

Identificación del gen de la α -amilasa de *Arthrobacter sp.* C27 Antártica

César Castro Caicedo ⁽¹⁾, Jeffrey Vargas Pérez ⁽²⁾, Paola Calle Delgado ⁽³⁾, Julio Bonilla Jaime ⁽⁴⁾, Nardy Diez García ⁽⁵⁾

Facultad de Ciencias de la Vida (FCV) ^{(1) (3)}

Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) ^{(2) (4) (5)}

Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral

Apartado 09-01-5863. Guayaquil-Ecuador

cedacast@espol.edu.ec ⁽¹⁾, ndiez@espol.edu.ec ⁽⁵⁾

Resumen

Las enzimas bacterianas psicrófilas ofrecen usos potenciales para la industria porque minimizan reacciones químicas indeseables que se producen a temperaturas altas, proporcionando beneficios económicos y ecológicos. Las α -amilasas son enzimas que hidrolizan los enlaces α -1,4-glucosídicos en el almidón. El objetivo de nuestra investigación fue identificar el gen asociado a la α -amilasa de *Arthrobacter sp.* C27. Para la cual se crecieron 17 aislados procedentes de muestras de sedimento antártico en presencia de almidón como única fuente de carbono a una temperatura de 18°C, seleccionando a *Arthrobacter sp.* C27 debido a que presentó la mayor actividad aminolítica. Se aisló y se purificó ADN genómico para amplificar el gen responsable a la α -amilasa, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y con el uso de primers degenerados y primers reportados para un gen con actividad α -amilasa en una cepa del género *Arthrobacter*. Los resultados mostraron que el gen asociado a la actividad α -amilasa está presente en nuestra cepa bacteriana, ya que se logró amplificar un fragmento del gen de aproximadamente 345 pb. Se concluyó que la α -amilasa presente en la cepa C27 de *Arthrobacter* no posee la misma secuencia del gen de la que previamente había sido reportada.

Palabras Claves: Actividad aminolítica, Bacterias psicrófilas, PCR

Abstract

Psychrophilic bacterial enzymes offer potential uses for the industry because they minimize undesirable chemical reactions in high temperatures industrial processes, providing economic and ecological benefits. α -Amylase enzymes hydrolyze α -1, 4-glucosidic linkages in starch. The aim of our investigation was to identify the gen associate to the α -amylase activity in *Arthrobacter sp.* C27. For which 17 isolates were grown from samples of Antarctic sediments in the presence of starch as carbon source at a temperature of 18 °C, selecting *Arthrobacter sp.* C27 because it had the highest aminolytic activity. Genomic DNA was isolated and purified to amplify, using the polymerase chain reaction (PCR) technique, the gene responsible for α -amylase activity with the aid of degenerate primers and primers reported for a gene with α -amylase activity in another strain of the genus *Arthrobacter*. The results showed that the gene associated with α -amylase activity is present in our bacterial strain, as it was possible to amplify a fragment of the gene of approximately 345 bp. It was concluded that α -amylase present in the *Arthrobacter* C27 strain does not have the same gene sequence as previously reported.

Keywords: Aminolytic activity, Psychrophilic bacterial, PCR

1. Introducción

Los ecosistemas fríos ocupan el 80 % de la biosfera terrestre [1]. Ambientes como la Antártida, albergan una gran biodiversidad de bacterias, levaduras, algas unicelulares y hongos adaptados a las bajas temperaturas conocidos como psicrófilos [2], [3].

El género *Arthrobacter* pertenece a la clase de Actinobacteria, familia Micrococáceas. Son bacterias aerobias obligadas que habitan comúnmente en los suelos, pueden ser mesófilos o psicrófilos, caracterizadas por tener un crecimiento tipo bacilo-coco y ser altamente proteolíticas [4], [5].

Las bacterias psicrófilas han recibido una considerable atención, ya que a menudo producen enzimas con actividad óptima a bajas temperaturas [1], otorgándoles gran interés comercial debido a que pueden tener aplicaciones en procesos industriales a baja temperatura y científico por la relación entre la estructura de la proteína y su estabilidad térmica [6].

La α -amilasa (EC 3.2.1.1) es una enzima que hidroliza los enlaces α -1,4-glucosídicos en el almidón, requiere de iones calcio para su estabilidad, actividad y para mantener su integridad estructural, ocupa aproximadamente el 25-30% del mercado mundial de las enzimas comerciales [7]–[9], esta enzima puede ser producida por bacterias, hongos, plantas y animales [10]. Las α -amilasas producidas por bacterias poseen diferentes aplicaciones en los procesos industriales, biotecnológicos, farmacéuticos y en procesos de bioremediación [3], [6]. El objetivo de la presente investigación fue identificar el gen asociado a la α -amilasa de *Arthrobacter sp. C27*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Cepa bacteriana, aislamiento, identificación y crecimiento masivo

La cepa bacteriana *Arthrobacter sp. C27* (CIBE, ESPOL, Ecuador) fue aislada a partir de muestras de sedimento procedente de expediciones antárticas organizada por el Instituto Antártico Ecuatoriano conjunto con la ESPOL entre los años 2010 y 2012. De las muestras colectadas se obtuvieron un total de 52 aislados, los cuales fueron identificados molecularmente mediante la secuencia del ADN ribosomal 16S.

El crecimiento de la cepa *Arthrobacter sp. C27* para la extracción de ADN genómico (ADNg) se realizó en agua peptona y se incubó a 18°C, durante 4 días.

2.2. Extracción de ADNg

El ADNg fue aislado mediante el protocolo propuesto por M. Ausubel *et al.*, [11].

2.2.1. Lisis celular. Una vez crecida la cepa, se centrifugó el cultivo durante 2 min a 10.000 RPM y el pellet obtenido se resuspendió en 567 μ l de buffer TE (10mM Tris – HCl, EDTA 1 mM y pH 8), 30 μ l de 10 % Dodecil sulfato de sodio (SDS) y 3 μ l de 20 mg/ml de proteinasa K. Tras una hora de incubación a 37°C, se agregó 100 μ l de NaCl 5M y 80 μ l de solución CTAB/NaCl (10 % CTAB en 0,7 M NaCl) para ser incubada por 10 min a 65°C.

2.2.2. Precipitación de ADN. Se agregó 780 μ l de 24:1 Cloroformo-alcohol isoamílico, se mezcló y se centrifugó por 5 min. Se removió la fase acuosa y se la diluyó en 500 μ l de 25:24:1 Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se centrifugó durante 5 min. Se transfirió el sobrenadante, se agregó 0,6 vol. de 2-propanol y se guardó por 24 horas a –20°C con la finalidad de precipitar la mayor cantidad de ácidos nucleicos, una vez transcurrido dicho tiempo se centrifugó por 20 min, el pellet fue lavado dos veces con Etanol 70% y centrifugado por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se secó utilizando una Vacufuge plus (Eppendorf) durante 15 min. El pellet fue resuspendido en 30 μ l de agua pura y guardado a –20°C.

2.3. Purificación, calidad y cantidad de ADNg

El ADNg se purificó mediante el protocolo propuesto por M. Ausubel *et al.*, [11]. Se agregó 1/10 v/v de Acetato de sodio 3 M, pH 5,2 y 7 vol. de Isopropanol al 100%, se centrifugó por 30 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se agregó Etanol al 70%, se centrifugó por 15 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se secó en una Vacufuge plus (Eppendorf) durante 15 min. El pellet fue resuspendido en 30 μ l de agua pura y guardado a –20°C.

La calidad y cantidad del ADNg fue determinada mediante espectrofotometría en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). La calidad que fue verificada en geles de agarosa al 1 %.

2.4. Primers

Para identificar el gen que corresponde a la actividad α -amilasa se utilizaron, los primers de Kim *et al.*, [1] que corresponde al gen indexado al GenBank con número de acceso KX516725.

Para la amplificación del fragmento ADN del gen de la α -amilasa se usaron los primers utilizados por Kim *et al.*, [1], forward (5'-AAA CAT ATG GTG ACC ACC ACT ACT-3') y reverse (5'-AAA AAG CTT TCA CCG GAG CCG TC-3') y los primers degenerado diseñados en el laboratorio forward (5'-TGG CGT GGA TGG CTT TCG TAT TGA TAC NAT GAA RCA-3') y reverse (5'-ATG CAT TAG AAT CTG CAT CTG TAT ACC ART CRT CNC C-3') con el software online J-CODEHOP [12]–[14] basados en la secuencia

genómica. La amplificación por parte de los primers degenerados se orientó a 300 pares de bases (pb). El tamaño aproximado del gen de α -amilasa que se espera es de 2000 a 2500 pb.

2.5. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se realizó en un Termociclador Mastercycler® EP (Eppendorf). La mezcla de reacción para la PCR contenía 5 μ l GoTaq® DNA Polymerase (Promega), 0,25 μ l de primer forward, 0,25 μ l primer reverse, 2 μ l ADN_g, y 2,5 μ l agua estéril.

Se usó dos tipos de programas de PCR, el usado por Kim *et al.*, [1]: desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguida de 28 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento a 58 °C durante 40 s, extensión a 72 °C por 80 s, elongación final a 72 °C por 10 min. Y una PCR en gradiente: desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento a 50,2, 52,3, 54,3, 56,2 y 57,8 °C durante 1 min, extensión a 72 °C por 2,5 min, y la elongación final a 72 °C por 10 min.

2.6. Electroforesis

Los productos de la PCR se visualizaron en gels de agarosa al 1 % UltraPure™ Agarose (Invitrogen) que contenía (0,1 μ l/ml) SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) y un marcador de peso molecular 1 kb ADN ladder (Promega) y se documentó en Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad). La electroforesis fue hecha en Mini-Sub® Cell GT Systems y PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad).

3. Resultados

3.1. Cepa bacteriana, aislamiento, identificación y crecimiento masivo

De un total de 17 aislados que se crecieron en presencia de almidón como única fuente de carbono a una temperatura de 18°C, fue seleccionada la cepa *Arthrobacter sp.* C27 que presentó la mayor actividad aminolítica verificada y cuantificada por el tamaño del halo mediante la fórmula usada por M. Arshad *et al.*, [15].

3.2. Extracción de ADN_g, purificación, calidad y cantidad

Después de realizar una electroforesis en gels de agarosa se verificó la ausencia de bandas de bajo peso molecular (ver Fig. 1). La relación A_{260}/A_{280} fue de $1,84 \pm 0,02$ cuya interpretación puede estar relacionada con un ADN_g de buena calidad y libre de contaminantes. El promedio de concentración del ADN_g fue $72,6 \pm 5,72$ ng/ μ l.

3.3. Primers, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis

El resultado de la amplificación de ADN_g proveniente de la cepa *Arthrobacter sp.* C27 mostró una banda que puede ser relacionada con el gen de la α -amilasa (Fig. 1), ya que la misma corresponde con el tamaño molecular esperado para los primers degenerados que fueron diseñados para el presente trabajo coincidiendo con un tamaño de fragmento de 345 pb aproximadamente (L2).

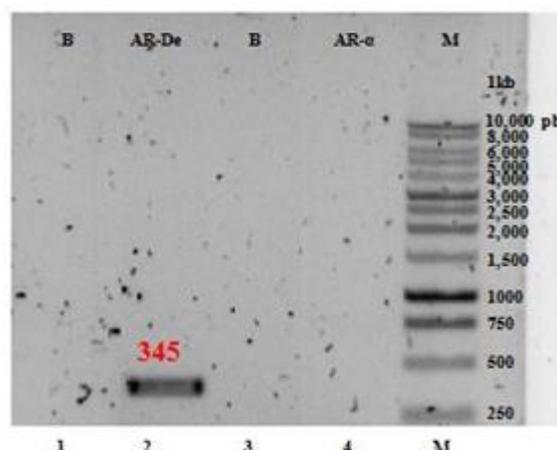


Figura 1. Blanco (B), Primers usados por Kim *et al.* (2016) (AR- α), Primers degenerados (AR-De), Marcador 1kb ladder promega (M). B de AR-De (L1), AR-De (L2), B de AR- α (L3) y AR- α (L4).

El gen de la α -amilasa de *Arthrobacter agilis* reportado por Kim *et al.*, [1] cuando se utilizó para amplificar ADN_g proveniente de nuestra cepa en las condiciones por él reportadas, no presento señal de amplificación (Fig. 1) (L4), el fragmento esperado en este caso correspondía a un tamaño aproximado de 2000 a 2500 pb que no se pudo visualizar.

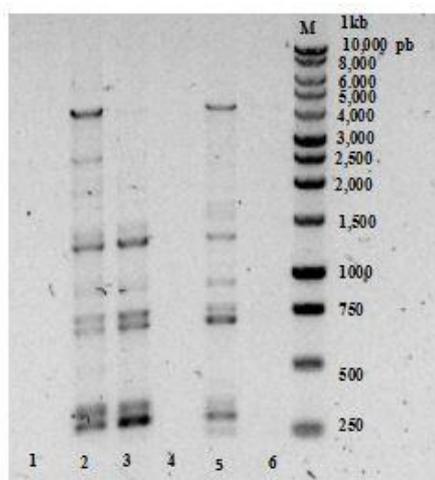


Figura 2. Primers usados por Kim *et al.* (2016) (AR- α). Blanco (L1), 50,2°C (L2), 52,3°C (L3), 54,3°C (L4), 56,2°C (L5), 57,8°C (L6), Marcador (M).

Una PCR en gradiente fue realizada con la finalidad de establecer una temperatura óptima para nuestro templado, al observar los productos de la amplificación en gradiente (Fig. 2) no se encontró el producto esperado.

4. Discusión

Arthrobacter es un género de bacterias muy estudiado debido a que son microorganismo de gran interés ecológico e industrial, pueden ser mesófilos (20-30°C) o psicrófilos (0-20°C), son organismo cosmopolitas que se los encuentra comúnmente en la biota bacteriana autóctona de los suelos, y en otros tipos de hábitad como sedimentos de cuevas subterráneas, sedimentos de glaciares, fangos, mares, aguas grises y negras, superficies aéreas de plantas, verduras, productos lácteos, diversas especies de animales, en muestras clínicas humanas y veterinarias [4], [5].

Se han encontrado ciertas especies que pueden hidrolizar productos como la gelatina, caseína, lípidos y almidón [4], [16].

La cepa de *Arthrobacter sp.* C27 seleccionada en el presente estudio se caracteriza por crecer y degradar almidones a bajas temperaturas (18°C o menos), de allí nuestro interés, dado su potencial para la industria ya que este tipo de enzimas podrían minimizar reacciones químicas indeseables que se producen a temperaturas altas [9]. El género *Arthrobacter* presenta en general altos valores de actividad aminolítica [2], producto de la actividad de la α -amilasa al degradar el almidón, por lo que puede ser utilizada para sintetizar diferentes productos [16], en procesos industriales de textiles, detergentes, alimentos, medicina, y cervecera [10], [17].

Las α -amilasas que se inducen a bajas o moderadas temperaturas producidas por bacterias, proporcionan beneficios económicos porque son enzimas muy termoestables, de fácil manipulación y su producción es eficiente y rentable [10] y desde el punto de vista ecológicos por el ahorro de energía que conlleva su producción [9].

El ADN_g utilizado para la investigación permitió amplificar un fragmento de aproximadamente 345 pb del gen de la α -amilasa con el uso de primers degenerados, los cuales fueron diseñados en el laboratorio para amplificar un segmento de gen a partir de las regiones más conservadas de bloques de aminoácidos dentro de secuencias alineadas de genes de α -amilasa de microorganismo homólogos con el software online J-CODEHOP [12], [14], [18], [19].

Por otra parte, los primers utilizados por Kim *et al.* [1] para amplificar el gen de la α -amilasa en una especie del género *Arthrobacter*, no amplificaron para *Arthrobacter sp.* C27. La posible explicación es que el gen amplificado por Kim *et al.*, no esté presente ni

corresponda al de la actividad reportada para nuestra cepa, entre otras razones puede deberse a que la α -amilasa por ellos reportada posee un hábitad diferente, la cepa usada en nuestra investigación corresponde a una cepa terrestre, mientras que la otra es acuática, además hay que tener en consideración que las α -amilasas microbianas puede ser producida por diferentes genes [20].

5. Conclusión

Un fragmento de aproximadamente 345 pb amplificados para *Arthrobacter sp.* C27, después de ser secuenciados y analizados permitirán el diseño preciso de primers que permitan identificar el gen completo de la α -amilasa.

La α -amilasa presente en la cepa C27 de *Arthrobacter* no posee la misma secuencia del gen de la que previamente había sido reportada.

6. Agradecimientos

Nuestros agradecimientos son para el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) y para la Facultad de Ciencias de la Vida (FCV) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).

7. Bibliografía

- [1] S. Kim, H. Park, y J. Choi, "Cloning and Characterization of Cold-Adapted α -Amylase from Antarctic *Arthrobacter agilis*", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, oct. 2016.
- [2] L. Loperena *et al.*, "Extracellular enzymes produced by microorganisms isolated from maritime Antarctica", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 28, núm. 5, pp. 2249–2256, may 2012.
- [3] C. Gerday *et al.*, "Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology", *Trends Biotechnol.*, vol. 18, núm. 3, pp. 103–107, mar. 2000.
- [4] G. Comi y C. Cantoni, "PSYCHROTROPHIC BACTERIA | *Arthrobacter spp.*", en *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Elsevier, 2011, pp. 372–378.
- [5] M. Gobbetti y C. G. Rizzello, "Arthrobacter", en *Encyclopedia of Food Microbiology*, Elsevier, 2014, pp. 69–76.
- [6] M. R. Smith y J. C. Zahnley, "Production of amylase by *Arthrobacter psychrolactophilus*", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 32, núm. 7, pp. 277–283, jul. 2005.
- [7] H. Taniguchi y Y. Honnda, "Amylases", en *Encyclopedia of Microbiology*, Elsevier, 2009, pp. 159–173.
- [8] R. Munaganti, V. Muvva, y K. Naragani, "Production of Amylase by *Arthrobacter kerguelensis* VL-RK_09 Isolated from Mango

- Orchards”, *Br. Biotechnol. J.*, vol. 8, núm. 4, pp. 1–10, ene. 2015.
- [9] M. Kuddus, Roohi, Saima, y I. Z. Ahmad, “Cold-active extracellular α -amylase production from novel bacteria *Microbacterium foliorum* GA2 and *Bacillus cereus* GA6 isolated from Gangotri glacier, Western Himalaya”, *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 10, núm. 1, pp. 151–159, jun. 2012.
- [10] S. Wang, J. Jeyaseelan, Y. Liu, y W. Qin, “Characterization and Optimization of Amylase Production in WangLB, a High Amylase-Producing Strain of *Bacillus*”, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 180, núm. 1, pp. 136–151, sep. 2016.
- [11] F. M. Ausubel *et al.*, Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Ringbou edition. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003.
- [12] R. Boyce, P. Chilana, y T. M. Rose, “iCODEHOP: a new interactive program for designing Consensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers from multiply aligned protein sequences”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, núm. Web Server, pp. W222–W228, jul. 2009.
- [13] T. M. Rose, E. R. Schultz, J. G. Henikoff, S. Pietrokovski, C. M. McCallum, y S. Henikoff, “Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 26, núm. 7, pp. 1628–1635, abr. 1998.
- [14] T. M. Rose, J. G. Henikoff, y S. Henikoff, “CODEHOP (Consensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, núm. 13, pp. 3763–3766, jul. 2003.
- [15] M. Arshad and M. Shahbaz, M. I. Hussain, y H. N. Asghar, “SCREENING OF MULTI-TRAITS RHIZOBACTERIA TO IMPROVE MAIZE GROWTH UNDER AXENIC CONDITIONS”, *J. Anim. Plant Sci.*, vol. 23, núm. 2, pp. 514–520, 2013.
- [16] M. R. Smith y J. C. Zahnley, “Characteristics of the amylase of *Arthrobacter psychrolactophilus*”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 32, núm. 10, pp. 439–448, oct. 2005.
- [17] S. Gaffar, D. Permana, D. Natalia, T. Subroto, y S. Soemitro, “Secretory Expression of *Saccharomycopsis fibuligera* R64 α -Amylase with Native Signal Peptide in *Pichia pastoris*”, *Procedia Chem.*, vol. 17, pp. 177–183, 2015.
- [18] J. A. Iserte, B. I. Stephan, S. E. Goñi, C. S. Borio, P. D. Ghiringhelli, y M. E. Lozano, “Family-Specific Degenerate Primer Design: A Tool to Design Consensus Degenerated Oligonucleotides”, *Biotechnol. Res. Int.*, vol. 2013, pp. 1–9, 2013.
- [19] T. M. Rose, E. R. Schultz, J. G. Henikoff, S. Pietrokovski, C. M. McCallum, y S. Henikoff, “Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 26, núm. 7, pp. 1628–1635, abr. 1998.
- [20] F. Kafizadeh y F. Dehdari, “Amylase activity of aquatic actinomycetes isolated from the sediments of mangrove forests in south of Iran”, *Egypt. J. Aquat. Res.*, vol. 41, núm. 2, pp. 197–201, 2015.