin carga, alifático.
H (Histidina)	Esencial. Aminoácido dibásico, polar, carga positiva, heterociclo alifático.
K (Lisina)	Esencial. Aminoácido dibásico, polar, carga positiva, alifático.
L (Leucina)	Esencial. Aminoácido neutro, hidrofóbico, apolar, alifático.
N (Asparagina)	No esencial. Amida, polar, sin carga, alifático.
Q (Glutamina)	No esencial. Amida, polar, sin carga, alifático.
R (Arginina)	Semi-esencial. Aminoácido dibásico, polar, carga positiva, alifático.
T (Treonina)	Esencial. Hidroxiaminoácido el cual posee un grupo alcohólico, polar, sin carga, alifático.
V (Valina)	Esencial. Aminoácido neutro, hidrofóbico, apolar, alifático.