XX Jornadas de Ciencias, Tecnologías e Innovación

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AMILASAS Y GLUCOAMILASAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.

FERNANDEZ, Ivan[1]; GOMEZ CASATI, Diego[2]; WAYLLACE, Natael[2].

[1]Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (FBIOyF), UNR / ivanalejandrofernandez29@gmail.com
[2] CEFOBI (Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos) / gomezcasati@cefobi-conicet.gov.ar / nataelwayllace29@gmail.com

Palabras claves: Proteínas recombinantes; α-amilasa; Expresión; Purificación; Bioquímica de proteínas

INTRODUCCIÓN

Las proteínas recombinantes presentan numerosas aplicaciones en biotecnología, aunque su obtención requiere optimizar diferentes etapas, como la expresión heteróloga en el organismo hospedador de forma soluble, su purificación y posteriormente la caracterización bioquímica. En este trabajo se estudiaron distintas enzimas recombinantes expresadas en *Escherichia coli*, con especial interés en una α-amilasa quimérica.

OBJETIVOS

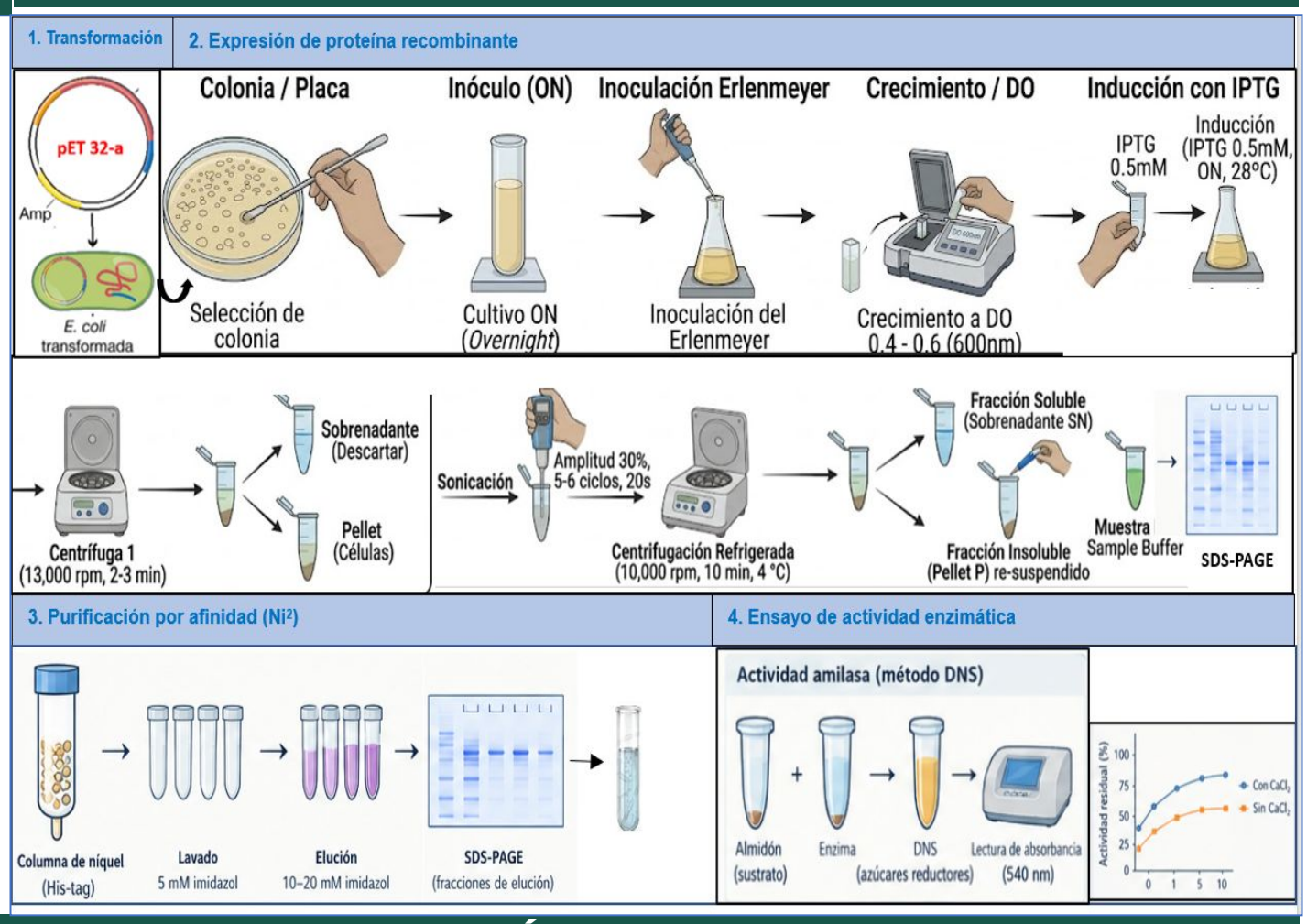
Objetivo General

- **Expresar, purificar y caracterizar** enzimas recombinantes utilizando la bacteria *E. coli* como sistema de producción heteróloga.

Objetivos Específicos

- Obtener células competentes de cepas de *E. coli* BL21(DE3) mediante el método de $CaCl_2$ y transformarlas con el vector de expresión que porta el gen de la enzima de interés.
- Expresar la proteína
- Purificar la proteína por cromatografía de afinidad a Ni^{2+}.
- Ensayar la actividad enzimática, determinación de la temperatura óptima y la estabilidad térmica de la enzima.

MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS y DISCUSIÓN

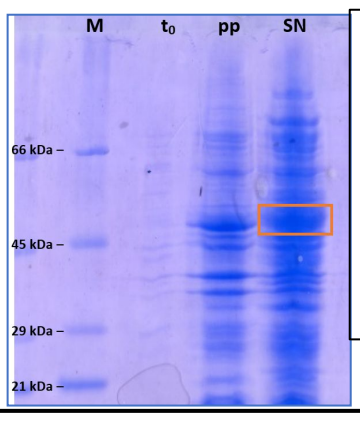


Figura 1. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de la proteína sdAmy-US100 (100ml) inducida a ***28°C, ON***. **Calle 1**: marcador de peso molecular (M). **Calle 2**: muestra previa a la inducción (t_0). **Calle 3**: fracción insoluble (PP). **Calle 4**: fracción soluble (SN).

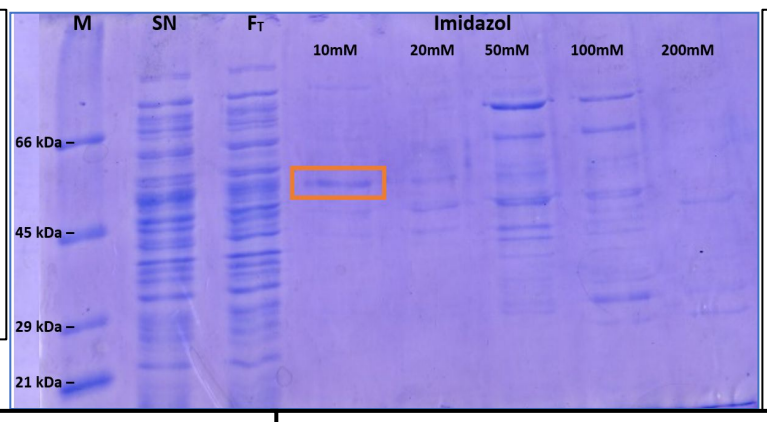


Figura 2. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de la proteína quimérica sdAmy-US100 mediante cromatografía de afinidad a Ni^{2+}I. **Calle 1**: marcador de peso molecular (M). **Calle 2**: Sobrenadante (SN). **Calle 3**: *flow-through* (FT). **Calle 4 a 8**: fracciones eluidas con un gradiente de imidazol de **10, 20, 50, 100, 200 mM** respectivamente. Se observa que la mayor cantidad de proteína se recuperó en la fracción con 10 mM de imidazol. .

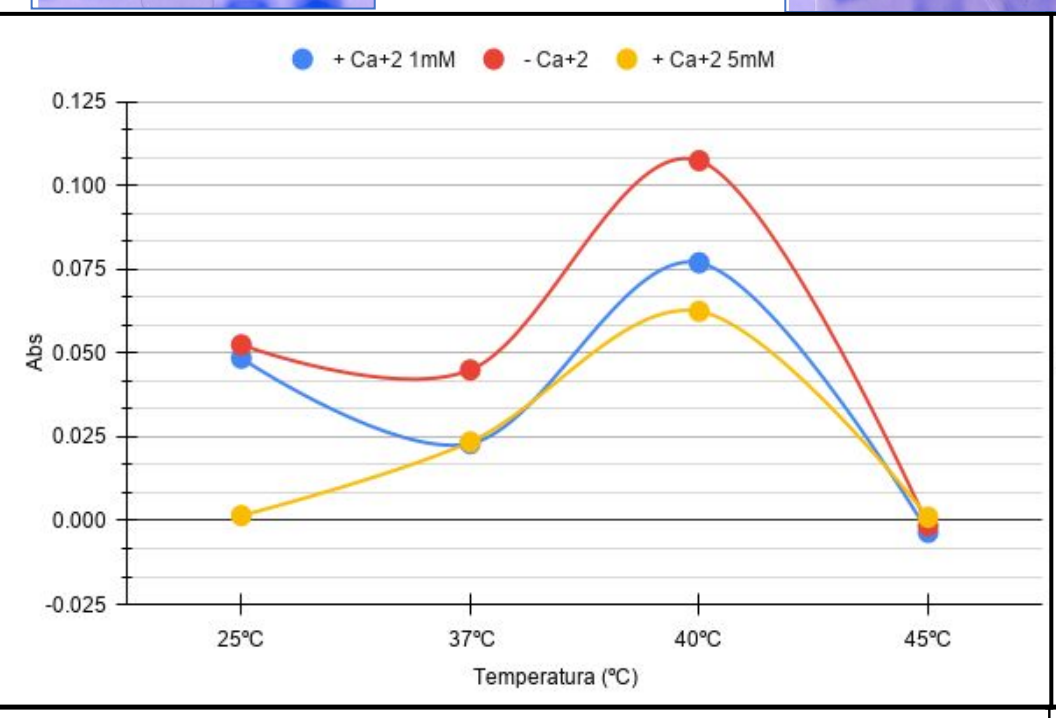


Gráfico 1. Actividad enzimática en función de la temperatura. Se evaluó la actividad de la enzima a diferentes temperaturas en ausencia y presencia de Ca^{2+} (1 y 5 mM).

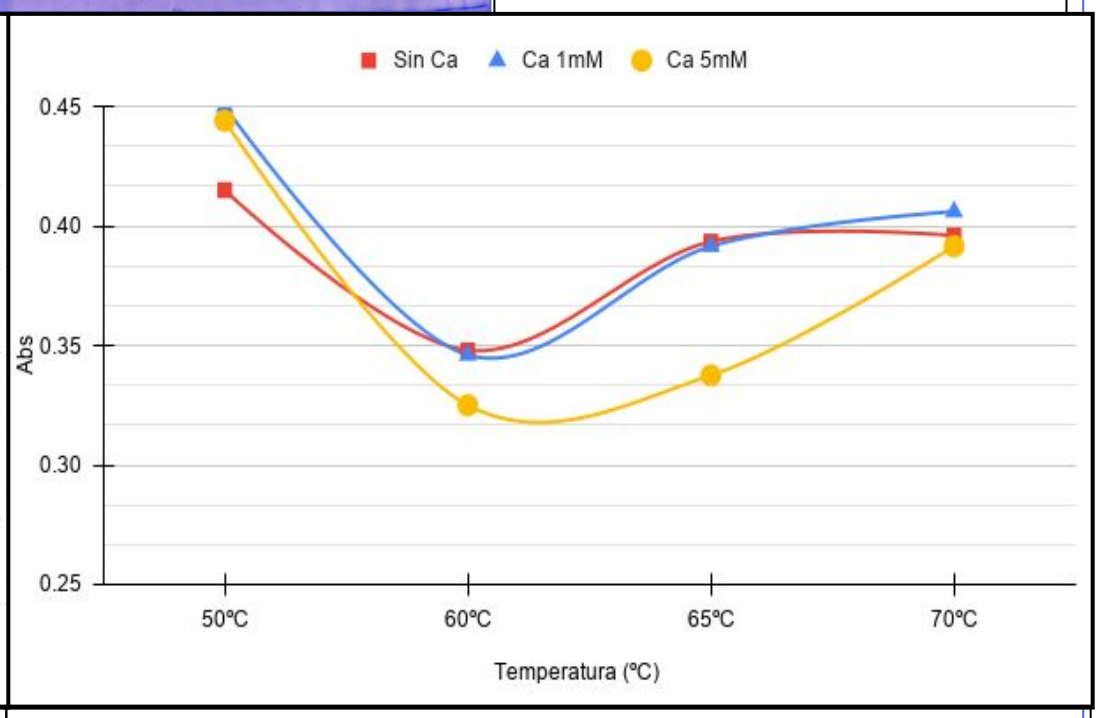


Gráfico 2. Estabilidad enzimática en función de la temperatura. Se evaluó la actividad residual luego de la preincubación de la enzima con diferentes concentraciones de Ca^{2+} (0, 1 y 5 mM).

CONCLUSIONES

Se logró llevar adelante el proceso completo para la **obtención de proteína recombinante**, desde la transformación de *E. coli*, su expresión y purificación por cromatografía de afinidad. La medida de **actividad enzimática** permitió confirmar que el proceso desarrollado fue exitoso y que se obtuvo una proteína activa.

Los ensayos de **Temperatura óptima y estabilidad son preliminares**, por lo que permiten observar que el **$CaCl_2$ tiene un efecto sobre la actividad de la enzima**. Estos resultados sirven como punto de partida para continuar con la caracterización enzimática.