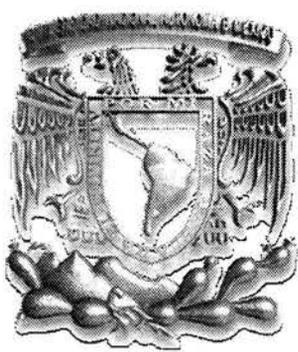


03088

2004



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

“Especificidad y función de la actividad de transglicosidación de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A:
HERIBERTO MANUEL RIVERA

RIVERA, Heriberto Manuel



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Titulo

Especificidad y función de la actividad de transglicosidación de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*

Manuel Heriberto Rivera

Tesis dirigida por la Dra. Gloria Saab Rincón

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

Instituto de Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62271, México.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo receptoral

NOMBRE: Manuel Heriberto Rivera

FECHA: 29/01/04

FIRMA: [Firma manuscrita]

Índice

Prefacio	3
Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
Una breve reseña histórica	6
Sustrato natural de las α -amilasas: almidón	9
Explotación biotecnológica del almidón	10
Enzimas amilólíticas	13
Endo y exoamilasas	13
Enzimas desramificadoras	14
Transferasas	14
La familia de las α -amilasas: características generales	15
Arquitectura de las α -amilasas: dominios y especificidad	16
Mecanismo catalítico	18
Enzimas modificadas	23
Estabilidad térmica de la α -amilasa de <i>B. licheniformis</i>	23
Estabilidad a pH	24
Actividad y especificidad	25
Objetivo general	28
Objetivos particulares	28
Resultados	29
Identificando residuos potenciales para la especificidad	29
Obtención y purificación de la enzima silvestre y mutantes	30
Actividad	31
Papel de los residuos 286 y 263 en el sitio activo	32
Especificidad y perfil de productos	35
Perfil de transferencia mediante el uso de maltosa marcada radiactivamente (G2')	38
Termoestabilidad	40
Discusión	41
Conclusiones	45
Perspectivas	46
Apéndice	47
Material y métodos	47
Bibliografía	69

Prefacio

Generalmente, se asume que las proteínas se encuentran en el óptimo de sus propiedades. Definitivamente, la evolución natural ha sido bondadosa y estas han adquirido propiedades que las hacen funcionales para la célula. Sin embargo, la presión selectiva opera sobre circunstancias que usualmente se desvían de las requeridas en los procesos industriales. La ingeniería de proteínas surge entonces como el sutil pretexto para alcanzar la idea de mejorar las proteínas, ¿un planteamiento humilde?. Como sea, se ha tomado como base el análisis de secuencia de proteínas blanco, encontrando que la evolución provee con información relevante basada en la conservación diferencial de residuos en familias de proteínas, con ligeras discrepancias en su función. En el caso de las enzimas, su función esta definida como su actividad, especificidad (hacia el sustrato o el producto), y su estabilidad a condiciones de pH y temperatura, propiedades inherentes que pueden ser susceptibles de ser mejoradas y en la mayoría de los casos con muy poca gracia, empeoradas.

Resumen

Actualmente, la familia 13 de las glucosil hidrolasas esta formada por enzimas que presentan diferente especificidad de reacción o de productos, algunas de las cuales tienen representantes cuya estructura ha sido resuelta por cristalografía de rayos X. Las estructuras que presentan ligandos se encuentran reportadas para algunos perfiles de producto y típicamente describen la parte del área de unión o pegado del sustrato con configuración α -1,4. La α -amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* presenta coordenadas depositadas en el PDB^a sin ningún análogo del estado de transición unido, por lo que, enzimas quiméricas y modelos tridimensionales han resultado muy útiles para localizar residuos que tienen contacto con el sustrato. Esta enzima es usada ampliamente para depolimerizar el almidón, y aunque es producida por una bacteria no termofílica, permanece activa por varias horas a temperaturas superiores a los 90°C, que son las condiciones industriales en las que se lleva a cabo la hidrólisis de almidón. La α -amilasa de *B. licheniformis* es un modelo interesante para el diseño de proteínas, ya que el pretender mejorar su actividad catalítica, cambiar su especificidad de producto y su estabilidad térmica representa un reto. En el presente trabajo, se encontró una región semi-conservada cercana al sitio activo al comparar amilasas hidrolíticas y transglicosídicas, apuntando que la hidrofobicidad puede jugar un papel importante para modificar la relación transglicosidación/hidrólisis. Derivado de este análisis, se reemplazaron los residuos Val286 por Tyr y Phe en la α -amilasa de *B. licheniformis*. Inesperadamente, las dos mutantes resultantes Val286Phe y Val286Tyr mostraron un comportamiento diferente. La mutante Val286Tyr resultó ser cinco veces más activa para la hidrólisis de almidón que la enzima silvestre. En contraste, la mutante Val286Phe que difiere únicamente por un grupo hidroxilo presentó tres veces menor actividad para la hidrólisis que la enzima silvestre y aparentemente una mayor relación de transglicosidación/hidrólisis. La discusión de estos resultados, se aborda en términos de la afinidad de los subsitios, hidrofobicidad y ambiente electrostático en el sitio activo. La enzima modificada, puede representar una alternativa para la industria de la transformación de almidón, ya que refleja un esfuerzo directo en el ahorro del catalizador como materia de reacción sin modificar el proceso industrial.

^a Banco de datos de proteínas por sus siglas en inglés

Abstract

Glycoside hydrolase family 13 currently comprises enzymes of 28 different specificities, 13 of these have at least one representative whose structure has been determined by crystal structures. Ligand complex structures are reported for fewer specificities and typically they only describe enzyme-sugar interactions for a α -1,4-linked compounds. The highly thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* is one of these enzymes, widely used in converting starch to medium size oligosaccharides. Although it is produced by a non-thermophilic bacterium, it remains active for several hours at temperatures over 90 °C under conditions of industrial starch hydrolysis. The α -amylase from *B. licheniformis* provides therefore an interesting model for protein engineers investigating catalytic activity, product specificity and thermal stability. In the present work we describe the analysis of primary and 3-D structure of homologous amylases to identify the residues involved especially in product specificity and their effect on catalytic activity and thermostability. Specially, we found a semi conserved sequence pattern near the active site between transglycosidic and hydrolytic amylases, which suggested that hydrophobicity may play a role in modifying the transglycosylation/hydrolysis ratio. Derived from this analysis, we replaced residue Val286 by Phe and Tyr in *Bacillus licheniformis* α -amylase.

Surprisingly, the two resultant mutant enzymes, Val286Phe and Val286Tyr showed two different behaviors. Val286Tyr mutant was five-fold more active for hydrolysis of starch than the wild type enzyme. In contrast, the Val286Phe mutant, differing only by one hydroxyl group, was three-fold less hydrolytic than the wild type enzyme and apparently had a higher transglycosylation/hydrolysis ratio. These results are discussed in terms of affinity of subsites, hydrophobicity and electrostatic environment in the active site. The engineered enzyme reported here may represent an attractive alternative for the starch transformation industries as it affords direct and substantial material savings and requires no process modifications.

Introducción

Una breve reseña histórica

El mayor desafío para el progreso de la bioquímica al inicio de los años 80s' fue la dificultad para dirigir la química específicamente hacia las proteínas, de tal manera que se permitiera conocer a detalle la relación entre su estructura y su función. Poco a poco, el campo de la enzimología fue abriendo brecha, de tal forma que los principios básicos que gobiernan la catálisis fueron descritos (Albery and Knowles 1977; Fersht 1977), y el número de estructuras resueltas por cristalografía de rayos X comenzó a incrementarse. Estas estructuras, que mostraron una exquisita claridad estereoquímica, proporcionaron el marco de trabajo para formular mecanismos de acción, donde se pretendía atribuir un papel preciso a grupos funcionales que apuntaban a tener un papel relevante en los sitios activos. Resultaba atractivo poner a prueba las hipótesis emergentes para modificar estos grupos funcionales de manera específica y explorar al mismo tiempo los efectos sobre la actividad. Se comenzó con prestar atención a la modificación química a pesar de los problemas de entendimiento y pobre especificidad que implicaba. En este clima de incertidumbre del conocimiento, arribó la mutagénesis sitio-dirigida^b. La aplicación de ésta técnica se realizó a finales de 1982 y se utilizó para mutar genes de enzimas como la ARNt tirosil sintetasa (Tyr S), (Winter, Fersht et al. 1982) y la β -lactamasa, (Sigal, Harwood et al. 1982) ya que se contaba con información a detalle sobre su mecanismo catalítico y su secuencia. Estos cambios precisos de uno o dos residuos de amino ácidos fueron seguidos más tarde por el intercambio de dominios (Neuberger, Williams et al. 1984) y eventualmente de asas enteras, (Jones, Dear et al. 1986). La construcción de proteínas modificadas y el análisis de sus propiedades generó sin duda un nuevo campo: la ingeniería de proteínas. Esta nueva forma de abordar el estudio de las proteínas, plantea como una posibilidad coherente la modificación de las propiedades que determinan su función^c.

^b Técnica que permite alterar la secuencia de amino ácidos de una proteína

^c El considerar modificar o modular un pulso fino en la evolución, por ejemplo, la catálisis, puede significar para algunos todo un sueño, donde van de la mano la imaginación y el ingenio, sin siquiera pretender encontrar la sombra de la casualidad. Para otros, significa frecuentemente un atentado en contra de un manifiesto natural, generando efectos desastrosos en forma de terrorismo hacia las proteínas.

Al final de la década de los años 80s', la ingeniería de proteínas se enriqueció con el desarrollo de nuevas y mejoradas técnicas de clonación, así como con la síntesis de oligonucleótidos que se convirtieron poco a poco en técnicas convencionales (Merino, Osuna et al. 1992). Tiempo después, se tomó ventaja de la elaboración de nuevas cepas de *Escherichia coli* deletadas en algún gene de interés y del despliegue en fagos que pudieran servir como método de selección genética (McCafferty, Griffiths et al. 1990). Estas estrategias resultaron indispensables para la selección de colecciones de variantes generadas en una proteína dada. Derivado de esto, fueron escogidos cuidadosamente sistemas modelo para estudiar alosterismo, plegamiento y especificidad, lo cual proporcionó información importante sobre estos fenómenos (Matthews 1987; Kantrowitz and Lipscomb 1988; Matouschek, Kellis et al. 1989). Estas contribuciones proporcionaron la plataforma del entendimiento en el plegamiento y la estabilidad de una proteína, (Shortle 1989). De lo anterior, procedieron algunos intentos en el diseño de enzimas con el objeto de alterar su pH óptimo (Russell and Fersht 1987), incrementar su actividad en presencia de solventes no acuosos (Arnold 1990) y desarrollar mejores cualidades en lo que respecta a su termoestabilidad (Van den Burg, Vriend et al. 1998). La habilidad para manipular estas características implicó inmediatamente enfocarse en las enzimas con aplicación industrial. Se proyectaron inmediatamente enzimas con mutaciones sencillas, contribuciones individuales que resaltaron efectos inesperados, a manera de mutaciones egoístas^d. Los frecuentes hallazgos de mutaciones que aparentemente no interaccionan entre sí indicaron un estado aditivo para el entendimiento de la relación entre la secuencia, el plegamiento y la función de las proteínas, propiedades sinérgicas.

Alteraciones en la especificidad de sustrato también fueron notables. Por ejemplo, en la lactato deshidrogenasa una mutación sencilla cambió la selectividad de piruvato a oxaloacetato (Wilks, Hart et al. 1988). En ese mismo sentido, la modificación de una ceto-deshidrogenasa (que consistió en cinco mutaciones) amplió su espectro de especificidad, aceptando sustratos más ramificados (Wilks, Halsall et al. 1990).

^d Una mutación egoísta origina efectos inesperados sobre las propiedades de una proteína y pone de manifiesto un estado de ignorancia, bendita cualidad.

El reemplazo de una asa de una fenil-lactato deshidrogenasa hacia una lactato deshidrogenasa generó una función de tapa que encerraba al sitio activo incrementando la selectividad hacia moléculas con un volumen mayor ^e (Wilks, Moreton et al. 1992). Estos experimentos insistían en la capacidad racional de modificar la especificidad de las enzimas. Desde esta perspectiva, las α -amilasas sugieren ser un excelente modelo para modificar sus propiedades con potencial industrial considerando la posibilidad de extender el espectro de sus aplicaciones (ver figura 1)

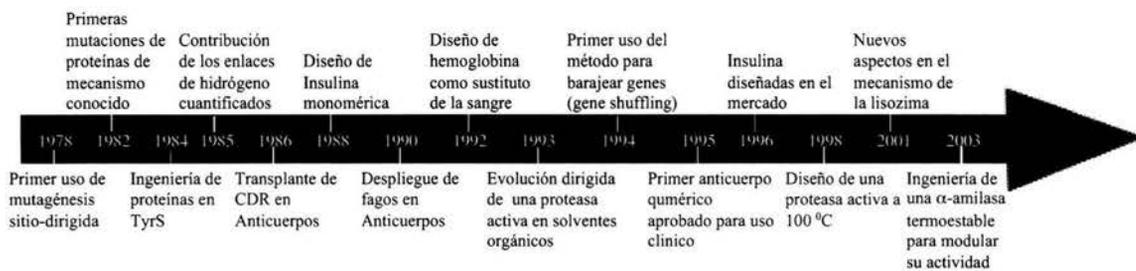


Figura 1. Desarrollo de la ingeniería de proteínas a 20 años de su inicio. CDR, regiones que determinan la complementariedad. TyrS, tirosil ARNt sintetasa (modificado de Brannigan, J. Nature, 2002).

^e Las enzimas son fuente inagotable de inspiración debido a la exquisita especificidad que presentan, sin embargo, algunas muestran cierto grado de promiscuidad que se ha utilizado como un evento sensacionalista

Sustrato natural de las α -amilasas: almidón

Las plantas sintetizan almidón como resultado de la fotosíntesis, proceso mediante el cual la energía del sol se convierte en energía química. El almidón es sintetizado en plástidos presentes en hojas como un componente de almacenamiento. También es producido en amiloplastos encontrados en semillas y raíces. En estos organelos, el almidón se acumula en forma de gránulos insolubles en agua. La forma y diámetro de estos gránulos depende de la fuente natural (Robyt 1998).

El almidón es almacenado y usado en procesos químicos o enzimáticos para generar diferentes productos, tales como jarabes glucosados y fructosados, así como maltodextrinas (Mds) y ciclodextrinas (Cds). Además, es usado como fuente de alimento natural. A pesar del amplio número de plantas que producen almidón, únicamente algunas son relevantes para la obtención de este polisacárido. La fuente principal para la industria son: maíz, tapioca, papa y trigo (van der Maarel 2002).

El almidón es un polímero de glucosa unido mediante el oxígeno del carbono 1 (C1), conocido como enlace glucosídico. Este enlace es estable a valores de pH altos, pero se hidroliza bajo condiciones ácidas. El extremo de este polisacárido se caracteriza por presentar un grupo aldehído, conocido como extremo reductor. Este polisacárido está formado por dos tipos de polímeros: i) amilosa y ii) amilopectina. La amilosa es una cadena lineal que consiste en aproximadamente 6000 unidades de glucosa con enlaces glucosídicos α ,1-4. El número de residuos de glucosa también se indica con el término “*grado de polimerización (DP)*” dependiendo de su origen, por ejemplo, la amilosa de papa o tapioca tiene un DP de 1000-6000, en tanto que la amilosa de maíz o trigo presenta un DP de 200-1200. El contenido de amilosa promedio en almidón varía de entre 20 y 25%. La amilopectina consiste de cadenas lineales cortas de 10-60 unidades de glucosa con enlaces α ,1-4 y cadenas ramificadas de 15-45 unidades de glucosa con enlaces α ,1-6. El promedio de ramificaciones en la amilopectina es de alrededor del 15% y está relacionado con su origen. Esta cadena ramificada contiene aproximadamente 2 000 000 unidades de glucosa, siendo una de las moléculas más grandes en la naturaleza (Myers 2000).

Los gránulos de almidón se encuentran organizados en regiones amorfas y cristalinas. Las regiones cristalinas están formadas principalmente por amilopectina, mientras que la amilosa está presente en las regiones amorfas. La amilosa es parcialmente soluble en agua, en tanto que la amilopectina, contenido principal de los gránulos de almidón, es completamente insoluble. Esta propiedad hace relativamente fácil extraerlos de la fuente. Cuando la suspensión agua-almidón es calentada, los gránulos atrapan moléculas de agua provocando un estado de parcial viscosidad, proceso conocido como gelatinización. Finalmente, los gránulos se rompen resultando en un completo estado de dispersión coloidal con alta viscosidad. El enfriamiento subsecuente del concentrado, resulta en la formación de un gel elástico, estado conocido como retrogradación. Durante éste paso, el almidón experimenta un cambio de un estado disociado a un estado asociado. La retrogradación es causada principalmente por la amilosa; la amilopectina por su condición ramificada no favorece este proceso (Buleón 1998).

Explotación biotecnológica del almidón

La industria del almidón es uno de los principales usuarios de las enzimas que utilizan este polímero como sustrato. Este polisacárido requiere de varias enzimas para su hidrólisis completa. Estas incluyen α -amilasas, isoamilasas o pullulasas, glucoamilasas o β -amilasas y CGTasas (Poonam and Dalel 1995). El mercado global para las enzimas que procesan almidón es alrededor de US\$ 156 millones, y el costo de las enzimas usadas en el proceso de licuefacción representa 24% del costo total (US\$ 37 millones) (Crabb and Mitchinson 1997). Por lo tanto, cualquier mejoramiento en el rendimiento, termoestabilidad, actividad o especificidad hacia los productos tendrá un impacto económico directo sobre este campo. La conversión enzimática del almidón incluye los siguientes pasos: i) la gelatinización, involucra la disolución de los gránulos de éste polisacárido, formando una suspensión viscosa, ii) la licuefacción consiste en la hidrólisis parcial y la pérdida de la viscosidad de la suspensión, evitando la retrogradación, y iii) la sacarificación, precisa la producción de glucosa, maltosa o ciclodextrinas utilizando diversas enzimas. El uso de enzimas en el procesamiento industrial del almidón se realiza después de la gelatinización a altas temperaturas; motivo por el que se emplean α -amilasas

termoestables para depolimerizar el almidón hacia maltodextrinas y jarabes de maíz mediante una hidrólisis controlada, proceso conocido como licuefacción. Previo a este paso, se establece la concentración deseada de almidón insoluble, se ajusta el pH y finalmente se adiciona la α -amilasa de *B. licheniformis* con iones calcio (Guzman-Maldonado and Paredes-Lopez 1995). El almidón insoluble se bombea a través de un inyector, donde la temperatura se incrementa a 140°C durante un intervalo de tiempo de 5 a 10 minutos. El almidón gelatinizado se deposita en un reactor de licuefacción, donde se realiza una rápida digestión del almidón a 90°C. Durante este paso y dependiendo del tiempo de reacción, se producen oligosacáridos de diferente tamaño. El almidón licuado es sustrato de otras enzimas para la producción de glucosa, maltosa, α , β , y γ Cds ó Mds (Guzman-Maldonado and Paredes-Lopez 1995; Crabb and Bolin 1999; Santamaria, Del Rio et al. 1999). Muchos de estos procesos requieren de dos o más enzimas que son funcionales bajo diferentes condiciones de reacción. En el proceso de sacarificación la glucoamilasa hidroliza el almidón licuado hacia oligosacáridos de bajo peso molecular, compuestos que son utilizados por otras enzimas para generar jarabes glucosados o maltosados. En este paso, se modifican las condiciones de temperatura (60°C) y de pH (4.2-4.5). El tiempo de reacción para este proceso tiene una duración de 36-96 horas aproximadamente. El producto resultante es empleado para generar jarabes fructosados mediante un paso de isomerización utilizando la enzima glucosa-isomerasa. Esta enzima requiere de un nuevo ajuste en el pH (7.0-8.0). Una característica importante de los jarabes fructosados es que disminuyen el punto de congelación de los alimentos, estabilizan el sabor cítrico de los productos derivados de frutas enlatadas y aumentan la viscosidad del medio dándole un mejor aspecto. Para la producción de jarabes maltosados a partir del almidón licuado, se emplean normalmente β -amilasas o α -amilasas fungales, así como amilasas desramificadoras. Estas enzimas requieren de condiciones diferentes de pH, y de temperatura. Existen tres tipos de jarabes maltosados basados en el porcentaje contenido de maltosa: i) jarabes con extremadamente alto contenido de maltosa (70-85%) ii) jarabes con alta maltosa (35 -60%) y iii) jarabes concentrados de maltosa 30-50%, con un contenido alto de glucosa (35-45%). En general, estos jarabes son utilizados en la industria confitera, cosmética y pastelera, como texturizantes, acondicionadores-hidratantes para el pelo y agentes que promueven el volumen en pasteles, respectivamente. Para la producción de

ciclodextrinas se emplean CGTasas como biocatalizadores, estas enzimas utilizan el almidón licuado como sustrato, pero requieren de condiciones de pH y temperatura diferentes a los empleados en la licuefacción por lo que es necesario cambiar estos parámetros. Las Cds son oligosacáridos cíclicos muy estables^f, su particular forma les proporciona la propiedad de encapsular moléculas más pequeñas. En soluciones acuosas, la cavidad de la Cds es ocupada por moléculas de agua. Esta interacción es energéticamente desfavorable por lo que el agua es desplazada por moléculas menos polares. Las α -Cds forman inclusiones con alcoholes pequeños y gases como etileno o dióxido de carbono. Las β -Cds forman complejos con naftoles o esteroides, mientras que las γ -Cds aceptan moléculas grandes como la vitamina D. Estos oligosacáridos presentan gran potencial en el área de inclusión de sabores ya que pueden estabilizar materiales volátiles así como solubilizar componentes orgánicos reduciendo su toxicidad (Guzman-Maldonado and Paredes-Lopez 1995). Idealmente, podría pensarse en la integración total o parcial desde la primera etapa del proceso, al contar con una enzima termoestable capaz de producir oligosacáridos pequeños o glucosa, sin cambiar las condiciones de reacción después de la licuefacción, resultando en una disminución en el gasto económico y ambiental (ver figura 2).

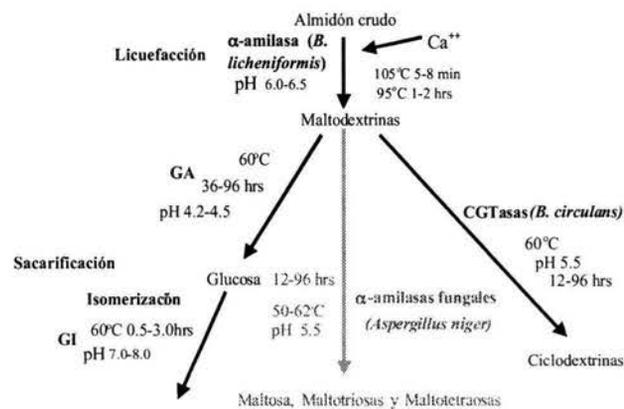


Figura 2. Procesamiento industrial del almidón para la producción de glucosa, fructosa, jarabes fructosados y oligosacáridos con nuevas propiedades. Este proceso requiere del uso de más de una enzima, como son, α -amilasas bacilares y fungales, CGTasas, glucosa isomerasas, (GI) y glucoamilasas (GA), todas estas de origen bacilar. Nótese que cada enzima opera bajo condiciones diferentes de pH y temperatura (Shaw A.T. et al., *Current opinion in Biotechnology*, 1999).

^f Los oligosacáridos cíclicos con 6, 7 ó 8 residuos de glucosa se denominan α , β , y γ ciclodextrinas, respectivamente.

Enzimas amilolíticas

Existe una amplia variedad de enzimas intracelulares y extracelulares que son capaces de utilizar el almidón como fuente de carbono y energía para los organismos que las producen. Básicamente encontramos cuatro grupos: i) endoamilasas, ii) exoamilasas, iii) enzimas desramificadoras y iv) transferasas, ver figura 3 (Smith 1999).

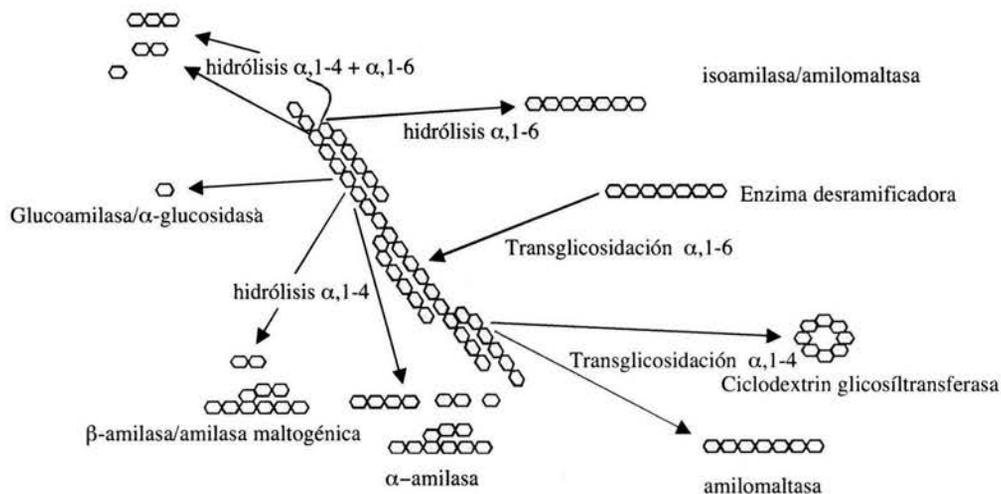


Figura 3. Enzimas relacionadas con la degradación de almidón y su especificidad con los enlaces glucosídicos. El anillo sin relleno representa el extremo reductor de los azúcares.

Endo y exoamilasas

Las endoamilasas son capaces de romper el enlace $\alpha,1-4$ presente en la parte interna (endo) de la amilosa y la amilopectina. La α -amilasa (EC 3.2.1.1) es una endoamilasa ampliamente distribuida en la naturaleza. Los productos finales de la acción de la α -amilasa son oligosacáridos de tamaño variable (Pandey 2000). Las exoamilasas actúan sobre los residuos externos de glucosa de la amilosa o amilopectina produciendo glucosa o β -dextrinas. Estas enzimas, también son capaces de romper el enlace glucosídico $\alpha,1-4$, tal como lo realiza la β -amilasa (EC 3.2.1.2) o ambos, $\alpha,1-4$ y $\alpha,1-6$, como lo hace la glucoamilasa (EC 3.2.1.3) o la α -glucosidasa (EC 3.2.1.20), respectivamente. La β -amilasa y la glucoamilasa, también son capaces de convertir la configuración del carbono

anomérico de la maltosa liberada de α a β . La glucoamilasa y la α -glucosidasa difieren en la preferencia hacia el sustrato: la α -glucosidasa actúa sobre maltooligosacáridos pequeños y libera glucosa con configuración α , mientras que las glucoamilasas hidrolizan cadenas largas. Otras enzimas amilolíticas con actividad exo son: las ciclodextrin glucanotransferasas (EC 2.4.1.19), enzimas que adicionalmente presentan actividad transglucosídica; las α -amilasas maltogénicas (glucan 1,4- α -glucanohidrolasas, EC 3.2.1.133); las amilasas que liberan maltosa en configuración α y las amilasas formadoras de maltooligosacáridos, (maltotetraosa o malthexaosa) (Momma 2000; Pandey 2000).

Enzimas desramificadoras

El tercer grupo de biocatalizadores que actúan sobre el almidón esta formado por las enzimas desramificadoras que hidrolizan exclusivamente los enlaces α ,1-6: la isoamilasa (3.2.1.68) y la pullulanasa tipo 1 (EC 3.2.1.41) son un ejemplo. La mayor diferencia entre estas dos enzimas es la habilidad para hidrolizar pullulano, polisacárido con unidades de maltotriosas repetidas con enlaces α ,1-6. (Israilides et al., 1999). Las pullulanases hidrolizan el enlace glucosídico α ,1-6 presente en el pullulano y en la amilopectina. Estas enzimas degradan principalmente amilopectina, dando como resultado polisacáridos lineales muy extensos. Existen diversos tipos de pullulanases que hidrolizan tanto el enlace glucosídico α ,1-4 como el α ,1-6. Entre estas se encuentran, las pullulanases del grupo II, también referidas como α -amilasa-pullulanases o amilopullulanases. Los principales productos de degradación de estas enzimas son: maltosa y maltotriosa. La neopullulanasa realiza reacciones de transglucosidación con la formación de nuevos enlaces α ,1-4 y α ,1-6 (Takata 1992).

Transferasas

El último grupo de enzimas que depolimerizan el almidón son las transferasas que rompen el enlace α ,1-4 de una molécula donadora y lo transfiere a una molécula aceptora formando un nuevo enlace glucosídico. Enzimas como la amilomaltasa (EC 2.4.1.25) y la ciclodextrin glucosiltransferasa (CGTasa) (EC 2.4.1.19) forman un nuevo enlace

glucosídico α ,1-4, mientras que la enzima ramificadora (EC 2.4.1.18) realiza nuevos enlaces α ,1-6. Las CGTasas tienen baja actividad hidrolítica y producen oligosacáridos cíclicos con 6, 7 o 8 residuos de glucosa y dextrinas muy ramificadas de alto peso molecular. Las ciclodextrinas son producidas a partir de reacciones de transferencia donde la enzima rompe el enlace α ,1-4 y concomitantemente unen el extremo no reductor con el extremo reductor (Van deer Veen 2000). A diferencia de las CGTasas, las amilomaltasas llevan a cabo reacciones de transglucosidación generando productos lineales. Las enzimas glucano ramificadoras están involucradas en la síntesis de glucógeno y son responsables de la síntesis de enlaces glucosídicos α ,1-6 (Kiel 1991).

La familia de las α -amilasas: características generales

Las α -amilasas (α -1,4-glucan 4-glucano-hidrolasas, EC 3.2.1.1) están ubicadas dentro de la superfamilia de las glucosidasas (ver tabla I) y se caracterizan por catalizar la hidrólisis del enlace glucosídico α -1,4 en el almidón. Se agrupan dentro de la familia 13 de acuerdo a la clasificación de las glucosil hidrolasas (Henrissat and Bairoch 1996; Brzozowski and Davies 1997; Davies, Mackenzie et al. 1998). Este grupo de enzimas presentan las siguientes características: i) actúan sobre enlaces α -glucosídicos e hidrolizan este enlace para producir mono y oligosacáridos α -anoméricos, forman enlaces glucosídicos α ,1-4 o 1-6 o la combinación de ambos; ii) poseen un plegamiento $(\beta/\alpha)_8$ en forma de barril TIM que contiene el sitio activo; iii) presentan cuatro regiones conservadas en su estructura primaria donde figuran los residuos que forman el sitio catalítico, así como los residuos que son esenciales para la estabilidad del barril (Nagano 1999).

Tabla I. Lista de la superfamilia de las glucosidasas			
Código de acceso al PDB	Nombre de la proteína	Números E.C.	Familia definida por Henrissat
1cgt	Ciclodextrin glucosiltransferasa	2.4.1.19	13
1ava	α -amilasa	3.2.1.1	13
2aaa	α -amilasa	3.2.1.1	13
1ppi	α -amilasa	3.2.1.1	13
1bli, 1vjs	α -amilasa	3.2.1.1	13
1bag	α -amilasa	3.2.1.1	13
1byb	β -amilasa	3.2.1.2	14
1b9z	β -amilasa	3.2.1.2	14
1ceo	Celulasa	3.2.1.4	5
1eceA	Celulasa	3.2.1.4	5
1edg	Endoglucanasa	3.2.1.4	5
1egzA	Endoglucanasa	3.2.1.4	5
1xyzA	Xilanasa	3.2.1.8	10
1uok	Oligo-1,6-glucosidasa	3.2.1.10	13
1ctn	Chitinasa	3.2.1.14	18
2hvm	Hevamina	3.2.1.14	18
1cgb, 2myr	β -glucosidasa	3.2.1.21	1
1bglA	β -galactosidasa	3.2.1.23	2
1gowA	β -glucosidasa	3.2.1.23	1
1bhgA	β -glucuronidasa	3.2.1.31	2
1ghs	β -glucanasa	3.2.1.39	17
1qba	Chitobiasa	3.2.1.52	20
1amg	1,4- α -D-glucan maltotetrahidrolasa	3.2.1.60	20
1bf2	Isoamilasa	3.2.1.68	13
1bqcA	β -Mananasa	3.2.1.78	5
2ebn	Endo- β -N-acetilglucosaminidasa	3.2.1.96	18
1bvz	Neopullulansa	3.2.1.135	13

Las familias están ordenadas por números establecidos por la comisión de enzimas (E.C.).

Los miembros de la familia 13 a la que pertenecen las α -amilasas, presentan un mayor número de coordenadas depositadas en el PDB.

Arquitectura de las α -amilasas: dominios y especificidad

Un factor característico de las enzimas de la familia de las α -amilasas es que retienen la configuración α del carbono anomérico. Sin embargo, presentan una amplia variedad en especificidad hacia el sustrato y los productos. Estas diferencias se pueden atribuir a la presencia de diferentes dominios alrededor del dominio catalítico o diferencias en el número de subsitios de unión al sustrato presentes en el sitio activo. El dominio más conservado en los miembros de esta familia es el dominio A, que consiste en la estructura simétrica en forma de barril descrito anteriormente. El barril $(\beta/\alpha)_8$ fue descrito por primera vez en la triosa-fosfato-isomerasa (TIM) del músculo de pollo. Este plegamiento no está presente únicamente en los miembros de las amilasas, de hecho, está ampliamente distribuido en la naturaleza con diversas funciones catalíticas (Nagano 2002). Los residuos altamente conservados involucrados en la catálisis y en la unión al sustrato se encuentran localizados en asas presentes en el carboxilo-terminal de las hojas β . Todas las enzimas de

la familia de las α -amilasas presentan un dominio B que interrumpe al dominio A entre la tercera hoja β y la tercera hélice α . Es el dominio menos conservado en estructura y su longitud es variable. Se piensa que tiene un papel fundamental en la especificidad de productos, así como en la estabilización, ya que presenta sitios de unión a metales (Nagano, Porter et al. 2001), (ver figura 4).

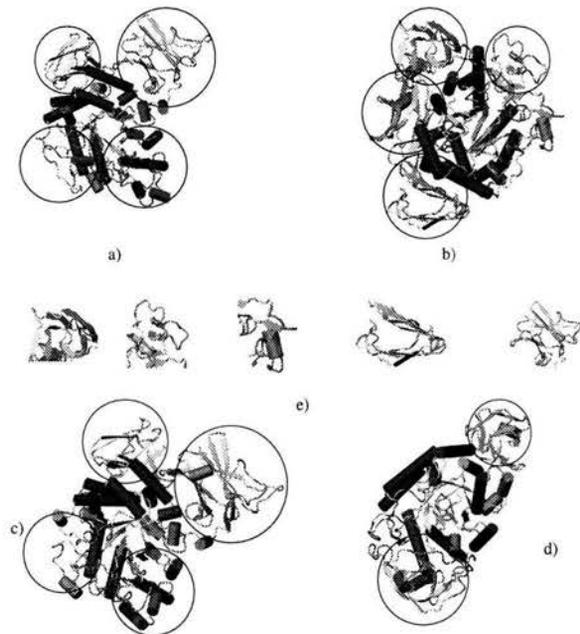


Figura 4. Representación de la estructura secundaria de proteínas homólogas que degradan almidón. Cada una de estas enzimas presenta un dominio estructural en forma de barril TIM y diferentes dominios que se sugiere son intercambiables. a) Neopullulanasa de *Thermoactinomyces vulgaris* (1bvz), b) amilasa maltogénica de *Thermus specie* (1sma), c) CGTasa de *Bacillus circulans* (1cgt) y d) α -amilasa de *B. licheniformis* (1vjs). Estas enzimas muestran diferencias en su especificidad hacia el sustrato y los productos. e) La diversidad de dominios o módulos de los miembros de la familia de las glucosil hidrolasas. Entre paréntesis se muestra el código de acceso al PDB.

demás del dominio B, las proteínas miembros de la familia 13 tienen un tercer dominio denominado dominio C que muestra un motivo en forma de llave griega (☞) localizado en el lado opuesto del barril. La función de éste dominio es desconocida, pero algunas mutaciones realizadas en la α -amilasa de *B. stearothermophilus* sugieren que su función esta relacionada con la estabilidad y el pegado al amidón crudo (Holm 1990). En las CGTasas, este dominio presenta un sitio de unión a maltosa y esta involucrado en la unión al sustrato natural (Lawson 1994; Penninga, et al 1996). En la α -amilasa maltogénica y en la CGTasa, el dominio C esta seguido por el dominio D. La función de éste dominio no es

clara. Algunas otras enzimas además presentan un dominio extra, el dominio E que interactúa directamente con el almidón crudo (Knegtel 1995). Otros dominios presentes en las enzimas con actividad endo o que hidrolizan el enlace glucosídico $\alpha,1-6$ de sustratos ramificados son: El F, el H o el G, que se encuentran ubicados en el extremo amino-terminal y cuya función no está bien definida todavía (Dalmia 1995).

Mecanismo catalítico

El enlace glucosídico es muy estable ya que presenta una velocidad espontánea de hidrólisis de aproximadamente $2 \times 10^{-15} \text{ s}^{-1}$ a temperatura ambiente (Carlow 1998). Los miembros de la familia de las α -amilasas aumentan esta velocidad enormemente, por lo que pueden ser considerados dentro de las enzimas más eficientes en la naturaleza. La CGTasa, por ejemplo, tiene una velocidad de hidrólisis de 3 s^{-1} (Van der Veen 2000) y por lo tanto incrementa la velocidad 10^{15} veces. El mecanismo catalítico para esta familia es la retención de la configuración α del carbono anomérico que se realiza a partir de un doble desplazamiento. El mecanismo involucra dos residuos catalíticos en el sitio activo; un ácido glutámico (261, numeración de la α -amilasa de *B. licheniformis*) que funciona como ácido/base y un aspártico (231) que funciona como nucleófilo (ver figura 5).

Este implica cinco pasos: 1) después de la unión del sustrato al sitio activo, el ácido glutámico en forma ácida dona un protón al oxígeno del enlace glucosídico (el oxígeno entre dos moléculas de glucosa en los subsitios -1 y $+1$) y el aspártico nucleofílico ataca al C1 de la glucosa en el subsitio -1 ; 2) el estado de transición en forma de oxocarbonio es seguido de un intermediario covalente; 3) la molécula de glucosa protonada en el subsitio $+1$ es liberada del sitio activo formándose un intermediario; 4) mientras que una molécula de agua o un nuevo residuo de glucosa se mueve hacia el sitio activo donde es activada por el glutámico y ataca el enlace covalente entre la unidad de glucosa en el subsitio -1 y el aspártico 231 formándose nuevamente un estado de transición en forma de oxocarbonio; 5) el glutámico en su forma básica, acepta un hidrógeno del aceptor (agua u otra molécula de sustrato) en el subsitio $+1$, el oxígeno del aceptor entrante reemplaza el oxocarbonio unido entre la glucosa en el subsitio -1 y el aspártico 231, formando un nuevo grupo hidroxilo en

la posición del C1 de la glucosa en el subsitio -1 (hidrólisis) o un nuevo enlace glucosídico entre la glucosa en el subsitio -1 y +1 (transferencia). Recientemente, se ha descrito un intermediario covalentemente que se forma después del estado de transición en la CGTasa de *B. circulans* 251 y se ha propuesto de manera general para los demás miembros de la familia 13, (Uidehaag 1999). El mecanismo de doble desplazamiento descrito arriba fue propuesto originalmente por Koshland (1953), donde únicamente dos de los tres residuos conservados en el sitio activo juegan un papel relevante. El tercer residuo, un segundo aspártico (328) une los grupos OH-2 y el OH-3 del sustrato a través de enlaces de hidrógeno y juega un papel en la distorsión del sustrato (Uitdehaag 1999). Otros residuos conservados son la arginina (236) y la histidina (327). Se ha sugerido que estos residuos juegan un papel importante en el posicionamiento correcto del sustrato sobre el sitio activo (polarización de la estructura electrónica del sustrato), en la orientación apropiada del nucleófilo, y en la estabilización del estado de transición⁸ (Uitdehaag 1999; Strokopytov 1996; Lawson 1994).

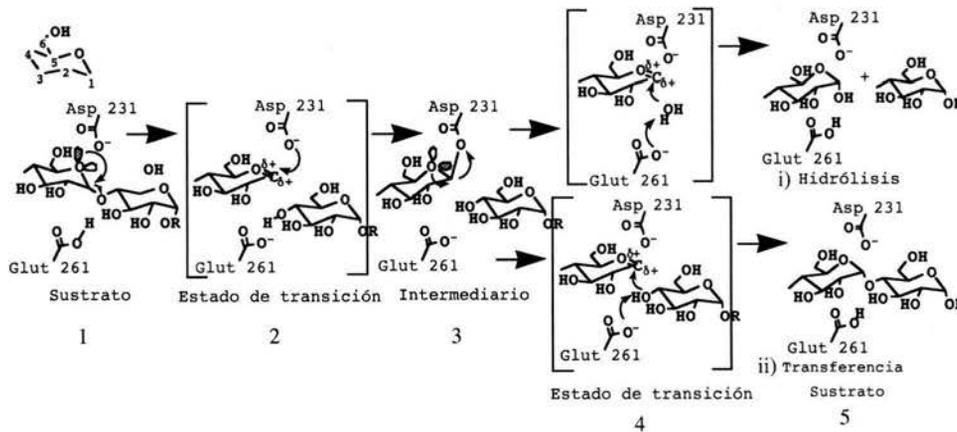


Figura 5. Mecanismo de reacción de las α-amilasas. En una primera etapa se realiza la formación del intermediario vía estado de transición. En la segunda, el Glu261 (numeración de la α-amilasa de *B. licheniformis*) activa a un aceptor que subsecuentemente reacciona con el intermediario permitiendo la formación del producto a través de dos vías (ver texto); i) hidrólisis, donde el agua es la molécula aceptor y ii) transferencia, donde el posible aceptor es una molécula de sustrato. La nomenclatura de los átomos del anillo glucosídico se muestran en la parte superior izquierda. Los orbitales representan los electrones orientados en posición apropiada para participar en el rompimiento del enlace glucosídico de acuerdo a la teoría electrónica.

⁸ Es increíble como de repente se puede apreciar un estado de incertidumbre, sugerido en residuos con tantas funciones que explican la parte oscura del sueño...

En enzimas cuyos sustratos son cadenas poliméricas, la actividad catalítica resulta afectada por los sitios de unión al sustrato. Estos sitios de unión al sustrato se conocen como subsitios ^h, y son un aporte extra que ayuda a explicar la especificidad de productos. Las primeras enzimas en adquirir la nomenclatura de subsitios fueron las serin-proteasas y nucleasas (Schechter and Berger 1967), y posteriormente las glucosil hidrolasas (Davies, Wilson et al. 1997). En estas últimas, el número de subsitios, la energía de interacción de cada uno de ellos y la capacidad de hidrólisis han sido determinados experimentalmente (Allen and Thoma 1976; Allen and Thoma 1976; Allen 1980). Existen dos criterios esenciales para asignar un subsitio: i) debe indicar la posición del subsitio relativo al sitio de corte y ii) no debe cambiar la forma de precisarlo aún cuando se encuentre formando un complejo con un sustrato diferente. Los subsitios son designados de $-n$ a $+n$ (donde n es un entero). El extremo no reductor se encuentra representado por $-n$, en tanto que $+n$ representa el extremo reductor, tomando en cuenta la ubicación donde se realiza el corte (entre -1 y $+1$) del enlace glucosídico (ver figura 6).

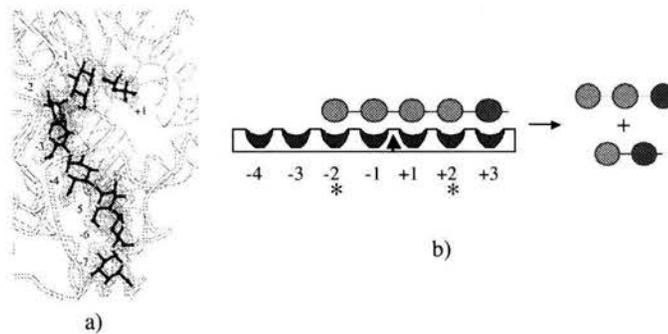


Figura 6. Nomenclatura $-n$ a $+n$ de los subsitios en las glucosil- hidrolasas. a) sitio activo de una ciclodextrin glucano transferasa (CGTasa) donde se muestran las unidades de glucosa sobre los subsitios, (Dijkstra, M. *et al.* Biochemistry, 2000) y b) representación esquemática de los subsitios. Las unidades de glucosa muestran el extremo reductor en morado y el extremo no reductor del sustrato en naranja. Los asteriscos muestran los subsitios de mayor afinidad hipotéticos y el posible perfil de productos tomando como sustrato a una maltopentaosa (Davies, G. 1997).

^h Un subsitio esta definido como un conjunto de residuos de aminoácidos que tienen contacto con una unidad de glucosa del sustrato

La identificación de los subsitios en diferentes glucosil hidrolasas ha sido útil para desarrollar diferentes modelos que expliquen los distintos perfiles de productos (ver tabla II).

Tabla II. Enzimas que degradan almidón y sus diferencias más notables en lo que respecta a su especificidad de productos, temperatura y pH óptimos, mostrando la diversidad en los miembros de la familia de las glucosil hidrolasas.

Organismos *	Enzima	pH óptimo	Temperatura óptima °C	Productos principales
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	α -amilasa	5.5	50-70	G ₆
<i>Bacillus licheniformis</i>	α -amilasa	5.0-8.0	90-105	G ₂ G ₃ G ₅
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	α -amilasa	6.0-9.0	70-80	G ₅ G ₆
<i>Bacillus subtilis</i>	α -amilasa	6.0	50	G ₆
<i>Aspergillus niger</i>	α -amilasa	5.0-6.0	60	G ₁ G ₂ G ₃
<i>Aspergillus oryzae</i>	α -amilasa	5.5-5.9	40	G ₂ G ₃
<i>Saccaromycopsis fibuligera</i>	α -amilasa	5.5	60	G ₃ G ₄ G ₅
<i>Mucor pusillus</i>	α -amilasa	3.5-4.0	65-70	G ₁ G ₄ G ₅
<i>Bacillus circulans</i>	CGTasa	5.5	60	Ciclodextrinas
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Ama	4.5-5.5	55	G ₂

* La fuente y el tipo de enzima se denotan en diferentes colores. En negro α -amilasas bacilares, en rojo α -amilasas fungales y en azul transferasas naturales como ciclodextrin glucano transferasas (CGTasas) y amilasa maltogénica (Ama).

Actualmente se conocen estructuras tridimensionales de α -amilasas formando complejos con acarbosa (ver tabla III).

Tabla III. Lista de distintas enzimas amilolíticas con estructura disponible en el PDB con su análogo del estado de transición

Código de acceso al PDB	Molécula	Fuente	Resolución	Ligando	Comentarios
7taa	α -amilasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	1.98	Acarbosa	-
1aqm	α -amilasa	<i>Alteromonas haloplanctis</i>	1.85	Ca ²⁺ , Cl y Tris	-
1aqh	α -amilasa	<i>Alteromonas haloplanctis</i>	2.0	Ca ²⁺ , Cl	-
1bli	α -amilasa	<i>B. licheniformis</i>	1.9	3 Ca ²⁺ , Na ⁺	Mutante: Asn190Phe, Gln264Ser, Asn265Tyr
1E37	α -amilasa	<i>B. amyloliquefaciens/licheniformis</i>	1.93	Deca-acarbosa	Quimera: 1e37 (32-331)/1bli (330-512)
1bag	α -amilasa	<i>B. subtilis</i>	2.5	Ca ²⁺ , maltopentaosa	Mutante: Glu208Gln
1qho	Amilasa maltogénica	<i>B. stearothermophilus</i>	1.7	Maltosa y acarbosa	-
1q13	Maltotetrahidrolasa	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.0	Maltotetraosa	Mutante: Asp193Asn, Glu219Gly, Asp294Asn
1bf2	Isoamilasa	<i>Pseudomonas</i>	2.0	Ca ²⁺	-
1giy	Neopullulanasa	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	3.0	β -ciclodextrinas	-
1esw	Amilomaltasa	<i>Thermus aquaticus</i>	1.9	Acarbosa	-

La acarbosa es un efectivo inhibidor de α -amilasas, glucosidasas y sacararas. Presenta una estructura similar al de la maltotetraosa (G4), que contiene una maltosa normal y una pseudo-maltosa indicados como los residuos A y B (ver figura 7).

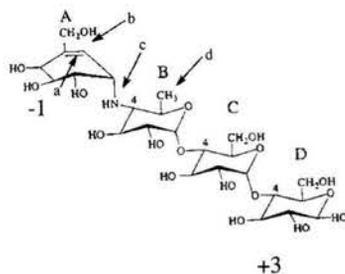


Figura 7. Representación esquemática de la acarbosa. Las flechas denotan las cuatro diferencias entre la maltotetraosa y la acarbosa. a) un doble enlace ha sido introducido en el residuo A entre los carbonos C5 y C7; b) el oxígeno O5 del residuo A ha sido sustituido por un átomo de carbono (C7); c) el oxígeno glucosídico entre los residuos A y B ha sido remplazado por un enlace N-glucosídico; d) el grupo hidroxilo en el C6 de la glucosa B esta ausente. Se muestran los residuos de glucosa sobre los subsitios que ocupa este inhibidor sobre el sitio activo -1 y +3.

Este inhibidor consiste en un ciclitol insaturado llamado valienamina, y un 4-amino-4,6-dideoxiglucosa que se asemeja al estado de transición. Con la ayuda de este inhibidor así como mutantes inactivas se ha logrado establecer que en el surco de unión al sustrato de la enzima se pueden ubicar de 4-10 unidades de glucosa (dependiendo de la fuente de la α -amilasa). Este inhibidor se produce mediante fermentación de cepas de *Actinoplanes* y se usa como droga para pacientes que padecen diabetes (Strokopytov, Penninga et al. 1995).

Enzimas modificadas

Estabilidad térmica de la α -amilasa de *B. licheniformis*

Las condiciones que prevalecen en las aplicaciones industriales donde las enzimas se utilizan son extremas, particularmente respecto al pH y la temperatura. Por esta razón, gran parte del trabajo de la ingeniería de proteínas en las α -amilasas se ha enfocado en incrementar la estabilidad hacia la temperatura y en ampliar su operatividad a diferentes intervalos de pH (Declerck, Joyet et al. 1995; Declerck, Machius et al. 1997; Igarashi, Hatada et al. 1998; Igarashi, Ozawa et al. 1999; Nielsen, Beier et al. 1999; Shaw, Bott et al. 1999; Declerck, Machius et al. 2000; Nielsen and Borchert 2000; Nielsen, Borchert et al. 2001; Declerck, Machius et al. 2003). Como una estrategia para identificar las regiones relacionadas con las propiedades inherentes de esta enzima, se han construido híbridos o enzimas quiméricas a partir de enzimas homólogas. Por ejemplo, Susuki et al., 1989 generó un híbrido entre la α -amilasa de *B. licheniformis* y la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens*. Estos híbridos permitieron identificar dos regiones importantes para la termoestabilidad. De la misma manera, Conrad et al., (1995) identificó residuos importantes para la estabilidad de la α -amilasa de *B. licheniformis* ubicados principalmente en el dominio B y el barril TIM. Otro método para encontrar regiones que contribuyen con la especificidad fue utilizado por Borchert, et al., (1999). El autor comparó los sitios activos y sus alrededores entre α -amilasas mesófilas y termófilas. De esta manera, identificó regiones relevantes para la hoy α -amilasa comercial (Thermamyl™). Las regiones identificadas se ubican entre la posición 181-195, 141-149 (dominio B), 456-463 (dominio C) y aminoácidos individuales en la posición 311, 346, 385 (dominio catalítico). Cabe mencionar, que muchas de las

mutaciones que se plantearon en este trabajo, se publicaron previa y de manera independiente por Dekclerk y Machius (Machius, Declerck et al. 1998).

Se han identificado variantes hipertermoestables de la α -amilasa de *B. licheniformis* que sugieren que su estabilización térmica esta dirigida por los siguientes factores: i) una extensión del concepto del incremento en el empaquetamiento hidrofóbico, usualmente aplicado a las cavidades y parches en la superficie (Machius, Declerck et al. 2003) ii) introducción de interacciones entre residuos aromáticos-aromáticos (Declerck, Machius et al. 2003), iii) estabilización específica de sitios intrínsecos de unión a metales (Machius, Declerck et al. 1998), iv) estabilización de hojas β al introducir residuos con alta tendencia a formar hojas β , (Declerck, Joyet et al. 1990; Declerck, Joyet et al. 1995; Declerck, Machius et al. 2000) y v) puentes salinos que involucran los residuos Lys88, Lys253 y Lys385 presentes entre la interfase del dominio C y el dominio catalítico (Tomazic and Klibanov 1988; Joyet, Declerck et al. 1992). A pesar de conocer todos estos factores, no siempre pueden ser aplicados con éxito, ya que generalmente, algunas mutaciones sitio-dirigidas exhiben efectos opuestos a los esperados. La estabilidad de un gran número de proteínas naturales depende de la acumulación de un número extenso de mutaciones sinérgicas, adquiriendo factores estructurales que no pueden ser fácilmente transferidos a otras proteínas. Por lo tanto, elucidar el origen de la estabilidad para una proteína y encontrar la forma en que esta la resuelve, seguirá siendo trabajo para quienes gustan de estos menesteres...

Estabilidad a pH

La ingeniería de las α -amilasas para modificar su perfil de pH óptimo es un tema que continua cambiando debido a que muchas aplicaciones y procesos industriales en las que estas enzimas son utilizadas requieren de condiciones extremas de valores de pH. En este sentido, Shaw (1999) reportó variantes mejoradas en la α -amilasa de *B. licheniformis* tanto la estabilidad a pH 5.0 como en la temperatura 83°C. El autor se basó en técnicas para generar variabilidad al azar, así como selección y aislamiento de mutantes a gran escala. En éste mismo rubro, Nielsen y Bochert (1999) publicaron que calculando de manera teórica

los valores de pK_a de residuos ubicados alrededor del sitio de catálisis, se podría alterar la red de enlaces de hidrógeno, así como cambiar la accesibilidad al solvente y por lo tanto alterar la carga neta de la molécula. Desafortunadamente, la actividad resultó comprometida y las diferencias en el perfil de pH de las mutantes fue modesta. Estas diferencias fueron difíciles de correlacionar con los campos electrostáticos calculados, sugiriendo que no son capaces de predecir todas las interacciones que modifican el ambiente electrostático o que los efectos electrostáticos no son los únicos responsables del perfil de pH de la α -amilasa de *B. licheniformis*. Lo anterior puede significar –argumentan los autores- que las propiedades dependientes de pH de esta enzima están determinadas por la forma del sitio activo en complejo con el sustrato y por el campo electrostático de residuos más distantes al sitio catalítico no explorados en su trabajo. Recientemente, Verhaert, et al., (2002) generó mutantes de α -amilasa de *B. licheniformis* mediante técnicas de evolución dirigida, tales como PCR mutagénica y despliegue en fagos. Estas variantes presentaron la habilidad de unirse al almidón crudo y mostraron actividad por debajo de valores de pH 5.0, límite reportado para la α -amilasa de *B. licheniformis*. Las mutaciones de las variantes seleccionadas se ubican principalmente el dominio C.

Actividad y especificidad

Existen algunos trabajos que reportan cambios en la actividad catalítica o en la especificidad de sustrato sin alterar su estabilidad, por ejemplo, Mackenzie, et al., (1998) mostró la conversión de la función enzimática de una exoglucosidasa a una glucosintetasa, mutagenizando el residuo catalítico Glu a Ala. Esta mutación, se vió acompañada de una disminución de su capacidad de hidrólisis (Mackenzie, Wang et al. 1998). Otro ejemplo fue reportado por Inohara-Ochiai, et al., (1997), en el cual se generaron mutantes múltiples en la α -glucosidasa SAM1606 basados en alineamientos múltiples de secuencia. Estas mutantes mostraron un efecto crítico en los parámetros catalíticos, disminuyendo la afinidad para trealosa y aumentándola para maltosa, isomaltosa y sacarosa, sugiriendo una alteración en la especificidad de sustrato (Inohara-Ochiai, Nakayama et al. 1997). En este mismo sentido, Matsui, et al., (1997), demostró la importancia de algunas regiones para modular la especificidad y modificar la actividad en la α -amilasa de cebada,

específicamente en la Gly184 (asa4 del barril) que une al Ca^{2+} junto con residuos localizados en el dominio B (Asp92, Asp139, Ala142 y Asp149). Los residuos de esta asa unen al sustrato en el asa 4 del barril (Matsui and Svensson 1997). Gottschalk, et al., (2001), demostró por mutagénesis al azar, la importancia de un tri-péptido conservado en el asa 7 del dominio catalítico de la α -amilasa de cebada (AMY1). Las variantes generadas en esta región mostraron diferencias en los parámetros catalíticos hacia almidón, 2-cloro-4-nitrofenil β -D maltoheptaosa (Cl-PNPG7) y amilosa DP17. Estas mutantes mostraron un aumento en la actividad y cambio de especificidad hacia oligosacáridos pequeños. En el laboratorio se demostró previamente que es posible introducir la actividad de transglicosidación presente en amilasas sacarificantes (generalmente de origen fungal), a enzimas licuefactantes (de fuente bacilar), como fue el caso de la α -amilasa de *B. stearrowthermophilus*. Lo anterior, se logró intercambiando residuos apolares pequeños por aromáticos con un volumen mayor. Esta modificación en el sitio activo cambió la especificidad de productos hacia oligosacáridos de tamaño más pequeños (Saab-Rincon, del-Rio et al. 1999). La importancia de este cambio plantea la posibilidad de utilizar una sola enzima en los procesos de licuefacción y sacarificación. Aunque, se ha reportado que la α -amilasa de *B. licheniformis* es principalmente hidrolítica, se sabe que también presenta actividad transglicosídica (Marchal, van de Laar et al. 1999).

Los principios de diseño para la modificación de una enzima se encuentran en un estado de valiosas aportaciones. Las α -amilasas son algunas de las enzimas más importantes en la industria, y son un excelente modelo para estudiar la relación entre la estructura y función por las siguientes razones: 1) su estructura terciaria de las α -amilasas esta bien conservada; 2) muestran una amplia variedad en la especificidad de reacción de sustratos y de productos y 3) presentan un plegamiento en forma de barril (β/α)₈ con módulos que se sugiere son fuertemente intercambiables (ver figura 4). En el laboratorio, partimos del supuesto de que es posible modificar la especificidad de productos cambiando residuos semi-conservados cercanos al sitio activo, perturbando la disponibilidad del agua catalítica por otros aceptores y como consecuencia, favorecer las reacciones de transferencia.

De lo anterior, surgió la curiosidad, como en una neblina donde simplemente se antojó jugar, pensar y soñar. Esto último, ayudó a plantear los siguientes objetivos.

Objetivo general

Conocer el papel de los residuos semi-conservados cercanos al sitio catalítico de la α -amilasa de *B. licheniformis* que puedan contribuir a un aumento en las reacciones de transglicosidación

Objetivos particulares

Identificar mediante análisis múltiple de secuencia, aquellos residuos que pudieran estar involucrados en la especificidad de productos

Generar mutaciones en los residuos identificados

Analizar el comportamiento en cuanto a reacciones de transglicosidación y patrón de productos de las mutantes generadas

Generar modelos de las enzimas variantes que nos permitan establecer una relación entre la ubicación espacial de las cadenas laterales y su función con el cambio de especificidad de productos

Resultados

Identificando residuos potencialmente importantes para la especificidad

Se llevo a cabo un análisis de secuencia y de estructura entre amilasas que tienen la capacidad de llevar a cabo reacciones de transglucosidación y las que llevan a cabo principalmente reacciones de hidrólisis. Se encontraron algunas regiones conservadas en el extremo C-terminal de las β -plegadas ($\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 7$) del barril TIM, que incluyen las regiones previamente identificadas en la familia de las α -amilasas (asa 4, asa 5 y asa 7) las cuales contienen los residuos catalíticos Asp231, Glu261 y Asp328 respectivamente, ver figura 8, (numeración de la α -amilasa *B. licheniformis*) (Vihinen et al 1990; Takata et al 1992; Henrissat et al 1996; Kuriki et al 1996; Henrissat and Davies 1997; Janecek 2000).

Enzima	Asa 4	Asa 5	Asa 6	Asa 7	
B.lichen	DGFRIDAVKHIKF 238	KTGKEMPTVA	EYWNQD 266	VFDVPLH 289	VDRHDTOPGQS 334
B.amylo	DGFRIDAAKHIKF 238	ATGKEMPTVA	EYWNQD 266	VFDVPLH 289	VDRHDTOPGQS 334
B.stearo	DGFRIDAVKHIKF 241	QTGKPLFTVG	EYWSYD 269	LFDAPLH 292	VDRHDTOPGQA 337
B.sub	DGFRFDAAKHIEL 183	INTSAEFOYG	QILQDS 213	VIASNYG 232	---HETVANDD 275
Taka-amy	DGLRIDAVKHIKQ 213	KAAGVYCVG	EVLGDG 235	VLANPIY 255	VENHNDN-PRFA 303
A.niger	DGLRIDAVKHIKQ 213	KASGVYCVG	EIDNGN 235	VLANPIY 255	IENHNDN-PRFA 303
H.sapiens sal	AGFRIDASKEMWP 204	PEGSKPFIQ	EVID-- 236	VTEFKYG 259	VDRHNDNRGHH- 306
H.sapiens pan	AGFRIDASKEMWP 204	PAGSKPFIQ	EVID-- 236	VTEFKYG 259	VDRHNDNRGHH 306
Pig panc	AGFRIDASKEMWP 204	PAGSRPFIQ	EVID-- 236	VTEFKYG 259	VDRHNDNRGHH 306
Tenebrio	AGFRVDAAKHMSP 192	ADGARPFIQ	EVID-- 225	VLEFOFG 248	VDRHNDNRGHH 293
Alteromonas	KGFRFDASKEVAA 181	---GS-PVVFG	EVID-- 203	VTEFKYS 226	VDRHNDNRGHH 270
Barley	DGWRFDFAKCYSA 186	---EPSFAVA	HIWTSL 209	EFDFTEK 249	VDRHNDNRGHH- 291
B. circ1	DGIRMDAVKEMPF 236	---VFTFG	EWFLGV 262	LDLFRFA 286	IDNHDMRFRHA 334
B. circ2	DGIRMDAVKEMPF 236	---VFTFG	EWFLGS 262	LDLFRFN 286	IDNHDMRFRHT 334
B. specie	DGIRMDAVKEMPF 236	---VFTFG	EWFLGV 262	LDLFRFA 286	IDNHDMRFRHT 334
B. stearo	DGIRMDAVKEMPF 232	---VFTFG	EWFLSE 257	LDLFRFG 281	IDNHDMRFRMI 330
Thermo sulfu	DGIRMDAVKEMPF 237	---VFTFG	EWFLGT 263	LDLFRFS 283	IDNHDMRFRFN 335
Novamyl	DGLRIDAVKHFNS 235	---IFLVG	EWGDD 261	LDLFDLN 287	IDNHDMRFRFS 335
Thermus sp.	DGWRLELVANEIDH 335	---VYILG	EIWHDA 362	---YPLA 380	LGSHTTPRLLT 427
Ther NPL	DGWRLELVANEVDH 332	---ALIVG	EIWHDA 359	---YLFER 377	LGSHTTPRFLT 430
Ps Mose	GGFRFDVRCYAP 200	---ELWKGPEEYFNWD	231	PVFDEA 257	VDRHDTGYSFG 300
Olig gluc	DGFRMDVINFIK 206	---YDILMTVG	EMPGVT 260	MVFQFE 284	WDRHDTQPRVVS 335
Nss suc	DILRMDAVAFIWK 293	-----SEAIVHP	333	---PLQM 351	VNRFDGSEFARG 399

Figura 8. Alineamiento múltiple estructural de las asas catalíticas (asa 4, 5, 6 y 7) entre miembros de la familia 13 de las glicosil-hidrolasas. Sobre la columna de la derecha se observa de arriba hacia abajo; α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (1vjs) (Machius et al 1995); α -amilasa quimérica sin complejo de *B. amyloliquefaciens* (1E43) (Brzozowski et al 2000); α -amilasa de *B. stearothermophilus* (1HVX) (Suvd et al 2001); α -amilasa de *B. subtilis* 2633 (1bag) (Fujimoto et al. 1998); α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (2TAA) (Matsuura et al. 1984); α -amilasa de *A. niger* (2AAA) (Brady et al. 1991); α -amilasa (salivar) de *Homo sapiens* (1JXK) (por ser publicado); α -amilasa (pancreática) de *H. sapiens* (1HNY) (Rydberg et al. 1999); α -amilasa de *Sus scrofa* (cerdo) (1HX0) (Qian et al. 2001); α -amilasa de *Tenebrio molitor* (1JAE) (Strobl et al. 1998); α -amilasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (1G94) (Aghajari et al. 1998; Aghajari et al. 2002); α -amilasa de *Hordeum vulgare* (1AMY) (Kadziola et al. 1994); ciclodextrin-glicosiltransferasa (CGTasa) de *B. circulans* 251 (1CDG) (Lawson et al. 1994); CGTasa de *B. circulans* 8 (1CGT) (Klein and Schulz 1991); CGTasa de *B. sp* 1011 (D7F) (Ishii et al. 2000); CGTasa *B. stearothermophilus* (1CYG); CGTasa de *Thermoanaerobacter thermosulfurogenes* (1A47) (Wind et al. 1998); α -amilasa maltogénica de *B. stearothermophilus* (1QHO) (Dauter et al. 1999); α -amilasa maltogénica de *Thermus sp.* (1SMA) (Kim et al. 1999); neopullulanasa de *Thermoactinomyces vulgaris* (1BVZ) (Kamitori et al. 1999); amilasa formadora de maltotetraosa de *Pseudomonas stutzeri* (2AMG) (Morishita et al. 1997); glucosidasa de *B. cereus* (1UOK) (Watanabe et al. 1997) y amilosa-carasa de *Neisseria polysaccharea* (1G5A) (Mirza et al. 2001). Las regiones conservadas se encuentran marcadas con un asterisco (el ácido glutámico luce como un residuo semiconservado debido a la mutante E209Q-1bag). La posición de los residuos blanco (residuos aromáticos homólogos) se indican con dos asteriscos. Las iniciales entre paréntesis denotan el código de acceso al PBD de cada una de las estructuras.

Adicionalmente, se encontró una región extra conservada que corresponde al asa 6 donde se identificó el residuo en la posición 286 mostrando un patrón que difiere entre las enzimas licuefactantes y sacarificantes, donde en el primer caso se observan residuos pequeños en tanto que en el segundo, predominan residuos aromáticos, ver figura 8. Con la finalidad de evaluar cómo esta posición afecta la especificidad de productos que resulta de la presencia de la actividad de transferencia, se construyeron las mutantes Val286Tyr y Val286Phe.

Obtención y purificación de la enzima silvestre y mutantes

Se realizó la purificación por exclusión de tamaño a partir de una columna de agarosa de la enzima silvestre (figura 9i) y mutantes (figura 9ii). El peso molecular corresponde aproximadamente a 55 KDa, mientras que en el cromatograma se observa una migración que corresponde al pico de 44 KDa. Esta diferencia en la migración de la proteína se debe probablemente a la forma de la proteína, a la concentración de poliacrilamida utilizada en el gel y a las condiciones desnaturizantes. En tanto que, para la condiciones de separación en la columna de agarosa fueron nativas, ver figura 9 ii.

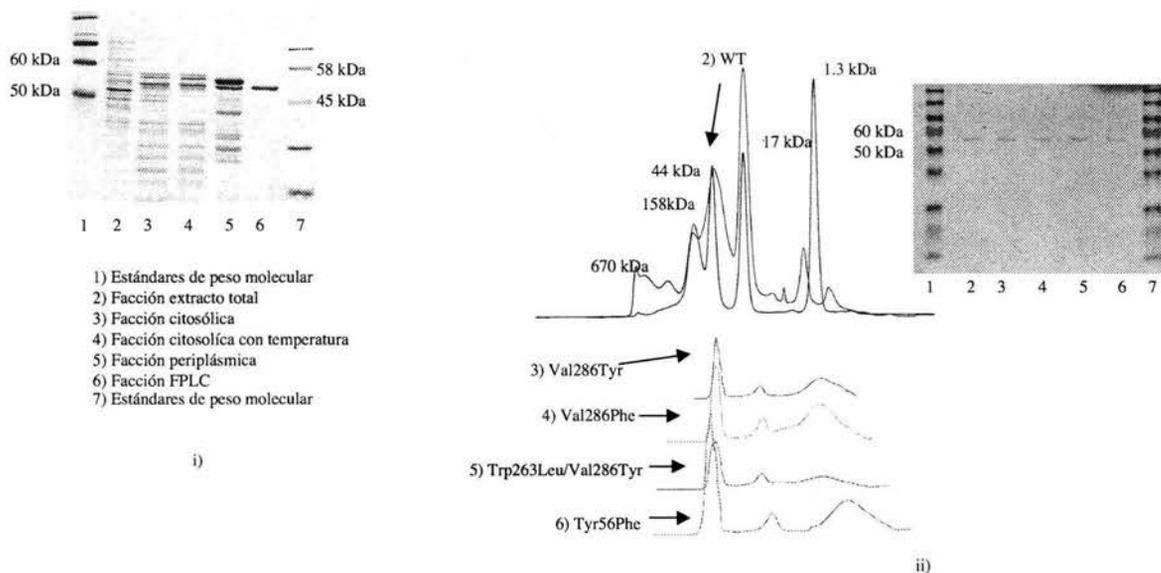


Figura 9. i) SDS gel al 10 % donde se muestran diferentes tratamientos en la purificación de la α -amilasa de *B. licheniformis* silvestre (WT) y mutantes. ii) cromatogramas de la enzima silvestre (WT) y mutantes purificadas mediante una columna Superosa H/R 12 (Pharmacia) en un sistema AKTA-FPLC y gel de poliacrilamida al 10 %. Los números del SDS-PAGE de la derecha corresponden a las enzimas purificadas.

Actividad

Se realizó una comparación de los parámetros catalíticos de las variantes Val286Tyr, Val286Phe y la enzima silvestre utilizando almidón como sustrato, midiendo la liberación de azúcares reductores. En el caso de la mutante Val286Tyr y la enzima silvestre se midió además la liberación de p-nitrofenol utilizando pNPG7 bloqueado con benzilideno. Todas las enzimas exhibieron un comportamiento que obedece una cinética tipo Michaelis-Menten. La tabla IV, muestra los parámetros cinéticos obtenidos sobre almidón, donde se observa que la variante Val286Tyr presenta una eficiencia catalítica cinco veces mayor que la enzima silvestre. Este resultado se debe a un incremento en el número de recambio más que a la K_M . En contraste, la mutante Val286Phe, en la que la valina fue remplazada también por un residuo aromático, manifestó un decremento de tres veces en la eficiencia catalítica como resultado en el incremento de su K_M , manteniendo la k_{cat} prácticamente sin cambio. La mutante Val286Tyr mostró el mismo comportamiento tanto con pNPG7 bloqueado con benzilideno como con almidón dando un incremento de 10 veces en el número de recambio relativo a la enzima silvestre ($k_{catwt} = 8.4 \times 10^{-1}$; $k_{catVal286Tyr} = 8.02 \text{ s}^{-1}$, $K_{MWT} = 0.21$ y $K_{MVal286Tyr} = 0.43 \text{ } \mu\text{M}$). Debido a la similitud en su estructura, es probable que el diferente comportamiento entre las dos variantes se atribuya a la polaridad y a la capacidad del grupo hidroxilo de establecer puentes de hidrógeno. Desde un punto de vista termodinámico, el cambio en el estado de transición causado por la disrupción en la interacción entre el sustrato y la enzima puede ser expresado cuantitativamente como $[\Delta(\Delta G^\ddagger)] = -RT \ln[(k_{cat}/K_M)_x / (k_{cat}/K_M)_y]$, donde x representa a la enzima mutante o un sustrato análogo, mientras que y a la enzima silvestre o sustrato parental (Wilkinson 1983; Sierks and Svensson 2000). Aplicando esta ecuación a los datos de la eficiencia catalítica observada en la mutante Val286Tyr, se puede estimar una disminución en la energía de activación de -0.86 Kcal/mol para almidón respecto a la mutante Val286Phe que mostró un incremento en la energía de activación de -0.58 Kcal/mol relativo a la enzima silvestre, mostrando valores similares la doble mutante Val286Tyr/Trp263Leu -0.59 Kcal/mol , relativos también a la enzima silvestre.

El trabajo previo realizado en la α -amilasa de *B. stearothermophilus* sugirió que la mutación a un residuo aromático en la posición equivalente afecta la orientación del Trp que interactúa con el Glu catalítico a través de una molécula de agua. Con la intención de demostrar experimentalmente si tal interacción existe en el contexto de la α -amilasa de *B. licheniformis* se construyó una doble mutante Val286Tyr/Trp263Leu. Los parámetros catalíticos de esta mutante, también se muestran en la tabla IV y son muy parecidos a la enzima silvestre, sugiriendo que realmente existe una interacción entre los residuos aromáticos en la posición 263 que modifica el sitio de catálisis.

Tabla IV. Parámetros cinéticos determinados para almidón de varias α -amilasas a diferentes temperaturas

Enzima	α -amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i> a 80°C			α -amilasa de <i>Bacillus stearothermophilus</i> a 60°C*		
	k_{cat} (seg ⁻¹)	K_M (mg/ml)	k_{cat}/K_M (ml*mg ⁻¹ *seg ⁻¹)	k_{cat} (seg ⁻¹)	K_M (mg/ml)	k_{cat}/K_M (ml*mg ⁻¹ *seg ⁻¹)
Silvestre	$1.2 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^2$	1.15 ± 0.09	$1.1 \times 10^3 \pm 1.8 \times 10^2$	$1.9 \times 10^3 \pm 1.2 \times 10^3$	3.4 ± 0.5	$5.5 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3$
Val286Phe	$1.4 \times 10^3 \pm 2.9 \times 10^2$	4.4 ± 0.9	$3.6 \times 10^2 \pm 1.2 \times 10^2$	$5.1 \times 10^3 \pm 3.4 \times 10^2$	2.0 ± 0.3	$2.5 \times 10^3 \pm 5.4 \times 10^2$
Val286Tyr	$6.9 \times 10^3 \pm 8.9 \times 10^2$	1.4 ± 0.19	$5.4 \times 10^3 \pm 1.3 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3 \pm 81$	1.9 ± 0.4	$6.3 \times 10^2 \pm 1.7 \times 10^2$
Trp263Leu	ND	ND	ND	NM	NM	NM
Trp263Leu/Val286Tyr	$8.4 \times 10^2 \pm 1.3 \times 10^2$	2.4 ± 0.41	$3.8 \times 10^2 \pm 1.08 \times 10^2$	NM	NM	NM

Parámetros cinéticos de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* silvestre y mutantes (Val286Phe, Val286Tyr, Trp263Leu y Trp263Leu/Val286Tyr). El error se muestra como desviación estándar. k_{cat} = μ mol equivalentes de dextrosa por min por mg de proteína. K_M = constante de disociación del almidón. Los parámetros de la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* silvestre y mutantes se muestran como comparación *(Saab-Rincon et al. 1999). NM Actividad no determinada. ND Actividad no detectada después de varias horas de reacción.

Papel de los residuos 286 y 263 en el sitio activo

Con la finalidad de explicar las diferencias encontradas en las propiedades catalíticas entre la mutantes Val286Tyr, Val286Phe, Trp263Leu/Val286Tyr y la enzima silvestre en términos de estructura, se construyeron modelos usando el sitio público en la red SWISS-MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) usando como template las coordenadas de la enzima silvestre. Swiss-Model trabaja con un modulo Relax que usa un banco de rotámeros de cadenas laterales permitidos, basado en la frecuencia de ocurrencia observada en estructuras tridimensionales. Primero, la cadena lateral distorsionada es corregida. Se usa una prueba de exclusión de fuerzas de Van der Waals y ángulos dihédricos para seleccionar entre los rotámeros permitidos. La geometría de las cadenas laterales de los modelos es evaluada usando el programa WHAT_IF (Vriend 1990), y WHAT_CHECK (Hooft 1996). Se generó una superposición de la α -amilasa quimérica (que toma los residuos 1-300 de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* y los

residuos 301-483 de la α -amilasa de *B. licheniformis*) y los modelos construidos para las mutantes Val286Tyr, Val286Phe y Trp263Leu/Val286Tyr. Los modelos para las mutantes Phe y Tyr son prácticamente idénticos, excepto por el grupo hidroxilo de la Tyr, el cual se encuentra muy cerca del carbonilo de la cadena principal del Glu catalítico. La superposición de la acarbosa sobre los modelos generados, basados en la estructura de la α -amilasa quimérica, sugiere que los contactos cercanos pueden ocurrir entre la Tyr y las unidades de glucosa que se ubican sobre ésta. Es decir estos residuos se ubican en la región entre el subsitio +2 y el +3 de la unión de la enzima con el sustrato.

El alineamiento estructural entre las mutantes modeladas y la enzima silvestre no mostraron diferencias de posición en las cadenas laterales del Trp263, ver figura 10. Generalmente, en las α -amilasas que incluyen un residuo aromático en la posición equivalente al Val286, no contienen un residuo aromático en la posición Trp286, con la excepción de la α -amilasa de cebada en la cual la posición equivalente al residuo 286 se encuentra ocupada por una Phe, mientras que la posición 286 se ubica un Trp. Es notable, que en la estructura cristalográfica de esta enzima (Kadziola et al 1998), el residuo equivalente a la posición 286 (Phe) orienta el residuo equivalente a la posición 263 mediante apilamiento. El residuo Trp presenta una interacción tipo puente de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal del carbonilo del Glu catalítico a través de una molécula de agua. En los modelos que se generaron, la orientación del Trp se encuentra ligeramente rotado, relativo a la estructura silvestre, sin embargo, continua perpendicular al residuo Tyr286. No se descarta, que la orientación del Trp encontrado en los modelos presente cierto sesgo por la estructura silvestre que se utilizó. En ese sentido, se tiene presente que las moléculas de agua juegan un papel importante en las redes de enlaces de hidrógeno a lo largo de la estructura y también en la posible estabilización por apilamiento entre los residuos aromáticos y que no son tomados en cuenta en el proceso de modelamiento. Los resultados obtenidos con la doble mutante Val286Tyr/Trp263Leu apuntan claramente hacia la interacción entre estas dos posiciones cuando son ocupadas por residuos aromáticos. El reemplazo del Trp263 por una Leu remueve el efecto positivo en la eficiencia catalítica obtenida en la variante Val286Tyr. Si la contribución de la actividad de los dos residuos aromáticos fuera independiente una de otra, su efecto puede ser aditivo y entonces los valores en la $\Delta(\Delta G^\ddagger)'$

entre la mutante Val286Tyr relativo a la enzima silvestre, y la Val286Tyr/Trp263Leu relativa a la mutante sencilla Trp263Leu pueden ser los mismos. Se construyó la mutante sencilla para corroborar ésta hipótesis. Como se puede observar en la tabla IV, el efecto deletéreo de ésta mutación es más dramático en el contexto de la enzima silvestre que en el contexto de la mutante Val286Tyr, demostrando que existe un efecto sinérgico cuando estas posiciones están ocupadas por residuos aromáticos.

Además de la diferencia en la actividad encontrada entre las mutantes Val286Tyr y Val286Phe, en los modelos generados se encontró que el grupo hidroxilo de la variante Val286Tyr apunta hacia la cadena principal del Glu261 (ver figura 10). Aunque, los modelos no predicen los enlaces de hidrógeno entre estos residuos, una interacción a través de una molécula de agua puede existir. El Glu261 es el ácido general que protona el grupo saliente del sustrato natural durante el primer paso de la reacción de doble desplazamiento y que activa al grupo aceptor (puede ser agua u otro residuo glicosilo) durante el segundo paso (Uitdehaag 1999 a y b; Rydberg 2002). Es decir, la mutante Tyr286 puede estar actuando como reservorio de agua, favoreciendo las reacciones de hidrólisis.

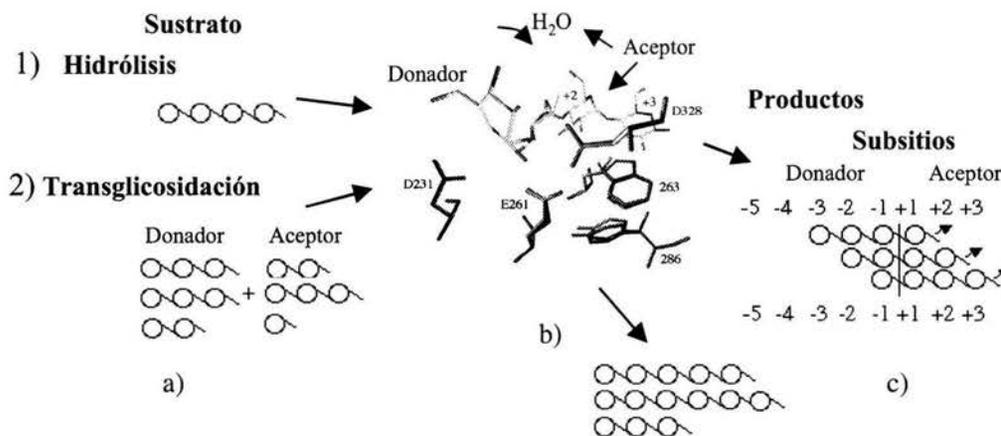


Figura 10. a) Modelo esquemático de las reacciones que realizan las α -amilasas: 1) hidrólisis de maltotetraosa y 2) transglucosidación de los productos de hidrólisis utilizando una molécula de sustrato como aceptor en lugar de agua; b) sitio activo de la enzima silvestre y mutantes modeladas Val286Tyr, Val286Phe, Trp263Leu/Val286Tyr. Los residuos correspondientes a la enzima silvestre se muestran en verde y las mutantes en azul, rojo y amarillo respectivamente, también se muestra una molécula de acarbosa que funciona como inhibidor en color azul claro. Se encuentran numeradas las unidades de glucosa que se posicionan sobre los residuos 286 y 263, residuos que corresponden a los subsitios +2 y +3; c) productos de la hidrólisis y transglucosidación observándose la posición de la molécula de maltotetraosa sobre los diferentes subsitios del sitio catalítico de la enzima. La línea en los productos de hidrólisis representa el sitio de corte de la proteína al oligosacárido que va a ser transferido. La flecha muestra el extremo reductor de los oligosacáridos que funcionan como aceptores para las reacciones de transferencia.

Especificidad y perfil de productos

Con la idea de encontrar si la alta velocidad de reacción observada en la mutante Val286Tyr sugiere un cambio en la especificidad de productos resultado de las reacciones de transglicosidación, se comparó el perfil de productos generados por la hidrólisis de almidón y varios oligosacáridos (G3, G4, G6 y G7) de las enzimas mutantes y la enzima silvestre. Aunque en términos generales, los productos principales de la hidrólisis de almidón reportados previamente para la enzima comercial a pH 6.5-6.9 y 90°C (Marchal 1999) son los mismos que se obtuvieron con la enzima recombinante (G5, G3 y G2), se observó una significativa producción de G1, ver tabla V. Este patrón fue el mismo para la enzima silvestre y todas las mutantes con excepción de la doble mutante Val286Tyr/Trp263Leu, la cual mostró una baja proporción de G1. En lo que concierne al uso de oligosacáridos pequeños como sustrato, solamente la enzima silvestre y la mutante Val286Phe mostraron actividad con G3. Para las otras mutantes, G4 fue el oligosacárido hidrolizable más pequeño con una velocidad muy lenta. Durante períodos cortos de incubación (aproximadamente una hora), únicamente la enzima silvestre mostró actividad de transglicosidación e hidrólisis con G4. Después de períodos muy largos de incubación (49 horas), cuando el equilibrio fue alcanzado, el perfil de productos de la enzima silvestre y la mutante Val286Phe fueron similares, dejando sin reaccionar 6.09 y 6.25% de G4 respectivamente y produciendo principalmente G2 y G3 (ver tabla V y figura 11) además de los productos de transglicosidación tales como G5, G6, G7 y oligosacáridos más grandes. Mientras que, las mutantes que contienen Tyr en la posición 286 fueron menos eficientes para utilizar G4 como sustrato (59.3 y 49.4% de sustrato sin reaccionar, respectivamente) acumulando G5 como resultado de reacciones de transglicosidación y produciendo diferentes cantidades de G3, G2 y G1 (ver tabla V y figura 11). Cuando G5 se usó como sustrato, las mutantes Val286Tyr, y Val286Tyr/Trp263Leu mostraron productos de hidrólisis. No obstante, después de 49 horas de incubación, el incremento de estos productos resultó ser lento, generando 9.6 y 14.5 % de G1, 37.9 y 35.9% de G2, 15.5 16.7 de G3, 2.8 y 7.1% de G4, respectivamente. En tanto que, la enzima silvestre mostró la presencia de productos de transglicosidación, además de los productos de hidrólisis, dando una degradación más eficiente de G5 en condiciones de equilibrio, aunque también, se

observó la acumulación de G6 y G7 como resultado de la reacción de transglicosidación (ver figura 11). La mutante Val286Phe mostró un perfil de productos parecido al de la enzima silvestre (ver tabla V). Cuando se usaron G6 y G7 como sustratos, la actividad se hizo evidente para todas las mutantes en períodos cortos de incubación (10 minutos), excepto para la variante Trp263Leu.

Tabla V. Hidrólisis de la α -amilasa silvestre y mutantes de *B. licheniformis* determinados por HPLC después de 49 horas de reacción a 80 °C. Se utilizaron como sustrato oligosacáridos de diferente tamaño, la concentración de los productos están representados en concentración mM. Los valores entre paréntesis G4 (21), G5 (16), G6 (13) y G7 (11) corresponden a la concentración inicial en mM.

	G4				G5			
	silvestre	Val286Tyr	Val286Phe	Trp263Leu/Val286Tyr	silvestre	Val286Tyr	Val286Phe	Trp263Leu/Val286Tyr
G1	0.43	0.05	0.2	0.06	0.4	0.05	0.2	0.2
G2	1.5	0.3	0.8	0.9	1.5	0.8	1.1	1.7
G3	1.2	0.5	0.7	3.2	1.2	0.9	0.9	2.2
G4	0.6	3.1	0.5	7.7	0.7	0.2	0.6	1.1
G5	0.9	0.04	0.7	0.5	0.8	3.6	0.9	6.4
G6	0.5	0.0	0.9	0.0	0.6	0.0	1.1	0.0
G7	0.2	0.0	0.4	0.0	0.3	0.0	0.5	0.0

	G6				G7			
	silvestre	Val286Tyr	Val286Phe	Trp263Leu/Val286Tyr	Silvestre	Val286Tyr	Val286Phe	Trp263Leu/Val286Tyr
G1	0.4	0.2	0.4	0.7	0.4	0.2	0.3	0.3
G2	1.4	1.0	1.3	3.5	1.4	1.3	1.2	3.1
G3	1.1	0.8	1.1	3.3	1.1	1.2	1.1	2.7
G4	0.6	0.1	0.5	1.4	0.6	0.2	0.7	0.9
G5	0.8	1.6	0.8	5.1	0.8	2.1	1.0	3.3
G6	0.6	0.06	0.7	0.2	0.5	0.0	1.2	0.0
G7	0.4	0.0	0.4	0.0	0.1	0.0	0.6	0.0

Se puede deducir a partir de los productos de alto peso molecular que generaron las mutantes con Tyr en la posición 286, que éstas son capaces de realizar reacciones de transglicosidación, sin embargo, a períodos largos de incubación, todos estos productos son hidrolizados, generando un patrón de productos donde predominan G2, G3 y G5. Mientras que, la enzima silvestre y la mutante Val286Phe generaron un perfil que incluye G1 y G2 como productos principales pero muestran la presencia de oligosacáridos más grandes, como resultado de reacciones de transglicosidación (ver figura 11). Debido a que estas dos enzimas son capaces de utilizar G6 y G7 como sustratos, la acumulación de estos oligosacáridos (ó inclusive más grandes) en períodos prolongados de incubación sugiere una mayor relación transglicosidación/hidrólisis para ellas.

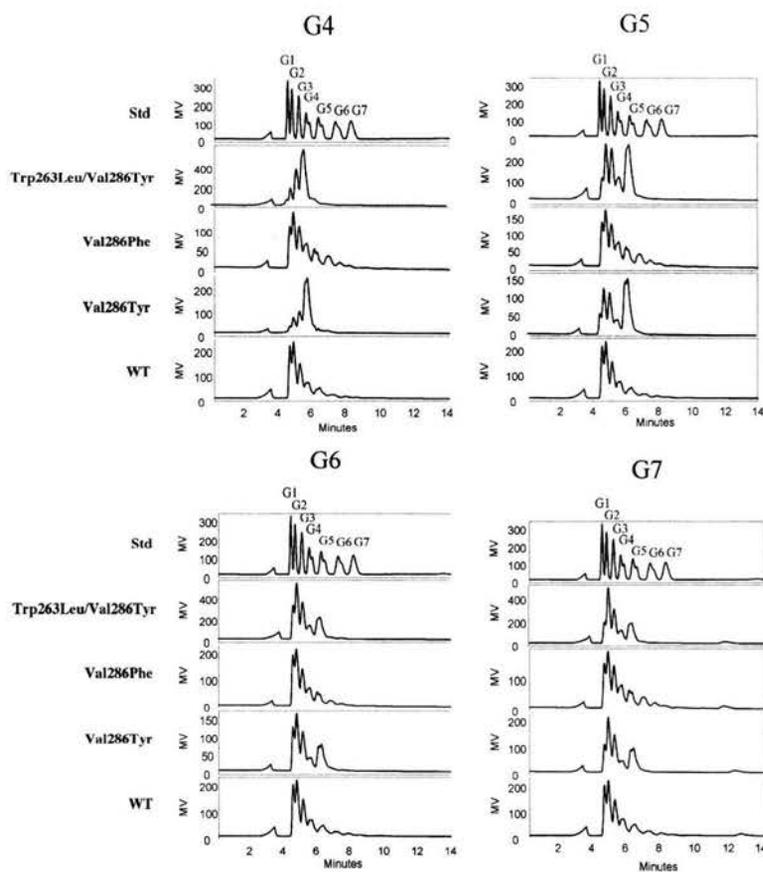


Figura 11. Comparación del perfil de productos utilizando diferentes oligosacáridos de tamaño pequeño como sustrato. La determinación se realizó por HPLC después de 49 horas de reacción a 80 °C . Arriba de cada serie esta indicado el oligosacárido usado como sustrato y al lado derecho la enzima mutante como biocatalizador.

La producción de G5, G6 y G7 sugiere actividad de transglucosidación para todas la mutantes cuando G4 se utilizó como sustrato. Esta actividad fue reportada por Marchal, (1999) quien observó un incremento en la contribución de reacciones de transglucosidación para la hidrólisis de oligosacáridos pequeños (G3-G7) con la amilasa comercial (Maxamyl®, Genecor) a altas temperaturas reduciendo la especificidad del producto final.

Perfil de transferencia mediante el uso de maltosa marcada radiactivamente (G2^r)

La diferencia en el perfil de productos obtenido con las enzimas mutantes sugiere un cambio en el mecanismo de reacción ó un cambio en la especificidad de los productos. Los resultados obtenidos son consistentes con la existencia de al menos ocho subsitios tanto para la enzima silvestre como para las mutantes. Cuando todos los subsitios son ocupados (utilizando sustratos más grandes que G7), no se observó ningún contraste en el perfil de productos, en tanto que, cuando las enzimas encuentran el tamaño límite de sustrato, las diferencias comienzan a reflejar una afinidad disímil en por lo menos uno de los subsitios entre las variantes. Para esclarecer esta hipótesis, se decidió estudiar la hidrólisis de G4 en presencia de trazas de G2^r, ver figura 12. Si las reacciones de transglicosidación se llevan a cabo, entonces la maltosa marcada radiactivamente (que puede actuar como un aceptor en las reacciones de transglicosidación) se podría distribuir entre los productos de acuerdo a la especificidad de la enzima. Es importante tomar en cuenta que los productos de transglicosidación pueden ser hidrolizados relativamente rápido y que esto puede verse reflejado en el perfil de productos. La figura 12 a y 12 b, muestran la incorporación de G2^r después de 48 horas de reacción. La enzima silvestre y la mutante Val286Phe manifiestan un perfil de productos similar con la producción de G1 marcado radiactivamente. En contraste, la mutante Val286Tyr y la doble mutante Val286Tyr/Trp263Leu incorporan menos G2^r y producen menos G1 (observado tanto con α -naftol como con radiactividad) y acumula más G4. Resulta interesante, que al observar la incorporación de marca radiactiva (G2^r), la concentración relativa de G4 para la mutante sencilla y la doble mutante es es más baja que cuando se revela con α -naftol. Esto indica, que la alta acumulación de G4 para estas dos variantes se debe a la baja actividad hacia éste sustrato, más que a la retroalimentación resultado de las reacciones de transglicosidación. Esto sugiere, una disminución en la afinidad de un subsitio sobre la posición del extremo reductor (después del sitio de corte). En un reporte reciente, donde se mapean los subsitios de la α -amilasa de *B. licheniformis*, se demuestra que el subsitio -5 es un subsitio de alta afinidad, seguido por el subsitio -2, luego el subsitio +3 y finalmente los subsitios +2 y -3, para los cuales, los autores reportan iguales energías de interacción (Kandra 2002). Debido a que el residuo que se mutó se ubica entre los subsitios +2 y +3, no esperamos que se afecte la afinidad del

subsitio -5, y por lo tanto la alta acumulación de G5 en las mutantes en el contexto de Tyr se puede atribuir al decremento en la afinidad de los subsitios +2 y/ó +3. Consistente con esta hipótesis, se observó un incremento de dos veces en la K_M para la mutante Val286Tyr cuando se utilizó pNPG7 bloqueado con benzilideno como sustrato relativo a la enzima silvestre.

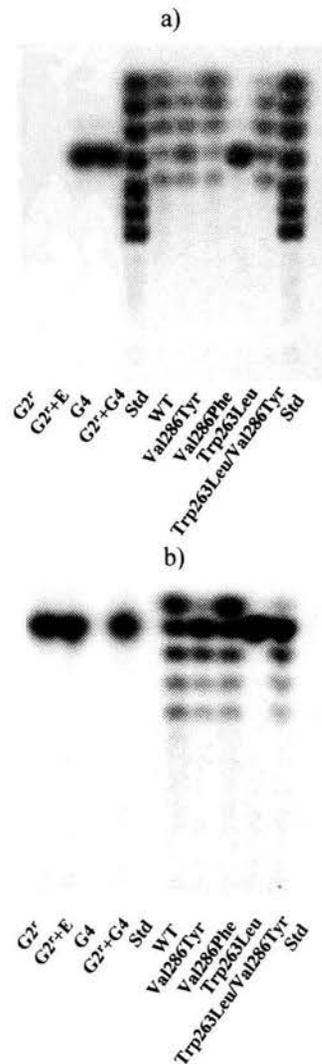


Figura 12. Actividad hidrolítica sobre maltotetraosa (G4), utilizando maltosa radioactiva (G2^r) como aceptor de la enzima silvestre (WT) y mutantes (Val286Tyr, Val286Phe, Trp263Leu y Trp263Leu/Val286Tyr) detectados por TLC después de 48 horas de reacción a 80 °C. Se usaron maltodextrinas (G1-G7) como estándares (Std), y como controles; G2^r sin enzima, G2^r +E maltosa radioactiva con enzima silvestre, G4 maltotetraosa sin enzima y G2^r+G4 sin enzima. (a) hidrólisis de G4 detectado con alfa-naftol y (b) incorporación de productos de transglucosidación hacia G2^r visualizado en un Phosphorimager de Molecular Dynamics.

Para el caso de la mutante Val286Phe no se tienen constantes de afinidad para estos oligosacáridos; sin embargo, su pérdida en la eficiencia catalítica se atribuye principalmente a un incremento en la K_M para almidón, por lo que es tan ineficiente como la mutante Val286Tyr para unir oligosacáridos pequeños de una forma productiva, una posible explicación de su alta eficiencia catalítica para procesar tanto G5 y G6, es su capacidad para transglicosidar, así que pocos eventos feraces pueden dar lugar a productos de mayor tamaño que son procesados con una mayor eficiencia. Estos resultados demuestran la baja actividad de transglicosidación para la mutante Tyr en la posición 286. La presencia del grupo hidroxilo de la tirosina puede favorecer la entrada del agua en lugar de otros grupos aceptores, motivando que la reacción se dirija principalmente hacia la hidrólisis, la cual se encuentra limitada por la baja afinidad que presenta la enzima hacia oligosacáridos pequeños. Mientras que, la enzima silvestre y la mutante Val286Phe presentan cadenas laterales hidrofóbicas que pueden favorecer la entrada de aceptores menos polares que el agua (Matsui 1994).

Termoestabilidad

Con la idea de explorar si la actividad presente en la mutante Val286Tyr puede ser útil para su aplicación industrial, es importante demostrar que la termoestabilidad, que es uno de los más interesantes atributos de la enzima silvestre no fue afectada por la mutación. Cuando esta variante y la enzima silvestre fueron incubadas a 80°C por un período de 6 horas en un amortiguador con 10 mM de Ca^{2+} , no se observó pérdida de actividad para ninguna de las dos enzimas, ver figura 13 a. Este tiempo es tres veces más largo que el requerido para la licuefacción industrial del almidón. Con la finalidad de demostrar cualquier cambio en la estabilidad, la inactivación térmica irreversible de las mutantes Val286Tyr, Val286Phe, la doble mutante Val286Tyr/Trp263Leu y la enzima silvestre se incubaron a 80°C por diferentes intervalos de tiempo reduciendo la concentración de Ca^{2+} a 1 mM para desestabilizarlas, ver figura 12 b. Una vez realizado lo anterior, las muestras se colocaron a 4°C por 15 minutos para después medir su actividad residual a 80°C. Todas las curvas fueron descritas por un modelo de decaimiento exponencial de primer orden, resultando en una vida media de 7 minutos para la mutante Val286Tyr, 8 minutos para la doble mutante

Val286Tyr/Trp263Leu, y 40 minutos para la mutante Val286Phe comparadas con 10 minutos de la enzima silvestre. Por lo tanto, bajo condiciones de stress se observó un decremento en la estabilidad para las proteínas en el contexto de tirosina. Sorpresivamente, la mutante Val286Phe resultó ser más estable que la enzima silvestre.

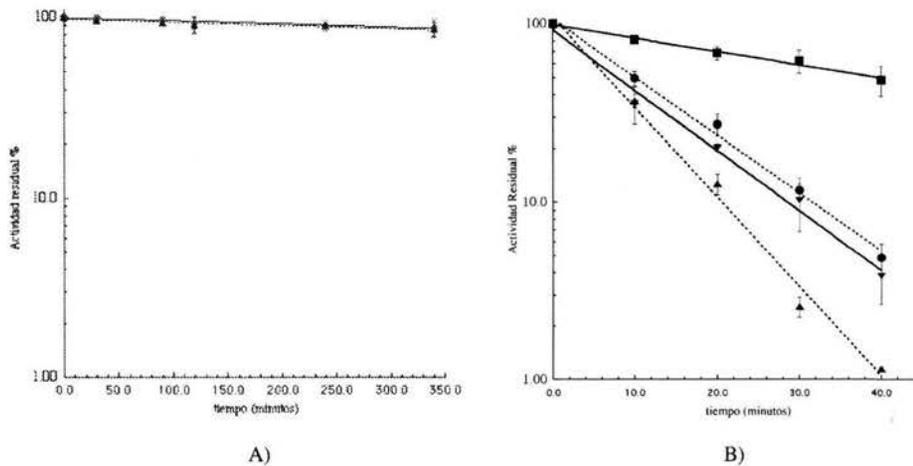


Figura 13. a) Inactivación térmica irreversible (ITI) a 80°C con 10 mM de CaCl₂, de la enzima silvestre (en círculos), y la mutante Val286Tyr (en triángulos). Estos experimentos fueron hechos por triplicado. Ambas enzimas muestran un comportamiento idéntico en la regresión lineal del ln de la actividad vs el tiempo de incubación. b) ITI a 80°C con 1 mM de CaCl₂, y pH 7.5 de la enzima silvestre (círculos) y mutantes, Val286Tyr (triángulos abiertos, línea punteada), Val286Phe (cuadrados), y Val286Tyr/Trp263Leu (triángulos llenos). La regresión lineal del ln de la actividad vs el tiempo de incubación fue usado para determinar la $t_{1/2}$ de las enzimas gráficamente. La $t_{1/2}$ calculada para la enzima silvestre fue aproximadamente de 10 minutos, para la mutante Val286Tyr fue alrededor de 7 minutos, para la mutante Val286Phe fue alrededor de 40 minutos, mientras que para la doble mutante fue de aproximadamente 8 minutos.

El presente trabajo se publicó de manera formal en la revista *Protein Engineering*, volumen 16, no. 7, pp 505-514 en el año 2003.

Discusión

Inesperadamente, la mutante Val286Tyr tuvo un incremento en la actividad respecto a la enzima silvestre. La misma mutación en el contexto de la α -amilasa de *B.*

stearothermophilus produjo una reducción de la actividad hidrolítica y un cambio en el perfil de productos, explicado por la introducción de la actividad transglicosídica (Saab-Rincon, del-Rio et al. 1999). Estas diferencias para la misma mutación en ambas enzimas resultó ser poco probable, considerando el grado de identidad entre estas dos enzimas (62%). Aunque, la triada catalítica para estas α -amilasas esta altamente conservada, un alineamiento de estructura de varias α -amilasas mostró ligeras diferencias en la orientación de los residuos catalíticos (Suvd, Fujimoto et al. 2001). Es interesante resaltar, que ambas α -amilasas evolutivamente relacionadas muestren estas diferencias, las cuales podrían explicar el distinto comportamiento no únicamente entre las enzimas mutantes si no también entre las enzimas silvestres (Gray, Mainzer et al. 1986). Mientras que la enzima silvestre de *B. stearothermophilus* no es capaz de transglicosidar, la enzima silvestre de *B. licheniformis* tiene actividad residual de transglicosidación, particularmente a altas temperaturas y en exceso de sustrato. Es decir, en el caso de la α -amilasa de *B.*

stearothermophilus fue fácil identificar la nueva actividad sobre un fondo nulo, mientras que para la α -amilasa de *B. licheniformis*, las discrepancias en la reacción de transferencia o en el perfil de productos utilizando almidón como sustrato no fueron claras. Sin embargo, sí se encontraron diferencias para las variantes generadas reaccionando con oligosacáridos de tamaño pequeño. Todas estas enzimas fueron capaces de hidrolizar G4, la enzima silvestre y la mutante Val286Phe generaron G1, G2 y G3 en alta proporción, en tanto que la mutante Val286Tyr produjo sólo una pequeña cantidad de G1 siendo sus productos principales G2 y G3. Dado que la mutante Val286Tyr mostró ser más activa que la enzima silvestre y la mutante Val286Phe, su baja actividad hacia G4 puede ser explicada por una disminución en su afinidad por este sustrato y/ó por su reducción en la capacidad de llevar a cabo reacciones de transglicosidación. Ambas reacciones (transglicosidación e hidrólisis) ocurren simultáneamente y es difícil cuantificar su contribución individual para el resultado final. No obstante, en el contexto de las mutantes con tirosina la pérdida de afinidad para sustratos más pequeños que G5 es evidente, pero también la poca incorporación de G2

sugiere una baja actividad transglicosídica. En el caso de la mutante Val286Phe cualquier pérdida posible de afinidad esta claramente compensada por su alta actividad transglicosídica. Explicar estas diferencias en términos de estructura puede resultar complicado debido a que se espera un cambio de orientación del Trp263 equivalente cuando la Tyr o Phe están presentes en la posición 286. Ambas mutaciones tienen un efecto negativo sobre la K_M y por lo tanto sobre la eficiencia catalítica. En el caso de la Tyr el grupo hidroxilo apunta hacia el sitio catalítico probablemente contribuyendo a un ambiente más polar, el cual no únicamente compensa la pérdida en afinidad sino también incrementa la k_{cat} . Del análisis del comportamiento de las mutantes que se generaron, se pueden resaltar dos puntos: i) el incremento observado en la actividad está directamente relacionado con la presencia del grupo hidroxilo en cierta geometría relativo al sitio catalítico; un cambio en la posición de éste grupo hidroxilo como posiblemente ocurre en la doble mutante Val286Tyr/Trp263Leu canceló el incremento en la actividad observado sobre la primera mutación; y ii) la disminución observada en la reacción de transglicosidación está directamente relacionada a la polaridad del residuo en la posición 286. Esto último, está sustentado por los resultados obtenidos con la doble mutante cuya actividad es cercana a la actividad de la enzima silvestre, sin embargo, es menos transglicosídica generando un perfil de productos muy cercano al obtenido con la mutante Val286Tyr.

Por otra parte, fue interesante observar un decremento de un 30% en la vida media de la mutante Val286Tyr, mientras que la mutante Val286Phe mostró un incremento de cuatro veces en la vida media bajo las mismas condiciones. Uno esperaría que cualquier efecto estérico al introducir un anillo aromático pudiera ocasionar disturbios en la estructura de la misma manera; sin embargo, la presencia del grupo hidroxilo aparentemente genera un rearrreglo crítico, al menos cuando la concentración de Ca^{++} se mantiene en concentraciones de 1 mM. El cambio de un residuo con un volumen mayor como es el caso del Trp por un pequeño como la Leu contractúan la distorsión producida por la introducción de una Tyr en la posición 286, mostrando una vida media parecida al de la enzima silvestre. En términos prácticos, las condiciones usadas para la determinación de la estabilidad son mucho más astringentes que las usadas en las condiciones industriales del procesamiento del almidón,

condiciones en las cuales no se observó ningún cambio en la activación térmica de la mutante Val286Tyr por varias horas.

Conclusiones

Al modificar los residuos cercanos al sitio activo, se obtuvo una enzima cinco veces más activa que la silvestre, sin alterar su termoestabilidad o su especificidad de productos hacia el almidón bajo concentraciones elevadas de CaCl_2 en el medio de reacción. La implicación de este resultado en la industria puede contribuir a la reducción en el costo del proceso, debido a que se puede aminorar el consumo de esta enzima en la licuefacción del almidón.

El diferente comportamiento de las mutantes Phe y Tyr permitió identificar la importancia de las interacciones electrostáticas en el cambio de la geometría del Glu261, así como la importancia de la red de interacciones electrostáticas que promueven las reacciones de transglicosidación en la posición 286. Los resultados obtenidos soportan la idea de que existe un incremento en la transglicosidación a expensas de la actividad hidrolítica (Saab-Rincon, del-Rio et al. 1999). Es decir, la introducción de la transglicosidación, cambia el perfil de productos hacia oligosacáridos pequeños debido al reciclaje de moléculas de tamaño mediano para generar otras más grandes que puedan ser digeridas eficientemente por la enzima. Los resultados mostrados, pueden extenderse para identificar otros residuos importantes que dicten la especificidad de los productos de reacción y la catálisis, con implicaciones importantes en el procesamiento del almidón.

Perspectivas

Consideramos importante ampliar la ventana del espacio de secuencia en el sitio catalítico con la idea de explotar las regiones (subsitos) que se vean involucradas en el complejo enzima-sustrato.

Una caracterización más detallada de la enzima mutante Val286Phe en términos de la actividad transglicosídica pondría de manifiesto la ubicación de los subsitos y su relación con la modificación del perfil de productos.

La posible generación de modelos tridimensionales obtenidos por cristalografía, así como estudios de plegamiento, pueden proporcionar información relevante relacionada con la función los residuos que conforman las regiones semi-conservadas.

Sería conveniente contar con un sistema de selección para la especificidad en esta enzima y generar mediante técnicas de evolución dirigida y estrategias racionales, miles de variantes que proporcionen información relevante para establecer aspectos generales aplicables a enzimas homólogas miembros de la familia de las glucosil hidrolasas.

Finalmente, el potencial económico que representan las enzimas que degradan polisacáridos y la capacidad de formar nuevas moléculas derivadas de reacciones de transferencia sugieren una mayor atención hacia las enzimas miembros de ésta familia.

Apéndice

Material y métodos

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencia con 23 enzimas que degradan almidón y cuyas coordenadas cristalográficas están depositadas en el banco de datos para proteínas (PDB, por sus siglas en inglés). Se usó el programa clustal X, éste programa utiliza una matriz de peso para proteínas que determina la similitud de aminoácidos que no son idénticos, por ejemplo, Tyr con Phe alinea mejor que Tyr con Pro. Las matrices utilizadas fueron Gonnet PAM 250. Los grupos altamente conservados están definidos con una calificación de > 0.5 mientras que los que están ligeramente conservados están calificados con ≤ 0.5 . También se utilizaron programas del paquete pdb-viewer para visualizar y corregir el alineamiento manualmente (Guey y Peitsch 1997; Thompson 1997). El código de identificación en el PDB para las proteínas utilizadas es como sigue: B. lichen, α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Machius 1995); B. amylo, α -amilasa quimérica sin complejo de *B. amyloliquefaciens* (Brzozowski 2000); B. stearo, α -amilasa de *B. stearothermophilus* (Suvd 2001); B. sub, α -amilasa de *B. subtilis* 2633 (Fujimoto 1998); Taka-amy, α -amilasa de *Aspergillus oryzae* (Matsuura 1984); A. niger, α -amilasa de *A. niger* (Brady 1991); H. sapiens sal, α -amilasa (salivar) de *Homo sapiens* (por ser publicado); H. sapiens pan, α -amilasa (pancreática) de *H. sapiens* (Rydberg 1999); Pig panc, α -amilasa de *Sus scrofa* (cerdo) (Qian 2001); Tenebrio, α -amilasa de *Tenebrio molitor* (Strobl 1998); Alteromonas, α -amilasa de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Aghajari 1998; Aghajari 2002); Barley, α -amilasa de *Hordeum vulgare* (cebada) (Kadziola 1994); B. circ1, ciclodextrin-glicosiltransferasa (CGTasa) de *B. circulans* 251 (Lawson 1994); B. circ2, CGTasa de *B. circulans* 8 (Klein and Schulz 1991); B. specie, CGTasa de *B. sp* 1011 (Ishii 2000); B.stearo2, CGTasa *B. stearothermophilus*; Termo sulfu, CGTasa de *Thermoanaerobacter thermosulfurogenes* (Wind 1998); Novamyl, α -amilasa maltogénica de *B. stearothermophilus* (Dauter 1999); Thermus sp., α -amilasa maltogénica de *Thermus sp.* (Kim 1999); TherNPL, neopullulanasa de *Thermoactinomyces vulgaris* (Kamitori 1999); PsMtose, amilasa formadora de maltotetraosa de *Pseudomonas stutzeri* (Morishita 1997); Olig gluc1, glucosidasa de *B. cereus* (Watanabe 1997) y Nss sue, amylosacarasa de *Neisseria polysaccharea* (Mirza 2001).

Clonación del gene de la α -amilasa de *B. licheniformis*

El gene de la α -amilasa (ATCC-27811) fue aislado de ADN cromosomal^{AI} mediante extensión y amplificación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los siguientes oligonucleótidos: 5'-ATATGCTCTAGAAGGAGATATACATATGAAACAACAAAACGGC-3' y 5'-TGCCCCAAGCTTCTATCTTTGAACATATGAAAC-3'. Se clonó el producto de PCR (gene de la α -amilasa de *B. licheniformis*) en el vector pET 3a (Novagen) de sobre-expresión que se encuentra bajo el control del promotor del fago T7, utilizando las enzimas de restricción Hind III y Xba I (*New England Biolabs, Inc*). Se realizó la construcción de las enzimas mutantes por mutagénesis sitio-dirigida mediante PCR en las posiciones Val286 y Trp263 mediante el método de megaprimer^{AII} (Sarker y Sommer, 1990) usando los siguientes oligonucleótidos: 5'-GTCATTCTGCAGATATTCAGCT-3' y 5'-AATGAAGCGGATAGTCAAACAC-3', respectivamente, en combinación con el oligonucleótido: 5'-ATATGCTCTAGAAGGAGATATACATATGAAACAAAACGGC-3', que se une al extremo terminal del gene. La secuencia del gene de cada una de las enzimas fue obtenida mediante un secuenciador automático Perkin Elmer 377.

AI- Extracción de ADN genómico

La proteinasa K es una proteasa del tipo de subtilisina presenta dos sitios de unión a Ca^{++} . Su actividad residual es suficiente para remover proteínas que se unen al ADN. Se sugiere utilizar EDTA para inhibir la acción de nucleasas dependientes de Mg^{++} . Su temperatura óptima es de 37 a 50°C. Se recomienda preparar una solución concentrada de proteinasa K 20 mg/ml (agua) y almacenarla a -20°C.

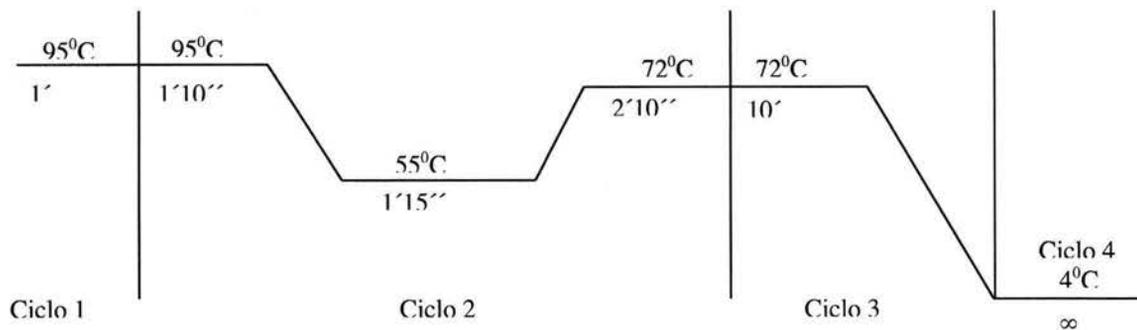
Concentrar las células por centrifugación 5 minutos a 14 000 rpm, la pastilla que se forma se resuspende en TE (10 mM de Tris y disodio etilenediaminetetra-acetato (EDTA) 1 mM pH 7.4). Se centrifuga 5 minutos a 14,000 rpm. Se resuspende nuevamente en un volumen de 200 μ l y se agrega lisozima, se mezcla rigurosamente y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionan 25 μ l de sulfato de dodecil sodio (SDS) al 10 % y 25 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) y ARNasa (10 mg/ml). Se incuban a 37°C durante 1 hora hasta una lisis completa de la muestra. Se adiciona 200 μ l de fenol y 200 μ l de cloroformo, se mezcla rigurosamente y se centrifuga durante 2 minutos a 14,000 rpm. Este proceso se repite una vez más (la

extracción fenol/cloroformo limpia al cromosoma de proteínas). Después, se trata con cloroformo, (con el fin de remover las trazas de fenol de la preparación de ADN) se lava con etanol al 100 % y posteriormente al 70 %. La muestra se centrifuga 5 minutos y se resuspende en agua. Se recomienda extraer el ADN cromosomal (que es muy viscoso) con un gancho elaborado a partir de una pipeta pasteur.

A11- Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para extender, amplificar y mutagenizar el gene de la α -amilasa de *B.licheniformis*

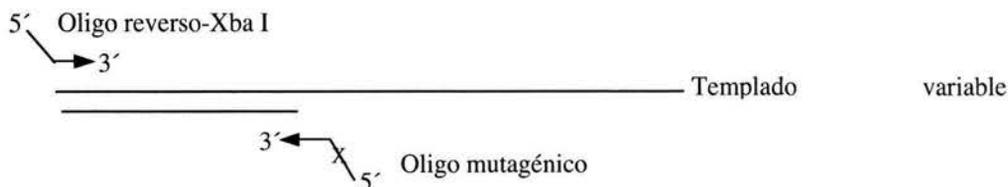
Para una reacción de 100 μ l	
Amortiguador 10x con $MgCl_2$ (15 mM)	10 μ l (ROCHE, recomendable)
Oligo 1 (30 pmoles)	1 μ l
Oligo 2 (30 pmoles)	1 μ l
Polimerasa (Expand-ROCHE) 2.5 unidades	1 μ l
Templado 10 nmoles	3 μ l
Agua	76 μ l

Ciclo 1 (1x)	95°C	1'
Ciclo 2 (30x)	95°C	1'10'' (desnaturalización del templado)
	55°C	1'15'' (pegado del oligo nucleótido)
	72°C	2'10'' (extensión y amplificación)
Ciclo 3 (1x)	72°C	10'' (desactivación de la polimerasa)
Ciclo 4 (1x)	4°C	lo necesario



pET3a Tamaño del producto
T7prom / XbaI / ShD / i met α -amilasa de *B. licheniformis* / Hind III 1.5 Kb

Primera PCR (generación del megaprimer), ver figura a1.



Segunda PCR (extensión y amplificación del gene), ver figura a1 ii.

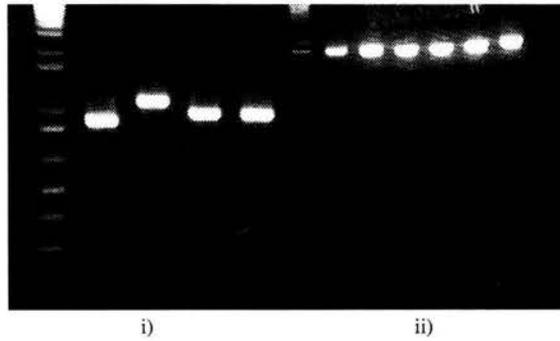


Figura a1. Gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador Tris-Boratos- EDTA. i) megaprimers generados por PCR, la diferencia en tamaño se debe a que las posiciones en que se desea mutar se encuentran en diferentes regiones del gene. ii) extensión del gene completo producido a partir de oligonucleótidos que lo flanquean.

Obtención y purificación de la enzima silvestre y mutantes

Se indujo la sobre-expresión de las enzimas con isopropilthio- β -galactósido (IPTG) (Research Organics) 0.5 mM en la cepa BL21 de *Escherichia coli*. Se purificaron las enzimas utilizando una columna de filtración en gel (superosa 12/HR) mediante cromatografía en fase líquida para proteínas (FPLC) (AKTA-Pharmacia). Se utilizó como fase móvil el amortiguador Tris 20 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 1 mM, pH 7.5. La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó por el método de Bradford^{AIII} (Bio-RAD).

AIII-Bradford

Para determinar la concentración de proteínas totales contenida en una solución.

Ventajas; sensible y muy rápido, desventajas; las proteínas son desnaturizadas irreversiblemente por lo tanto es un método destructivo, además el método presenta variabilidad en la respuesta entre diferentes proteínas. Los resultados se reportan relativos a la albumina extraída del suero bovino (BSA) 25-200 μ g/ml de proteína en solución, ver tabla a1. Se realiza una curva patrón entre 0 y 20 μ g/ml de BSA (ver figura a2) para determinar la concentración de proteínas totales a partir de la siguiente ecuación.

$$\text{Concentración de proteína} = \frac{(\text{lectura } 595 \text{ nm}) - (\text{intercepto})}{\text{Pendiente de la curva}} \times \text{factor de dilución de la muestra}$$

Tabla a1. Curva patrón (595 nm)

Proteína (μ g)	Solución estándar (1 mg/ml de BSA)	Amortiguador experimental (puede ser agua) (μ l)	Bradford BIO-RAD (μ l)
0	0	800	200
2.5	2.5 μ l	797.5	200
5	5 μ l	795	200
10	10 μ l	790	200
15	15 μ l	785	200
20	20 μ l	780	200

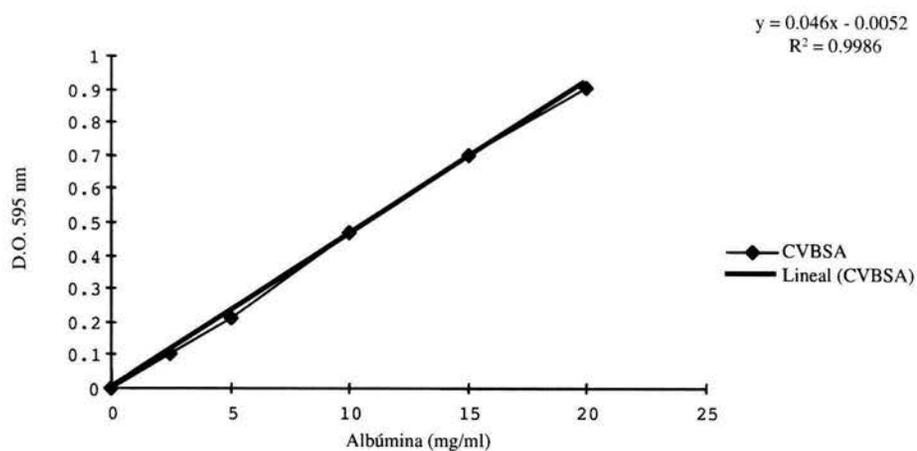


Figura a2. Curva estándar de albúmina (CVBSA) para determinar la concentración de proteínas totales mediante el reactivo de Bradford.

La muestra de la proteína se ajusta de manera que la lectura se ubique dentro de los valores de la curva estándar, ver tabla a2.

Tabla a2. Factores de dilución utilizados para ajustar la muestra de proteína a los valores de la curva estándar

Muestra (µl)	Amortiguador experimental (µl)	Bradford BIO-RAD (µl)
20	780	200
50	750	200

Ensayos de actividad

La depolimerización del almidón (almidón soluble de Sigma) se determinó midiendo azúcares reductores mediante el método de ácido-3,5 dinitrosalicílico (DNS)^{AIV} (Miller 1959). La cantidad de enzima fue ajustada a una respuesta lineal de 0 a 9 minutos para medir la velocidad de formación de azúcares reductores.

AIV-Determinación de azúcares reductores mediante el ácido dinitrosalicílico (DNS)

El DNS reacciona con los extremos reductores de los azúcares, dando lugar a un compuesto colorido que se determina espectrofotométricamente a 540 nm, ver figura a3. Por lo que la respuesta es proporcional a la concentración de azúcares reductores, lo cuál se ve incrementada durante la hidrólisis del polisacárido.

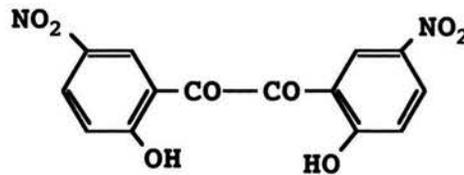


Figura a3. Formula química del ácido dinitrosalicílico (DNS).

Reactivo DNS
Baño a ebullición
Recipiente con hielo
Glucosa
Cánicas
Gradilla

Preparación del reactivo DNS:
300 g de tartrato de sodio y potasio tetra-hidratado
16 g de hidróxido de sodio
10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico

Se disuelve el tartrato y el hidróxido con un poco de agua en agitación moderada, después se adiciona el DNS lentamente. Una vez disuelto se afora a un litro. Este compuesto se oxida con la luz, por lo que es recomendable almacenarlo en recipientes color ambar o cubierto con aluminio.

Para una cinética tipo Michaelis-Menten y determinar la velocidad inicial de la α -amilasa de *B. licheniformis* se preparan soluciones a diferentes concentraciones de almidón: 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0 y 10 mg/ml. El almidón se disuelve en amortiguador (Tris 20 mM; CaCl₂ 10 mM; NaCl 1 mM, pH 7.5) (volumen final de 20 ml). Se sugiere hacer diluciones de una solución más concentrada de almidón. Para cada concentración de sustrato se requieren al menos 9 tubos, ver tabla a3.

tiempo de reacción (min)	Almidón (mg/ml)							
	0.2	0.3	0.4	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3
6	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3
9	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3	1;2;3

Es importante asegurar que los tiempos y la cantidad de enzima se encuentran en una respuesta lineal para monitorear realmente la velocidad máxima. Es recomendable realizar una curva patrón por cada ensayo de DNS (ver tabla a4). Se sugiere determinar la concentración de proteínas totales por Bradford antes del ensayo de actividad, así como adicionar de 15 a 20µl de enzima para estar en el intervalo lineal de la velocidad inicial partiendo de una concentración de 0.15 µg/µl para el caso de la enzima silvestre, ver figura a4.

Glucosa mg/ml	* Solución concentrada de glucosa 100 mg/ml	Como preparar la reacción (volumen 0.4 ml)
0.0	Agua	200µl de agua + 200µl de DNS
0.25	2.5µl de * + 997.5µl de agua (A)	200µl de A + 200µl de DNS
0.5	5.0µl de * + 995µl de agua (B)	200µl de B + 200µl de DNS
1.0	10.0µl de * + 990µl de agua (C)	200µl de C + 200µl de DNS
1.5	15.0µl de * + 985µl de agua (D)	200µl de D + 200µl de DNS
2.0	20.0µl de * + 980µl de agua (E)	200µl de E + 200µl de DNS

Se sugiere preincubar el sustrato 5 minutos a 80°C (condiciones específicas para la α -amilasa de *B. licheniformis*) y después adicionar la enzima. Se pueden utilizar tubos Eppendorf para la reacción de sustrato y enzima en un volumen de 1 ml e incubar en un termomixer (Eppendorf) con agitación constante. Se toman alíquotas de 200 µl a diferentes tiempos de la reacción y se depositan en un tubo de ensayo al que se le agregó previamente 200 µl de DNS. Posteriormente, la reacción se incuba a temperatura de ebullición por cinco minutos utilizando las canicas como tapas, después, se incuban a 4°C por cinco minutos y se le agrega los 2 ml de agua obteniendo un volumen final de 2.4 ml. Una vez realizado lo anterior se determina espectrofotométricamente a 540 nm. La cantidad de azúcares reductores fue expresada como equivalentes de dextrosa usando una curva estándar. Una unidad de actividad de la enzima está definida como 1 mmol de equivalentes de dextrose liberados por minuto.

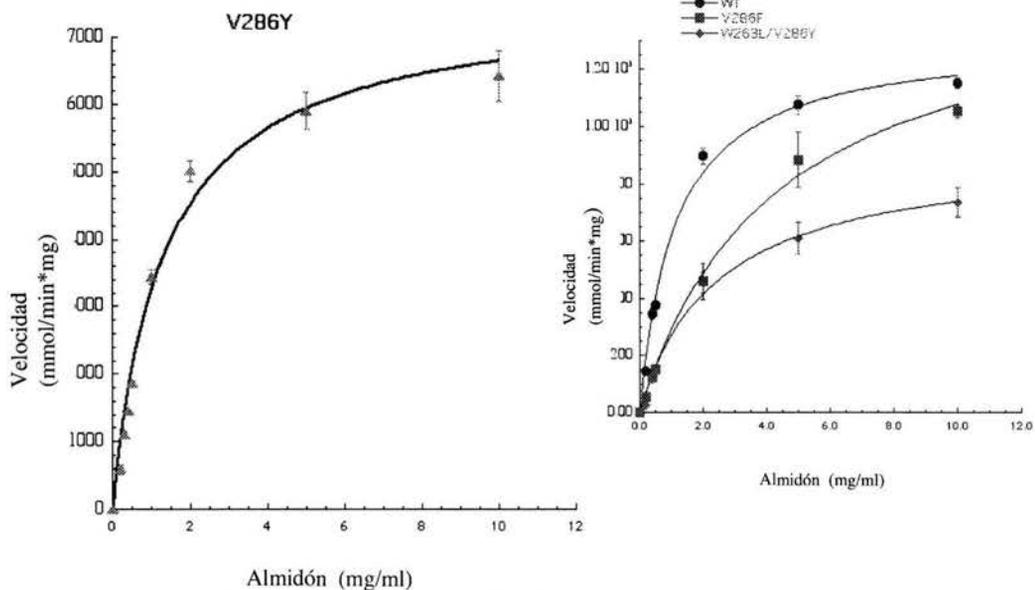


Figura 24. Curvas que muestran un comportamiento cinético Michaelis-Menten de la α -amilasa silvestre de *B. licheniformis* y mutantes determinados azúcares reductores mediante el método DNS.

La actividad hidrolítica de la α -amilasa sobre p-nitrofenil-maltoheptaosido bloqueado por benzilidina (pNPG7) fue determinado para la enzima silvestre y la mutante Val286Tyr usando el ensayo comercial de Randox (UK) a 37 °C, así como 1.32 y 0.78 nM de enzima, respectivamente. Los parámetros de k_{cat} y K_M fueron calculados de velocidades iniciales en el intervalo de 0.027-2.13 μ M de sustrato. El ensayo de actividad también involucra dos enzimas indicadoras: glucoamilasa que digiere los productos de hidrólisis de la α -amilasa y la α -glucosidasa, que libera el p-nitrofenol (la glucosa terminal del sustrato está químicamente bloqueado en ambos extremos, previniendo la actividad de las enzimas indicadoras). El p-nitrofenol liberado es determinado espectrofotométricamente a 405 nm, usando un coeficiente de extinción molar de $\epsilon = 12,005$ l/mol x cm (Lorentz 2000) y es equivalente al sustrato hidrolizado por la α -amilasa (Kaufman 1980; David 1982; Rauscher 1985).

Evidencia de las reacciones de transglicosidación usando malto-oligosacáridos

Con la idea de evidenciar las reacciones de transglicosidación fueron usados como sustrato oligosacáridos de tamaño pequeño para la enzima silvestre y mutantes^{AV}. Aunque la eficiencia en la hidrólisis es baja utilizando estos sustratos, estos nos permitieron distinguir los productos de transferencia que aparecen como oligosacáridos de alto peso molecular respecto a los originales. Oligosacáridos (Sigma) de un intervalo de 3 a 7 unidades de glucosa (maltoheptaosa, G7; maltohexaosa, G6; maltopentaosa, G5; maltotetraosa, G4 y maltotriosa G3) se usaron para determinar el perfil de productos de cada una de las enzimas; 100 mM de cada uno de los sustratos fue incubado con las mismas unidades de actividad (determinados para almidón) para cada enzima a 80 °C. Las muestras fueron analizadas en cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en un sistema Waters millipore con detector de índice de refracción, usando una columna octadecil silano (C₁₈) de fase reversa (250x 4.6 mm i.d.). La elusión se realizó con agua pura con una velocidad de flujo de 0.7ml/min. Los picos fueron medidos y comparados contra una solución estándar que contenía cantidades conocidas de oligosacáridos en un rango que va de G1 a G7.

AV-Especificidad de productos: TLCs con isótopos radiactivos C¹⁴ y reveladas con α -naftol

La cromatografía se basa principalmente en diferencias en la afinidad de sustancias para la fase móvil, la fase estacionaria. La sustancia experimenta durante el proceso de separación dos principios básicos de afinidad: adsorción y partición. Durante la adsorción la sustancia se disuelve en la fase móvil y se adsorbe sobre la superficie de la fase estacionaria ó alúmina, mientras que en la partición resulta de las diferencias en la solubilidad de la sustancia de las dos fases inmiscibles entre sí. En ésta, las sustancias disueltas en la primera fase móvil particionan con una segunda fase unida al sustrato líquido, tal como la sílica-gel o celulosa. Las principales propiedades de la fase estacionaria son: a) composición química b) tamaño y características del poro, y c) la fase móvil. Por su naturaleza química, la fase estacionaria se puede clasificar como: polares y apolares. La eficiencia en la separación de la fase móvil depende de su geometría, es decir el tamaño de la partícula y su distribución. El grado comercial de la sílica-gel tiene partículas de un tamaño en un intervalo de 5 a 40 μ m. El sistema de solventes o fase móvil es muy importante en la separación. El solvente disuelve las sustancias que van a separarse y las transporta a través de la placa. (Karin Bauer et al 1991)

Material:

α -naftol (muy tóxico y carcinogénico)

etanol absoluto grado reactivo

ácido sulfúrico (H_2SO_4) 96 %

Agua

Solución para revelar azúcares

Se disuelve 5 g de α -naftol en 33 ml de etanol. A 21 ml de ésta solución se le agregan 13 ml de H_2SO_4 , 81 ml de etanol absoluto y 8 ml de agua. Es importante mantener la reacción en hielo y agitando con mosca ya que la reacción es muy exotérmica.

Reacciones de hidrólisis:

Almidón al 1%

Amortiguador R

Enzima (cuantificada por Bradford y con determinación de actividad en unidades)

Termomixer (Eppendorf)

Cromatoplasmas 10x10 cm con silica gel 60 (MERCK)

Se disuelve el almidón en amortiguador (Tris 20 mM, $CaCl_2$ 10 mM, y NaCl 1 mM a pH 7.5) en microondas durante un minuto verificando y mezclando rigurosamente en intervalos de 15 segundos cada vez. Se adiciona la enzima normalizando su actividad en unidades previamente determinada mediante DNS.

Dependiendo del ensayo se puede incubar la reacción por diferentes intervalos de tiempo o inclusive por períodos muy prolongados (48 horas). Posteriormente, se prepara la cámara para correr la placa previamente marcada: se satura la cámara durante 10 minutos con la fase móvil para un volumen de 30 ml (butanol; 9 ml, etanol; 15 ml y agua 6 ml) en una proporción 3:5:2 respectivamente. Mientras tanto se agrega la muestra de la reacción (1 μ l) en la placa previamente marcada, ver figura a5 (0.5 cm en la parte superior y 1.0 cm en la parte inferior), se deja secar por 10 minutos. Una vez realizado esto, se transfiere la placa a la cámara cuidando que las muestras se encuentren en contacto con la fase móvil. Se sella la cámara y se corre durante 1 hora y media. Posteriormente, se saca la placa y se deja secar por 30 minutos. Se adiciona la solución reveladora, rociando en zig-zag y de manera uniforme cuidando el volumen que se le agrega (siempre tiene que ser el mismo). Se seca la placa en la campana extractora por alrededor de 20 minutos. Se pone a reaccionar en calor (la estufa para secar material puede resultar útil), ver figura a6.

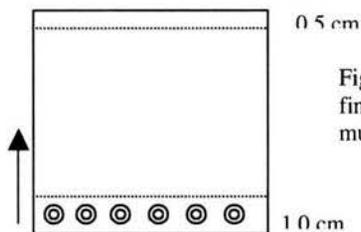


Figura a5. Placa de cromatografía en capa fina marcada con lápiz para la carga de la muestra.

Se utilizó maltosa marcada radiactivamente con C¹⁴ (Amersham Pharmacia Biotech), maltotriosa y maltotetraosa (Sigma) para mostrar la distribución de productos generados por reacciones de transglucosidación.

Condiciones críticas del experimento:

Se utiliza aceite mineral, se toma en cuenta una cuidadosa dilución de las muestras y se comienza con altas concentraciones de sustrato (100 mg/ml y diluir 10 veces al cargar en la placa de TLC). La temperatura para la reacción enzimática es a 80°C y el volumen de reacción para el sustrato es de 50 µl tomando en cuenta el volumen extra de enzima que se adiciona.

El sustrato radiactivo se incubó en amortiguador (Tris 20 mM, CaCl₂ 10 mM, y NaCl 1 mM a pH 7.5) a 80°C. Las reacciones se iniciaron adicionando las mismas unidades de actividad de las enzimas mutantes para digerir 100 mg/ml de maltotetraosa y 100 µCi de maltosa. Estas muestras se pre-incubaron a la misma temperatura de reacción por 10 minutos y se analizaron después de 48 horas de incubación. La reacción se inició adicionando 20 unidades de enzima a un volumen de 50 µl. Después, se paró la reacción a 4°C e inmediatamente se cargó en la placa. Una placa fue revelada con α-naftol y su réplica se visualizó en el Phosphorimager (Molecular Dynamics Phosphorimager).

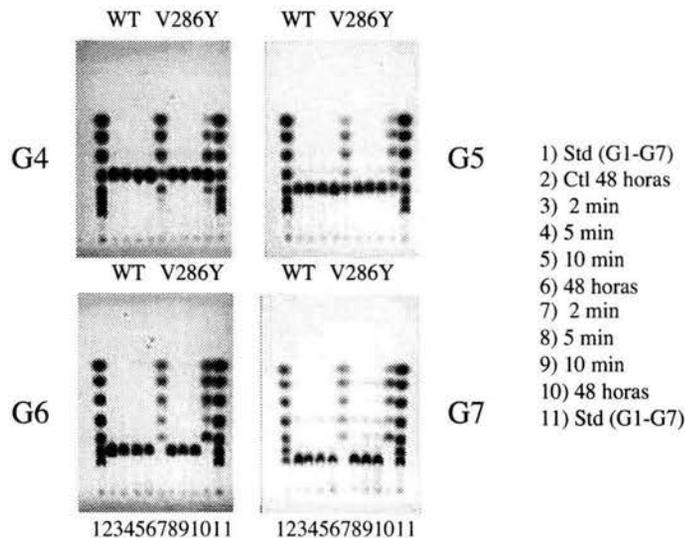


Figura a6. Patrón de productos generados por la enzima silvestre (WT) y mutante Val286Tyr (V286Y), visualizados mediante cromatografía de capa fina (TLC) y revelado con α-naftol a diferentes intervalos de tiempo a 80°C. Se utilizó como sustrato oligosacáridos de diferente tamaño: maltotetraosa (G4), maltopentaosa (G5), maltohexaosa (G6) y maltoheptaosa (G7).

Evidencia de las reacciones de transglucosidación usando maltosa radiactiva (G2^r) como aceptor

Maltosa radiactiva (Amersham Pharmacia Biotech) y G4 (Sigma) fueron incubados a 80 °C en amortiguador Tris 20 mM pH 7.5 que contiene 10 mM de CaCl₂ y 1 mM de NaCl. Las reacciones se iniciaron adicionando las mismas unidades de actividad de la enzima silvestre y mutantes para digerir 100 mg/ml de sustrato incubado previamente durante 10 minutos a la temperatura de reacción y analizado después de 48 horas de reacción

Determinación de constantes de inactivación térmica

Cinéticas de pérdida irreversible de actividad fueron medidas para la determinación de constantes de inactivación^{AVI}.

AVI-Determinación de constantes de inactivación térmica

Material:

Aceite mineral

Bradford

Enzimas puras

DNS

Termomixer (Eppendorf)

Tween-20 (polixietileno de sorbitan monolaurato)

Para la determinación de las constantes de inactivación, se midieron cinéticas de pérdida irreversible de la actividad, ver figura a7. Las enzimas purificadas y mantenidas a 4 °C, así como precipitadas con sulfato de amonio, se dializaron contra amortiguador Tris 20 mM, CaCl₂ 1mM, NaCl 1mM a pH 7.5 y Tween 0.005%. El contenido de proteína total fue medido por el método de Bradford. Las muestras se depositaron en tubos Eppendorf y se incubaron a 80°C. Para los estudios cinéticos, las muestras se incubaron por intervalos diferentes de tiempo (0, 10, 20, 20, 30, 40 y 50 minutos) a 80°C, y se enfriaron en hielo por aproximadamente 20 minutos. La actividad remanente de las muestras incubadas se determinó midiendo azúcares reductores por el método de DNS después de la hidrólisis de 10 mg/ml de almidón a diferentes intervalos de tiempo (3, 6 y 9 minutos). La vida media ($t_{1/2}$) de las mutantes y la enzima silvestre se calculó a partir de la pendiente de la curva de inactivación obtenida por la regresión lineal de log (actividad residual) *versus* tiempo de incubación (minutos), ver figura a7. Se usaron alícuotas de 500 µl en tubos Eppendorf de 0.5 ml y se adicionó aceite mineral en la parte superior para evitar que la muestra se concentre por evaporización.

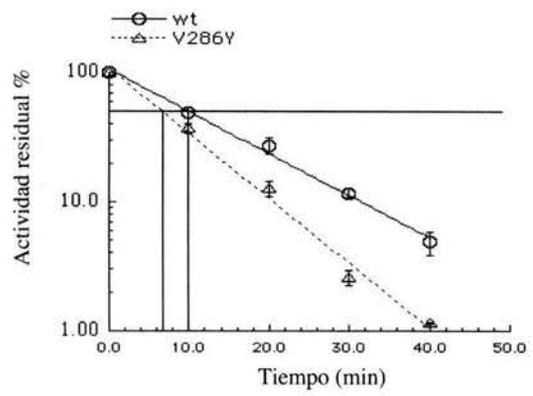
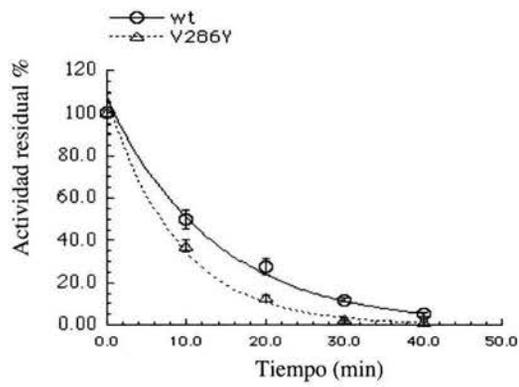


Figura a7. Inactivación térmica irreversible a 80°C, pH 7.5, 1mM CaCl₂ de la α -amilasa silvestre y mutantes de *B. licheniformis*

SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con sulfato de dodecil sodio) (Blackhear, 1984)

Es un método para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas, tiene la ventaja de ser de alta resolución (ver tabla a5), bajo costo, reproducible y rápido. Sirve para separar proteínas basado principalmente en el peso molecular. El SDS se une a las partes hidrofóbicas de una proteína, favoreciendo el estado desplegado de las proteínas y permite estar en condiciones estables en conformación extendida o lineal. Como resultado, la movilidad en el gel es inversamente proporcional al peso molecular del complejo proteína-SDS.

Sensibilidad de tinción

Azul de coomassie: 0.1-1 µg por banda

Plata: 2-10 ng por banda

Tabla a5. Resolución en la separación de proteínas en función del porcentaje de acrilamida utilizada en el gel

% acrilamida (Gel)	Resolución en la separación (kDa)
15	15 a 45
12.5	15 a 60
10	18 a 75
7.5	30 a 120
5	60 a 212

Reactivos:

Acrilamida al 30 %

100 ml, 30 % (peso /volumen) de acrilamida, 0.8 % (peso/volumen) bis-acrilamida. Precaución: la acrilamida es neurotóxica y resulta irritante para la piel.

Buffer de corrida 10X pH 8.8

	(1 litro)	(3 litros)
Trizma base	15g	45g
Glicina	72g	216g
EDTA	0.134g	0.402g
SDS	2.5 g	7.5g

Buffer de carga 5X (sample buffer)

Tris-HCl pH 6.8	0.6 ml (60 mM)
Glicerol 50%	5.0 ml (25%)
SDS 10%	2 ml (2%)
2-mercaptoetanol	0.5 ml (14.4 mM)
Azul de bromofenol	1 ml (0.1%)
Agua	0.9 ml

Es estable por meses a -20 °C

Buffer separador pH 8.8

Tris 1.5 M pH 8.8
EDTA 8 mM
SDS 0.4%

Buffer concentrador pH 6.8

Tris 0.5 M pH 6.8
EDTA 8 mM
SDS 0.4%

Se prepara el gel sepeador y concentrador como se describe en las tablas a6 y a7, respectivamente. El tiempo recomendado para que la malla del gel se forme correctamente es de aproximadamente 1 hora. Se realiza la mezcla de la muestra de proteína con el buffer de carga y se calienta por 5 minutos a 96 °C. Posteriormente, se centrifuga unos cuantos segundos para precipitar agregados, se toma la parte soluble y se carga en gel. Se corre a 200 volts (voltaje constante). Una vez que el frente de corrida salga del gel o en su defecto llegue a la

parte final, se apaga la fuente de poder y se separa el gel de la alúmina o cristales. Se deposita en un recipiente para teñirlo con azul de Coomassie, este colorante se une a residuos cargados positivamente (Lys y Arg). Las proteínas con un alto contenido de estos residuos tienden a teñirse con mayor intensidad.

Tabla a6. Gel Separador (volumen total 10 ml)

% del gel	Buffer pH 8.8 (ml)	Acrilamida-Bis (ml)	Persulfato de amonio 10% (μl)	TEMED (μl)	Agua (ml)
6.0	2.5	2.0	120	6	5.37
7.5	2.5	2.5	120	6	4.87
10	2.5	3.3	120	6	4.0
12	2.5	4.0	120	6	3.37
15	2.5	5.0	120	6	2.37
18	2.5	6.0	120	6	1.38

Tabla a7. Gel concentrador (volumen total 4 ml)

% del gel	Buffer pH 6.8 (ml)	Archilamida-Bis (ml)	Persulfato de amonio 10% (μl)	TEMED (μl)	Agua (ml)
4.5	1	0.6	37.5	2.5	2.36
3	1	0.43	37.5	2.5	2.53

* tip: para visualizar fácilmente los pozos del gel, agregar azul de bromofenol a una concentración final de 1 mg/ml

Solución para teñir (1 litro) hay que filtrar

Azul de Coomassie R-250	1.0 g
Metanol	450 ml
Agua	450 ml
Acido acético glacial	100 ml

Solución para desteñir (1 litro)

Metanol	100 ml
Ácido acético glacial	100 ml
Agua	800 ml

Se agrega la solución para teñir y se mantiene en agitación por 15 minutos (una forma rápida de teñir es mediante microondas, un pulso de 10 segundos a la máxima potencia es suficiente). Se descarta la solución para teñir y se lava con agua. Posteriormente se adiciona la solución para desteñir y se agita hasta que las bandas de proteínas sean visibles. Si la proteína de interés no es visible, hay que asegurarse de que la muestra tiene proteína, y si aún insiste en ser una proteína mágica, somete el gel a tinción con plata.

Tinción con plata (método rápido)

Solución I: isopropanol 30% (puede ser etanol o metanol) y ácido acético al 10% incubar en agitación constante por 60 minutos.

Solución II: isopropanol al 10% incubar con agitación moderada durante 10 minutos

Solución III: isopropanol al 5% en agitación moderada durante 10 minutos

Solución IV: 100 ml de agua + 2 µl de ditioneitol (DTT) 1 M incubar durante 30 minutos

Solución V: nitrato de plata al 0.1% en 50 ml de agua, incubar durante 30 minutos

Enjuagar con agua

Solución para revelar volumen total 100 ml (50 µl de formaldehído 37 % + carbonato de calcio al 3%), se para la reacción con agua abundante; observaciones, el gel se seca inmediatamente y se vuelve quebradizo.

Hay que considerar que la agitación debe ser moderada (40 a 60 rpm), si se observa un alto fondo en la tinción (que se tiña demasiado el gel), probablemente se debe a impurezas en la acrilamida. El nitrato de plata es venenoso y puede ocasionar irritación en la piel.

Generación de anticuerpos policlonales en conejo

Material:

Adyuvante completo de Freud (ACF)
Adyuvante incompleto de Freud (AIF)
Jeringas 10 ml
Tubos Falcon estériles
Mezcladora (para realizar la emulsión antígeno-adyuvante)
PBS 1X
Antígeno (proteína de interés)

Se sobre-expresa la proteína de interés y se realiza una electroforesis en un gel SDS-PAGE, se identifica la banda por migración relativa al tamaño y se corta (aproximadamente 200 µg/ml). Se tritura hasta obtener una solución viscosa y homogénea. Posteriormente, se incuba en PBS a 37°C toda la noche. Después, se lleva a cabo la emulsión (un volumen total de 3 ml; 1.5 de antígeno + 1.5 ml de ACF ó AIF) y se inmuniza al conejo (hembras mayores de 3 meses dan buenos resultados). La inmunización es subcutánea con un volumen de 0.5 por zona, ver figura a8. Tres inmunizaciones por conejo cada vez.

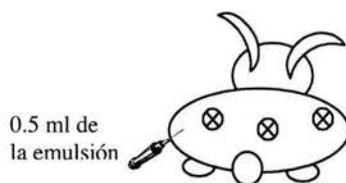


Figura a8. Ubicación de los sitios de la inmunización subcutánea en el conejo

El plan de inmunización se realiza en intervalos de dos semanas por cada inmunización, se toman muestras de suero y se verifica el título por inmunodetección, ver tabla a8.

Tabla a8. Plan de inmunización

Fecha	Inmunización	Muestra de suero
Inicio	No hay	Control (2ml son suficientes)
Semana siguiente	Primera (con ACF)	No hay muestra
Dos semanas siguientes	Segunda (con AIF)	2-5ml de suero
Dos semanas siguientes	Tercera (con AIF)	2-5ml de suero
Dos semanas siguientes	Cuarta (con AIF)	2-5ml de suero
Dos semanas siguientes	Quinta (con AIF)	2-5ml de suero o blanco

Una vez monitoreado un título alto en la inmunodetección, los conejos pueden ser sangrados a blanco, o en su defecto se puede seguir un plan de inmunización más prolongado para extraer una cantidad de suero mayor sin sacrificar al conejo (s). La respuesta inmune del conejo hacia el antígeno se puede detectar después de la segunda inmunización. Sin embargo, una mejor calidad (mayor afinidad) de los anticuerpos se da una vez que se realizó la maduración de los anticuerpos, que generalmente se presenta hasta la quinta inmunización.

Tratamiento del suero:

Se realiza la lisis de las células del suero por aproximadamente una hora a temperatura ambiente. Una vez que se forma el coágulo, se separa de las paredes del tubo falcón, se desecha, se toma el sobrenadante y se centrifuga a 9500 rpm a 4°C, para después almacenarlo a -70°C.

Si el suero presenta un título muy alto, se precipita con sulfato de amonio al 50%, se dializa con PBS exhaustivamente y se filtra. A este filtrado, se le adicionan azida de sodio al 0.2 % y glicerol al 50%. Posteriormente, se almacena a -70°C. Para el caso particular de la α -amilasa de *B. licheniformis* se realizó una dilución 1-500 (mezclar 20 ml de anticuerpo anti- α -amilasa en un volumen de 10 ml de PBS-albúmina 0.3%)

Inmunodetección

El inmunoblot puede ser dividido en dos pasos principalmente: la transferencia de las proteínas del gel a una matriz y la decoración de un epítipo con anticuerpos específicos. La transferencia de la proteína es realizada mediante una electroforesis.

Para transferir en un sistema semi-seco (Semi-dry system): se corta la nitrocelulosa del tamaño del gel, así como papel filtro y se hace un sándwich, se depositan en un recipiente con alrededor de 100 ml de buffer de transferencia, una vez humedecido se coloca en la cámara de transferencia y se corre a 70 mA durante una hora. Los tiempos pueden variar de acuerdo al peso molecular y al punto isoeléctrico (PI) de la proteína de interés. La α -amilasa de *B. liqueniformis* consta de 55 KDa con un PI de 6.52, ver figura a9.

Buffer de transferencia 10 X pH 8.6 (3 litros)

Tris-base	19.3 g
Glicina	90 g
SDS	6 g

Una vez realizada la transferencia, se lava la nitrocelulosa con PBS, posteriormente se bloquea con PBS-BSA 3% por una hora (puede ser toda la noche en agitación moderada a 4⁰C). Después se lava dos veces con PBS-tween 0.3% y dos veces con PBS, 15 minutos en agitación es suficiente para cada lavado (la clave para evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos son los lavados y el tiempo de cada uno de ellos).

Diluir el primer anticuerpo en PBS-albúmina 0.3% (puede ser un volumen de 10-15 ml) y adicionar a la nitrocelulosa en un recipiente. Incubar por aproximadamente una hora a 37⁰C en agitación constante. Se lava un par de veces con PBS-tween 20 y dos con PBS.

El segundo anticuerpo se diluye en PBS-BSA 0.3% y se incuba por una hora en agitación constante a 37⁰C. Se realiza un par de lavados con PBS-tween y dos con PBS. Se agrega el revelador que contiene el sustrato para fosfatasa o peroxidasa, para el caso de la fosfatasa el sustrato líquido comercial tiene excelente desempeño (BCIP/NBT SIGMA) y se monitorea hasta que aparezcan bandas definidas. La reacción se para con agua o PBS con EDTA 0.05 M, ver figura a9i.

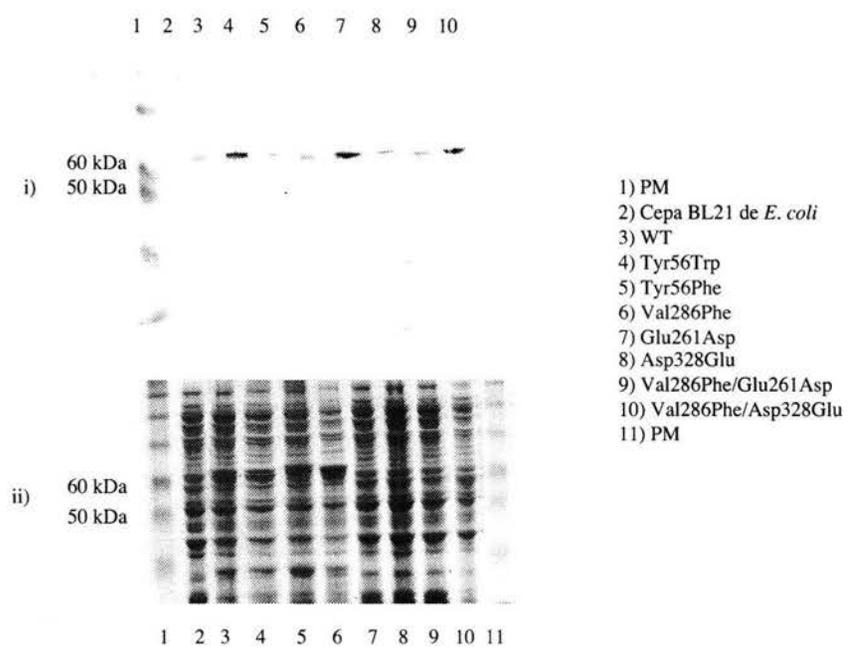


Figura a9. i) inmunodetección de extractos totales de la α -amilasa silvestre y enzimas mutantes(numeradas:3-10). ii) gel control de poliacrilamida- SDS al 10 % teñido con coomassie.

Cajas de agar con almidón

Las cajas de agar con almidón son un método muy sensible que permite monitorear la actividad de hidrólisis de extractos solubles o de proteínas purificadas (ver figura a10), puede ser utilizado como antecedente de selección. La sugerencia es que puede ser montado sobre cajas de ELISA. Se forman halos de actividad dependiendo de la cantidad de enzima depositada en los pozos, así como su actividad hacia el sustrato.

Bacto-agar 0.7g (puede ser agarosa)
Almidón 2g
Tris 20 mM CaCl₂ 10 mM NaCl 1 mM pH 7.5
Se autoaclavea

Los pozos en las cajas de petri se perforan con una punta amarilla acoplada al vacío.

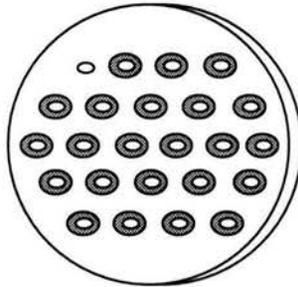


Figura a10. Pozos en caja de petri con agar para detectar la actividad hidrolítica de la α -amilasa de *B. licheniformis*

Se pueden monitorear colonias en cajas con medio mínimo M9 suplementadas con almidón e isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM. Posteriormente, en condiciones estériles se transfieren las colonias con papel de nitrocelulosa a otra caja y se incuban las colonias. Se monitorea la actividad con vapores de lugol. Es necesaria la transferencia, ya que el lugol resulta tóxico para *Escherichia coli*. Se monitorea la formación de halos de actividad en la colonias, se sugiere platear alrededor de 10,000 colonias para distinguir y no saturar la caja. Este método resulta útil, si se pretende hacer una pre-selección de variantes que depolimerizan el almidón.

Bibliografía

- Aghajari, N., G. Feller, et al. (1998). "Crystal structures of the psychrophilic alpha-amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor." *Protein Sci* **7**(3): 564-72.
- Aghajari, N., M. Roth, et al. (2002). "Crystallographic evidence of a transglycosylation reaction: ternary complexes of a psychrophilic alpha-amylase." *Biochemistry* **41**(13): 4273-80.
- Albery, W. J. and J. R. Knowles (1977). "Efficiency and evolution of enzyme catalysis." *Angew Chem Int Ed Engl* **16**(5): 285-93.
- Alcalde, M., F. J. Plou, et al. (1999). "Chemical modification of lysine side chains of cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* causes a shift from cyclodextrin glycosyltransferase to alpha-amylase specificity." *FEBS Lett* **445**(2-3): 333-7.
- Allen, J. D. and J. A. Thoma (1976). "Subsite mapping of enzymes. Depolymerase computer modelling." *Biochem J* **159**(1): 105-120.
- Arnold, F. H. and A. A. Volkov (1999). "Directed evolution of biocatalysts." *Curr Opin Chem Biol* **3**(1): 54-9.
- Beier, L., A. Svendsen, et al. (2000). "Conversion of the maltogenic alpha-amylase Novamyl into a CGTase." *Protein Eng* **13**(7): 509-13.
- Brady, R. L., A. M. Brzozowski, et al. (1991). "Solution of the structure of *Aspergillus niger* acid alpha-amylase by combined molecular replacement and multiple isomorphous replacement methods." *Acta Crystallogr B* **47**(Pt 4): 527-35.
- Brannigan, J. A. and A. J. Wilkinson (2002). "Protein engineering 20 years on." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12): 964-70.
- Brzozowski, A. M. and G. J. Davies (1997). "Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution." *Biochemistry* **36**(36): 10837-10845.
- Brzozowski, A. M., D. M. Lawson, et al. (2000). "Structural analysis of a chimeric bacterial alpha-amylase. High-resolution analysis of native and ligand complexes." *Biochemistry* **39**(31): 9099-107.
- Buléon, A., P. Colonna, et al. (1998). "Starch granules: structure and biosynthesis." *Int J Biol Macro-mol* **23**: 85-112.
- Carlow, D. and R. Wolfenden (1998). "Substrate connectivity effects in the transition state for cytidine deaminase." *Biochemistry* **37**(34): 11873-8.
- Conrad, B., V. Hoang, et al. (1995). "Hybrid *Bacillus amyloliquefaciens* X *Bacillus licheniformis* alpha-amylases. Construction, properties and sequence determinants." *Eur J Biochem* **230**(2): 481-90.
- Crabb, D. W. and C. Mitchinson (1997). "Enzymes involved in the processing of starch to sugars." *TIBTECH* **15**: 349-352.
- Crabb, W. D. and J. Bolin (1999). "Protein technologies and commercial enzymes." *Curr Opin Biotechnol* **10**(4): 321-3.
- Dalmia, B. K., K. Shutte, et al. (1995). "Domain E of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase: an independent starch-binding domain." *Biotechnol Bioeng* **47**: 575-584.
- Dauter, Z., M. Dauter, et al. (1999). "X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution." *Biochemistry* **38**(26): 8385-92.
- Davies, G. J., L. Mackenzie, et al. (1998). "Snapshots along an enzymatic reaction coordinate: analysis of a retaining beta-glycoside hydrolase." *Biochemistry* **37**(34): 11707-13.
- Declerck, N., P. Joyet, et al. (1995). "Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase: multiple amino acid replacements and molecular modelling." *Protein Eng* **8**(10): 1029-37.
- Declerck, N., M. Machius, et al. (1997). "Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase: thermodynamic studies and structural interpretation." *Protein Eng* **10**(5): 541-9.
- Declerck, N., M. Machius, et al. (2000). "Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* alpha-amylase." *J Mol Biol* **301**(4): 1041-57.
- Diderichsen, B., Christiansen, L. (1988). "Cloning of a maltogenic alpha amylase from *Bacillus stearothermophilus*." *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 53-60.
- Fujimoto, Z., K. Takase, et al. (1998). "Crystal structure of a catalytic-site mutant alpha-amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose." *J Mol Biol* **277**(2): 393-407.

- Gottschalk, T. E., D. Tull, et al. (2001). "Specificity modulation of barley alpha-amylase through biased random mutagenesis involving a conserved tripeptide in beta --> alpha loop 7 of the catalytic (beta/alpha)(8)-barrel domain." *Biochemistry* **40**(43): 12844-54.
- Gray, G. L., S. E. Mainzer, et al. (1986). "Structural genes encoding the thermophilic alpha-amylases of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus licheniformis*." *J Bacteriol* **166**(2): 635-43.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." *Electrophoresis* **18**(15): 2714-23.
- Guzman-Maldonado, H. and O. Paredes-Lopez (1995). "Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review." *Crit Rev Food Sci Nutr* **35**(5): 373-403.
- Halle, B. (2002). "Flexibility and packing in proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1274-9.
- Henrissat, B. and A. Bairoch (1996). "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases." *Biochem J* **316**(Pt 2): 695-6.
- Henrissat, B. and G. Davies (1997). "Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases." *Curr Opin Struct Biol* **7**(5): 637-44.
- Holm, L., A. K. Koivula, et al. (1990). "Random mutagenesis used to probe the structure and function of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase." *Protein Eng* **3**(3): 181-191.
- Hooft, R. W., C. Sander, et al. (1996). "The PDBFINDER database: a summary of PDB, DSSP and HSSP information with added value." *Comput Appl Biosci* **12**(6): 525-9.
- Igarashi, K., Y. Hatada, et al. (1998). "Improved thermostability of a *Bacillus* alpha-amylase by deletion of an arginine-glycine residue is caused by enhanced calcium binding." *Biochem Biophys Res Commun* **248**(2): 372-7.
- Igarashi, K., T. Ozawa, et al. (1999). "Thermostabilization by proline substitution in an alkaline, liquefying alpha-amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-1378." *Biosci Biotechnol Biochem* **63**(9): 1535-40.
- Inohara-Ochiai, M., T. Nakayama, et al. (1997). "Altering substrate specificity of *Bacillus* sp. SAM1606 alpha- glucosidase by comparative site-specific mutagenesis." *J Biol Chem* **272**(3): 1601-7.
- Ishii, N., K. Haga, et al. (2000). "Crystal structure of asparagine 233-replaced cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011 determined at 1.9 A resolution." *J Mol Recognit* **13**(1): 35-43.
- Israilides, C., A. Smith, et al. (1999). "Pullulan from agro-industrial wastes." *Biotechnol Genet Eng Rev* **16**: 309-324.
- Janecek, S. (2000). Structural features and evolutionary relationships in the alpha amylase family. *Glycoenzymes*. M. Ohnishi, Hayashi, T., Ishijima, S. & Kuriki, T. Tokio: 19-54.
- Jones, P. T., P. H. Dear, et al. (1986). "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." *Nature* **321**(6069): 522-5.
- Joyet, P., N. Declerck, et al. (1992). "Hyperthermostable variants of a highly thermostable alpha-amylase." *Biotechnology (N Y)* **10**(12): 1579-83.
- Kadziola, A., J. Abe, et al. (1994). "Crystal and molecular structure of barley alpha-amylase." *J Mol Biol* **239**(1): 104-21.
- Kadziola, A., M. Sogaard, et al. (1998). "Molecular structure of a barley alpha-amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis." *J Mol Biol* **278**(1): 205-17.
- Kamitori, S., S. Kondo, et al. (1999). "Crystal structure of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase II (TVaII) hydrolyzing cyclodextrins and pullulan at 2.6 A resolution." *J Mol Biol* **287**(5): 907-21.
- Kandra, L., G. Gyemant, et al. (2002). "Action pattern and subsite mapping of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase (BLA) with modified maltooligosaccharide substrates." *FEBS Lett* **518**(1-3): 79-82.
- Kantrowitz, E. R. and W. N. Lipscomb (1988). "Escherichia coli aspartate transcarbamylase: the relation between structure and function." *Science* **241**(4866): 669-74.
- Kaufman, R. A. and N. W. Tietz (1980). "Recent advances in measurement of amylase activity--a comparative study." *Clin Chem* **26**(7): 846-53.
- Kiel, J. A., J. M. Boels, et al. (1991). "Molecular cloning and nucleotide sequence of the glycogen branching enzyme gene (glgB) from *Bacillus stearothermophilus* and expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." *Mol Gen Genet* **230**(1-2): 136-44.
- Kim, J. S., S. S. Cha, et al. (1999). "Crystal structure of a maltogenic amylase provides insights into a catalytic versatility." *J Biol Chem* **274**(37): 26279-86.
- Klein, C. and G. E. Schulz (1991). "Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 A resolution." *J Mol Biol* **217**(4): 737-50.

- Knegt, R. M., B. Strokopytov, et al. (1995). "Crystallographic studies of the interaction of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 with natural substrates and products." *J Biol Chem* **270**(49): 29256-64.
- Koshland, D. E., Jr. and E. Clarke (1953). "Mechanism of hydrolysis of adenosinetriphosphate catalyzed by lobster muscle." *J Biol Chem* **205**(2): 917-24.
- Kuriki, T., H. Kaneko, et al. (1996). "Controlling substrate preference and transglycosylation activity of neopullulanase by manipulating steric constraint and hydrophobicity in active center." *J Biol Chem* **271**(29): 17321-17329.
- Lawson, C. L., R. van Montfort, et al. (1994). "Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose- dependent crystal form." *J Mol Biol* **236**(2): 590-600.
- Lorentz, K. (2000). "Routine alpha-amylase assay using protected 4-nitrophenyl-1, 4-alpha-D-maltoheptaoside and a novel alpha-glucosidase." *Clin Chem* **46**(5): 644-9.
- Machius, M., N. Declerck, et al. (2003). "Kinetic stabilization of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase through introduction of hydrophobic residues at the surface." *J Biol Chem* **278**(13): 11546-53.
- Machius, M., G. Wiegand, et al. (1995). "Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* alpha-amylase at 2.2 Å resolution." *J Mol Biol* **246**(4): 545-559.
- Mackenzie, L. F., Q. Wang, et al. (1998). "Glycosynthases: Mutant Glycosidases for oligosaccharides synthesis." *J Am Chem Soc* **120**: 5583-5584.
- Marchal, L. M., A. M. van de Laar, et al. (1999). "Effect of temperature on the saccharide composition obtained after alpha-amylolysis of starch." *Biotechnol Bioeng* **63**(3): 344-55.
- Matouschek, A., J. T. Kellis, Jr., et al. (1989). "Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering." *Nature* **340**(6229): 122-6.
- Matsui, I. and B. Svensson (1997). "Improved activity and modulated action pattern obtained by random mutagenesis at the fourth beta-alpha loop involved in substrate binding to the catalytic (beta/alpha)₈-barrel domain of barley alpha-amylase 1." *J Biol Chem* **272**(36): 22456-63.
- Matsui, I., S. Yoneda, et al. (1994). "Roles of the aromatic residues conserved in the active center of *Saccharomycopsis* alpha-amylase for transglycosylation and hydrolysis activity." *Biochemistry* **33**(2): 451-458.
- Matsuura, Y., M. Kusunoki, et al. (1984). "Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A." *J Biochem (Tokyo)* **95**(3): 697-702.
- Matthews, B. W. (1987). "Genetic and structural analysis of the protein stability problem." *Biochemistry* **26**(22): 6885-8.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, et al. (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." *Nature* **348**(6301): 552-4.
- Merino, E., J. Osuna, et al. (1992). "A general, PCR-based method for single or combinatorial oligonucleotide-directed mutagenesis on pUC/M13 vectors." *Biotechniques* **12**(4): 508-10.
- Mirza, O., L. K. Skov, et al. (2001). "Crystal structures of amylosucrase from *Neisseria polysaccharea* in complex with D-glucose and the active site mutant Glu328Gln in complex with the natural substrate sucrose." *Biochemistry* **40**(30): 9032-9.
- Momma, M. (2000). "Cloning and sequencing of the maltohexaose-producing amylase gene of *Klebsiella pneumoniae*." *Biosci Biotechnol Biochem* **64**: 428-431.
- Morishita, Y., K. Hasegawa, et al. (1997). "Crystal structure of a maltotetraose-forming exo-amylase from *Pseudomonas stutzeri*." *J Mol Biol* **267**(3): 661-72.
- Myers, A. M., M. K. Morell, et al. (2000). "Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal." *Plant Physiol* **122**(4): 989-97.
- Nagano, N., E. G. Hutchinson, et al. (1999). "Barrel structures in proteins: automatic identification and classification including a sequence analysis of TIM barrels." *Protein Sci* **8**(10): 2072-84.
- Nagano, N., C. A. Orengo, et al. (2002). "One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions." *J Mol Biol* **321**(5): 741-65.
- Nagano, N., C. T. Porter, et al. (2001). "The (beta/alpha)₈ glycosidases: sequence and structure analyses suggest distant evolutionary relationships." *Protein Eng* **14**(11): 845-55.
- Neuberger, M. S., G. T. Williams, et al. (1984). "Recombinant antibodies possessing novel effector functions." *Nature* **312**(5995): 604-8.

- Nielsen, J. E., L. Beier, et al. (1999). "Electrostatics in the active site of an alpha-amylase." *Eur J Biochem* **264**(3): 816-24.
- Nielsen, J. E., T. V. Borchert, et al. (2001). "The determinants of alpha-amylase pH-activity profiles." *Protein Eng* **14**(7): 505-12.
- Pandey, A., P. Nigam, et al. (2000). "Advances in microbial amylases." *Biotechnol Appl Biochem* **31** (Pt 2): 135-52.
- Penninga, D., B. Strokopytov, et al. (1995). "Site-directed mutations in tyrosine 195 of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 affect activity and product specificity." *Biochemistry* **34**(10): 3368-76.
- Qian, M., V. Nahoum, et al. (2001). "Enzyme-catalyzed condensation reaction in a mammalian alpha-amylase. High-resolution structural analysis of an enzyme-inhibitor complex." *Biochemistry* **40**(25): 7700-9.
- Rauscher, E., U. Neumann, et al. (1985). "Optimized conditions for determining activity concentration of alpha-amylase in serum, with 1,4-alpha-D-4-nitrophenylmaltoheptaoside as substrate." *Clin Chem* **31**(1): 14-9.
- Robyt, J. F. (1998). *Essentials of carbohydrate Chemistry*. New York, Springer.
- Russell, A. J. and A. R. Fersht (1987). "Rational modification of enzyme catalysis by engineering surface charge." *Nature* **328**(6130): 496-500.
- Rydberg, E. H., C. Li, et al. (2002). "Mechanistic analyses of catalysis in human pancreatic alpha-amylase: detailed kinetic and structural studies of mutants of three conserved carboxylic acids." *Biochemistry* **41**(13): 4492-502.
- Rydberg, E. H., G. Sidhu, et al. (1999). "Cloning, mutagenesis, and structural analysis of human pancreatic alpha- amylase expressed in *Pichia pastoris*." *Protein Sci* **8**(3): 635-43.
- Saab-Rincon, G., G. del-Rio, et al. (1999). "Introducing transglycosylation activity in a liquefying alpha-amylase." *FEBS Lett* **453**(1-2): 100-6.
- Santamaria, R. I., G. Del Rio, et al. (1999). "Alcoholysis reactions from starch with alpha-amylases." *FEBS Lett* **452**(3): 346-50.
- Sarkar, G. and S. S. Sommer (1990). "The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis." *Biotechniques* **8**(4): 404-7.
- Schechter, I. and A. Berger (1967). "On the size of the active site in proteases. I. Papain." *Biochem Biophys Res Commun* **27**(2): 157-62.
- Schmidt-Dannert, C. (2001). "Directed evolution of single proteins, metabolic pathways, and viruses." *Biochemistry* **40**(44): 13125-36.
- Shaw, A., R. Bott, et al. (1999). "Protein engineering of alpha-amylase for low pH performance." *Curr Opin Biotechnol* **10**(4): 349-52.
- Shortle, D. (1989). "Probing the determinants of protein folding and stability with amino acid substitutions." *J Biol Chem* **264**(10): 5315-8.
- Sierks, M. R. and B. Svensson (2000). "Energetic and mechanistic studies of glucoamylase using molecular recognition of maltose OH groups coupled with site-directed mutagenesis." *Biochemistry* **39**(29): 8585-92.
- Sigal, I. S., B. G. Harwood, et al. (1982). "Thiol-beta-lactamase: replacement of the active-site serine of RTEM beta-lactamase by a cysteine residue." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(23): 7157-60.
- Skov, L. K., O. Mirza, et al. (2001). "Amylosucrase, a glucan-synthesizing enzyme from the alpha-amylase family." *J Biol Chem* **276**(27): 25273-8.
- Smith, A. M. (1999). "Making starch." *Curr Opin Plant Biol* **2**: 223-229.
- Soberon, X. (1999). "Enzymes directly evolving toward commercial applications." *Nat Biotechnol* **17**(6): 539-40.
- Strobl, S., K. Maskos, et al. (1998). "Crystal structure of yellow meal worm alpha-amylase at 1.64 Å resolution." *J Mol Biol* **278**(3): 617-28.
- Strokopytov, B., R. M. Knegt, et al. (1996). "Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a maltononaose inhibitor at 2.6 Å resolution. Implications for product specificity." *Biochemistry* **35**(13): 4241-9.
- Strokopytov, B., D. Penninga, et al. (1995). "X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases." *Biochemistry* **34**(7): 2234-40.
- Summer, J. B. and S. F. Howell (1935). *J Biol Chem* **108**: 51-54.

- Suvd, D., Z. Fujimoto, et al. (2001). "Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase: possible factors determining the thermostability." *J Biochem (Tokyo)* **129**(3): 461-8.
- Suzuki, Y., N. Ito, et al. (1989). "Amino acids residues stabilizing a *Bacillus* α -amylase against irreversible thermoinactivation." *J Biol Chem* **263**: 18933-18938.
- Takata, H., T. Kuriki, et al. (1992). "Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at alpha-(1----4)- and alpha-(1----6)-glucosidic linkages." *J Biol Chem* **267**(26): 18447-52.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, et al. (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Res* **25**(24): 4876-82.
- Thornton, J. M. (2001). "The Hans Neurath Award lecture of The Protein Society: proteins-- a testament to physics, chemistry, and evolution." *Protein Sci* **10**(1): 3-11.
- Tomazic, S. J. and A. M. Klibanov (1988). "Why is one *Bacillus* alpha-amylase more resistant against irreversible thermoinactivation than another?" *J Biol Chem* **263**(7): 3092-6.
- Uitdehaag, J. C., K. H. Kalk, et al. (1999). "The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a gamma-cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-Å resolution." *J Biol Chem* **274**(49): 34868-76.
- Uitdehaag, J. C., R. Mosi, et al. (1999). "X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the alpha-amylase family." *Nat Struct Biol* **6**(5): 432-6.
- Van den Burg, B., G. Vriend, et al. (1998). "Engineering an enzyme to resist boiling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2056-60.
- van der Maarel, M. J., B. van der Veen, et al. (2002). "Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family." *J Biotechnol* **94**(2): 137-55.
- van der Veen, B. A., J. C. Uitdehaag, et al. (2000). "Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity." *Biochim Biophys Acta* **1543**(2): 336-360.
- van der Veen, B. A., G. J. van Alebeek, et al. (2000). "The three transglycosylation reactions catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* (strain 251) proceed via different kinetic mechanisms." *Eur J Biochem* **267**(3): 658-65.
- Vihinen, M., P. Ollikka, et al. (1990). "Site-directed mutagenesis of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: putative role of three conserved residues." *J Biochem (Tokyo)* **107**(2): 267-272.
- Vriend, G. (1990). "WHAT IF: a molecular modeling and drug design program." *J Mol Graph* **8**(1): 52-6, 29.
- Watanabe, K., Y. Hata, et al. (1997). "The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline- substitution sites for protein thermostabilization." *J Mol Biol* **269**(1): 142-53.
- Wilkinson, A. J., A. R. Fersht, et al. (1983). "Site-directed mutagenesis as a probe of enzyme structure and catalysis: tyrosyl-tRNA synthetase cysteine-35 to glycine-35 mutation." *Biochemistry* **22**(15): 3581-6.
- Wilks, H. M., D. J. Halsall, et al. (1990). "Designs for a broad substrate specificity keto acid dehydrogenase." *Biochemistry* **29**(37): 8587-91.
- Wilks, H. M., K. W. Hart, et al. (1988). "A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase framework." *Science* **242**(4885): 1541-4.
- Wilks, H. M., K. M. Moreton, et al. (1992). "Design of a specific phenyllactate dehydrogenase by peptide loop exchange on the *Bacillus stearothermophilus* lactate dehydrogenase framework." *Biochemistry* **31**(34): 7802-6.
- Wind, R. D., J. C. Uitdehaag, et al. (1998). "Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1." *J Biol Chem* **273**(10): 5771-9.
- Winter, G., A. R. Fersht, et al. (1982). "Redesigning enzyme structure by site-directed mutagenesis: tyrosyl tRNA synthetase and ATP binding." *Nature* **299**(5885): 756-8.

α -Amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity

Manuel Heriberto Rivera, Agustín López-Munguía,
Xavier Soberón and Gloria Saab-Rincón¹

Instituto de Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca,
Morelos 62271, México

¹To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gsaab@ibt.unam.mx

The α -amylase from *Bacillus licheniformis* is the most widely used enzyme in the starch industry owing to its hyperthermostability, converting starch to medium-sized oligosaccharides. Based on sequence alignment of homologous amylases, we found a semi-conserved sequence pattern near the active site between transglycosidic and hydrolytic amylases, which suggested that hydrophobicity may play a role in modifying the transglycosylation/hydrolysis ratio. Based on this analysis, we replaced residue Val286 by Phe and Tyr in *Bacillus licheniformis* α -amylase. Surprisingly, the two resultant mutant enzymes, Val286Phe and Val286Tyr, showed two different behaviors. Val286Tyr mutant was 5-fold more active for hydrolysis of starch than the wild-type enzyme. In contrast, the Val286Phe mutant, differing only by one hydroxyl group, was 3-fold less hydrolytic than the wild-type enzyme and apparently had a higher transglycosylation/hydrolysis ratio. These results are discussed in terms of affinity of subsites, hydrophobicity and electrostatic environment in the active site. The engineered enzyme reported here may represent an attractive alternative for the starch transformation industries as it affords direct and substantial material savings and requires no process modifications.

Keywords: amylases/catalysis/site-directed mutagenesis/transglycosylation reaction

Introduction

The global market for starch processing enzymes is around US \$156 million and the cost of the enzymes used in the liquefaction process represents 24% of the total process cost (Crabb and Mitchinson, 1997). Therefore, any improvement in either the enzyme production yield, thermostability or activity will have a direct impact in the process performance, economics and feasibility.

The industrial starch process requires several enzymes: the first step is carried out with *Bacillus licheniformis* α -amylase, which is used to depolymerize starch to maltodextrins and corn syrup solids by controlled hydrolysis, a process known as liquefaction. From this point, other enzymes are introduced, depending on the desired final products. For the production of glucose, the use of glucoamylase is necessary to complete hydrolysis. It would be highly desirable that a single enzyme would hydrolyze starch to glucose or, alternatively, that all the enzymes required for the process functioned under the same

reaction conditions (Guzman-Maldonado and Paredes-Lopez, 1995).

α -Amylases (α -1,4-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) catalyze the hydrolysis of the α -1,4 glycosidic linkages of starch, found in amylose and amylopectin. They are classified into family 13 according to the classification of glycoside hydrolases (Henrissat *et al.*, 1995; Brzozowski and Davies, 1997; Henrissat and Davies, 1997; Davies *et al.*, 1998). The main structural feature of family 13 enzymes is the presence of the characteristic $(\beta/\alpha)_8$ barrel catalytic domain with a varying number of extra domains, depending on the type of amylase. In particular, α -amylases are characterized by the presence of three different domains: a central $(\beta/\alpha)_8$ barrel domain (domain A), which is interrupted by an irregular β -domain (domain B) inserted between the third β -strand and the third α -helix of the TIM barrel, and a third domain (domain C), which is a Greek key motif located on the opposite side of the barrel. The active site is situated in a cleft at the interface between domains A and B, where the C-termini of the β -strands and loops joining the β -strands to the α -helix in the TIM barrel are found (Nagano *et al.*, 2001).

Protein engineering can greatly benefit from the analysis of sequences related to that of the target protein. Natural evolution provides relevant information through the differential conservation of residues in families of proteins with slightly different functions. One should keep in mind, however, that selective pressure operates on circumstances that usually deviate significantly from those required in bioprocesses.

In the case of α -amylases, most of the protein engineering work has been devoted to increasing its stability to temperature and its operative pH range (Declerck *et al.*, 1995, 1997, 2000; Igarashi *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 1999), and also to dealing with successful changes in catalytic activity or in product specificity (Kuriki *et al.*, 1996; Inohara-Ochiai *et al.*, 1997; Matsui and Svensson, 1997; Wind *et al.*, 1998a,b; Saab-Rincon *et al.*, 1999; Beier *et al.*, 2000; Brzozowski *et al.*, 2000; Gottschalk *et al.*, 2001). We have previously demonstrated in *Bacillus stearothermophilus* α -amylase that the introduction of transglycosylation activity, present in saccharifying amylases, through the mutation of Ala289 to Tyr, changed the product specificity to higher yields of smaller oligosaccharides (Saab-Rincon *et al.*, 1999). However, owing to its industrial importance and high thermostability, the α -amylase from *B.licheniformis* is the best option for protein engineering in order to extend its range of applications. Although it has been reported that α -amylase from *B.licheniformis* is mainly hydrolytic, higher transglycosylation activity could be obtained (Thompson *et al.*, 1997; Marchal *et al.*, 1999) by incorporating the same mutation previously designed for the *B.stearothermophilus* α -amylase (both enzymes share 63% identity). In this paper, we describe the enzymatic characterization of *B.licheniformis* α -amylase mutants Val286Tyr and Val286Phe (equivalent to Ala289 in

Enzyme	Loop 4	Loop 5	Loop 6	Loop 7	
B.lichen	DGFRIDAVKIKF 238	KTGKEMFTVA	EWQND 266	VFDVPLH 289	VNNHDTFGQS 334
B.amylo	DGFRIDAAKIKF 238	ATGKEMFTVA	EWQNN 266	VFDVPLH 289	VNNHDTFGQS 334
B.stearo	DGFRIDAVKIKF 241	QTGKPLFTVG	EWNSYD 269	LFQAPLH 292	VNNHDTFGQA 337
B.sub	DGFRIDAAKIEL 183	NTSAEFGG	EILODS 213	VLASNYG 232	---HTYANDD 275
Taka-amy	DGLRIDAVKIVQK 213	-KAAGVFCIG	EVLDDG 235	VLNDFPIY 255	VNNHDTFGQS-PRFA 303
A.niger	DGLRIDSVLEVQP 213	-KASGVKCVG	EIDNGN 235	VLNDFPIY 255	IENHDTFGQS 303
H.sapiens sal	AGFRIDASKMWP 204	PEGSKPFIYQ	EVID-- 236	VDFPKYG 259	VNNHDTFGQS- 306
H.sapiens pan	AGFRIDASKMWP 204	PAGSKPFIYQ	EVID-- 236	VDFPKYG 259	VNNHDTFGQS- 306
Pig panc	AGFRIDASKMWP 204	PAGSRPFIYQ	EVID-- 236	VDFPKYG 259	VNNHDTFGQS- 306
Tenebrio	AGFRIDAAKEMSP 192	ADGARPFYQ	EVID-- 225	VLEDFQY 248	VNNHDTFGQS 293
Alteromonas	KGFRIDASKVAA 181	-GS-PVVFQ	EVID-- 203	VDFPKYS 226	VNNHDTFGQS 270
Barley	DGWRIDAVKISL 186	---EPSEFAV	EINTSL 209	EFDFTTK 249	VNNHDTFG 291
B. circ1	DGIRIDAVKIMPF 236	---VFTFG	EWFLGV 262	-LDFRFA 286	IDNHDMRFRFA 334
B. circ2	DGIRIDAVKIMPL 236	---VFTFG	EWFLGS 262	-LDFRFN 286	IDNHDMRFRFA 334
B. specie	DGIRIDAVKIMPF 236	---VFTFG	EWFLGV 262	-LDFRFA 286	IDNHDMRFRFA 334
B. stearo	DGIRIDAVKIMPF 232	---VFTFG	EWFLSE 257	-LDFRFG 281	IDNHDMRFRMI 330
Thermo sulfu	DGIRIDAVKIMPF 237	---VFTFG	EWFLGT 263	-LDFRFS 283	IDNHDMRFRFN 335
Novamyl	DGLRIDAVKIFNS 235	---IFLVG	EWYDGD 261	-LDFDLN 287	IDNHDMRFRFLS 335
Thermus sp.	DGWRIDVANEID 335	---VILIG	EIWHDA 362	---YPLA 380	LGSHTPRLIT 427
Ther NPL	DGWRIDVANEVD 332	---ALIVG	EIWHDA 359	---YLFR 377	LGSHTPRLIT 430
Ps Mtose	GGFRIDVVRGYAP 200	---ELWKGPE	EPNWD 231	-PVDFFA 257	VNNHDTFGSPG 300
Olig gluc	DGFRIDVINFISK 206	---YDINTVG	EMPGVT 260	-MVFQFE 284	VNNHDTFGSRVVS 335
Nss suc	DILRIDAVAFIWK 293	---SEAIVHP	333	---PLQM 351	VNNHDTFGSFARG 399

Fig. 1. Multiple structural alignment of the catalytic loops (4, 5, 6 and 7) between several members of the glycoside hydrolase family 13. On the left column are the enzymes ID α -amylases as follows: B. lichen, *B.licheniformis* α -amylase, PDB code 1VJS (henceforth given in parentheses) (Hwang et al., 1997); B. amylo, *Bacillus amyloliquefaciens* chimera α -amylase with decarboxose bound (1E43) (Brzozowski et al., 2000); B. stearo, *B.stearothermophilus* α -amylase (1HVX) (Suvd et al., 2001); B. sub, *Bacillus subtilis* 2633 α -amylase (1BAG) (Fujimoto et al., 1998); Taka-amy, *Aspergillus oryzae* α -amylase (2TAA) (Matsuura et al., 1984); A. niger, *Aspergillus niger* α -amylase (2AAA) (Brady et al., 1991); H. sapiens sal, *Homo sapiens* salivary α -amylase (1JXK) (to be published); H. sapiens pan, *Homo sapiens* pancreatic α -amylase (1HNY) (Rydberg et al., 1999); Pig panc, *Sus scrofa* pancreatic α -amylase (pig) (1HX0) (Qian et al., 2001); Tenebrio, *Tenebrio molitor* α -amylase (1JAE) (Strobl et al., 1998); Alteromonas, *Pseudoalteromonas haloplanktis* α -amylase (1G94) (Aghajari et al., 1998, 2002); Barley, *Hordeum vulgare* α -amylase (1AMY) (Kadziola et al., 1994); B. circ1, *Bacillus circulans* 251 cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) (1CDG) (Lawson et al., 1994); B. circ2, *Bacillus circulans* 8 CGTase (1CGT) (Klein and Schulz, 1991); B. specie, *Bacillus* sp. 1011 CGTase (1D7F) (Ishii et al., 2000); B. stearo, *B.stearothermophilus* CGTase (1CYG); Thermo sulfu, *Thermoanaerobacter thermosulfurogenus* CGTase (1A47) (Wind et al., 1998); Novamyl, *B.stearothermophilus* maltogenic α -amylase (1QHO) (Dauter et al., 1999); Thermus sp, *Thermus* sp. maltogenic α -amylase (1SMA) (Kim et al., 1999); Ther NPL, *Thermoactinomyces vulgaris* neopullulanase (1BVZ) (Kamitori et al., 1999); Ps Mtose, *Pseudomonas stutzeri* maltotetraose-forming α -amylase (2AMG) (Morishita et al., 1997); Olig gluc, *Bacillus cereus* oligo-glucosidase (1UOK) (Watanabe et al., 1997); and Nss suc, *Neisseria polysaccharea* amylosucrase (1G5A) (Mirza et al., 2001). The conserved residues are marked with an asterisk. The catalytic glutamic acid looks like a semi-conserved residue due to the Glu209Gln mutant-B. sub. The positions of the target (homologous aromatic residue) are indicated with a double asterisk.

the *B.stearothermophilus* enzyme). We found that the two mutants show different kinetic behaviors. From the wild-type (WT) crystal structure, no direct contact is observed between the position Val286 and any of the catalytic residues. We hypothesized that the effect of the mutation was indirect through an interaction with residue Trp263. To demonstrate this hypothesis, we constructed the double mutant Val286Tyr/Trp263Leu, which recovered the WT enzyme activity. The results reported here suggest that the introduction of a bulky aromatic residue at position 286 affects the position of residue Trp263, which is in the vicinity of the catalytic acid residue Glu261 (Trp263-Ce to Glu261-Oe₂ 3.35 Å). The different behavior of the Val286Phe highlights the importance of electrostatic interactions in this mutation.

Materials and methods

Sequence alignment

A multiple sequence alignment was done with 23 starch-degrading enzymes using the programs Clustal X and pdviewer (Guex and Peitsch, 1997; Thompson et al., 1997). Some members of the glycoside hydrolase family are defined in Figure 1. The first three enzymes shown are liquefying amylases, while the remaining nine are saccharifying enzymes. In the lower part are shown the enzymes that are natural transferases.

Site-directed mutagenesis

The *B.licheniformis* α -amylase gene (ATCC-27811) was isolated by polymerase chain reaction (PCR) amplification from genomic DNA with the following primers: 5'-ATATGCTCTAGAAGGAGATATACATATGAAACAA-CAAAAACGGC-3' and 5'-TGCCCCAAGCTTCTATCTTT-GAACATATGAAAC-3'. The PCR product was cloned into the plasmid pET3a and sequenced. The amylase gene was overexpressed in the *Escherichia coli* strain BL21. The mega primer method for site-directed mutagenesis (Sarker and Sommer, 1990) was used to construct a DNA fragment carrying the mutations at positions 263 and 286 using the oligonucleotides 5'-GTCATTCTGCAGATATTCAGCT-3' and 5'-AATGAAGCGGATAGTCAAACAC-3', respectively, in combination with the oligonucleotide 5'-ATATGCTCTA-GAAGGAGATATACATATGAAACAACAAAACGGC-3' that anneals at the 5'-termini of the gene.

Enzyme purification

Enzyme production. For α -amylase production, transformants were cultured in 1 l of minimal medium M9 supplemented with appropriate antibiotics (ampicillin, 200 µg/ml and chloramphenicol, 20 µg/ml) and induced with dioxane free isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 0.5 mM. Cell extracts containing wild-type and mutant enzymes were heated at

70°C for 1 h. Enzymes were purified using gel-filtration Superose 12 H/R (Pharmacia) in an AKTA FPLC system. Protein concentration was quantified using the Bradford method (Bio-Rad).

Activity assay

Starch. Depolymerization of starch (soluble starch from Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was followed by measuring the formation of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller, 1959). The amount of enzyme was adjusted to give a linear response from 0 to 9 min, in order to measure the rate of formation of reducing sugars. Soluble starch was prepared by heating a suspension of starch at concentrations ranging from 0 to 10 mg/ml in the reaction buffer (20 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 1 mM NaCl at pH 7.5) until a homogeneous, viscous solution was obtained. Once the temperature had equilibrated at 80°C, the reaction was started by the addition of α -amylase and 200 μ l samples were taken every 3 min and placed in DNS solution to stop the reaction and perform the analysis. After incubation for 5 min in boiling water, samples were cooled and the OD was read at 540 nm. The amount of reducing sugars was expressed as dextrose equivalents using a calibration curve. Lineweaver–Burk-type plots were built to obtain Michaelis–Menten parameters. A unit of enzyme activity is defined as 1 μ mol of dextrose equivalent released per minute.

pNPG7. The hydrolytic activity of the α -amylase over benzylidene-blocked *p*-nitrophenyl maltoheptaoside (pNPG7) was determined for the WT enzyme and for the Val286Tyr variant using the Randox (UK) assay amylase kit at 37°C and 1.32 and 0.78 nM of enzyme, respectively. Parameters k_{cat} and K_{M} were calculated from initial rates in the 0.027–2.13 μ M substrate concentration range. The activity assay also involved two indicator enzymes, glucoamylase to cleave the amylase reaction product and α -glucosidase to release the *p*-nitrophenol (the terminal glucose of the substrate is chemically blocked at both ends, preventing cleavage by the indicator enzymes). The *p*-nitrophenol released is determined spectroscopically at 405 nm, using a molar extinction coefficient of $\epsilon = 12\,005$ l/mol·cm (Lorentz, 2000) and is equivalent to the substrate hydrolyzed by the α -amylase (Kaufman *et al.*, 1980; David, 1982; Rauscher *et al.*, 1985).

Evidence of transglycosylation reactions using malto-oligosaccharides

In order to highlight the transglycosylation reactions, small oligosaccharides were used as substrates. Although they are bad substrates for hydrolysis, they allow us to distinguish transglycosylation products through the appearance of higher molecular weight oligosaccharides. Oligosaccharides from G3 to G7 were used to determine the product profile of each enzyme; 100 mM of each substrate were incubated with the same hydrolytic activity units (determined with starch) of each enzyme at 80°C. The reaction buffer was 20 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 1 mM NaCl at pH 7.5. Aliquots were taken at 10, 30 and 60 min and 49 h (when equilibrium was reached), diluted 1:10 and analyzed by HPLC in a Waters Millipore system with a refractive index detector, using a reversed-phase C₁₈ column (250×4.6 mm i.d.). Elution was performed with pure water at a flow rate of 0.7 ml/min. The peak areas were measured and compared against those of a standard solution containing known amounts of oligosaccharides from G1 to G7.

Evidence of transglycosylation reactions using radioactive maltose (G2') as acceptor

Radioactive maltose (Amersham Pharmacia Biotech) and maltotetraose (Sigma) were incubated at 80°C in 20 mM Tris buffer at pH 7.5 containing 10 mM CaCl₂ and 1 mM NaCl. Reactions were initiated by addition of the same activity units of the different mutant enzymes to digest 100 mg/ml of substrate pre-incubated for 10 min at the reaction temperature and analyzed after 48 h of reaction. The reaction was stopped by incubation on ice and immediately loaded on a TLC plate. The plate was developed with α -naphthol and also visualized on a Molecular Dynamics PhosphorImager.

Test of thermostability

For the determination of the inactivation rate constants, the kinetics of irreversible loss of enzyme activity were measured as follows. Pure samples were dialyzed against 20 mM Tris, 1 mM CaCl₂, 1 mM NaCl buffer at pH 7.5 and then the total content of protein was measured by the Bradford method. Samples were placed in Eppendorf tubes and incubated at 80°C in a water bath. The remaining activity of the incubated samples was measured at 80°C using DNS with 10 mg/ml of starch for different times (0, 10, 20, 30, 40 and 50 min). The values were processed as reported previously (Declerck *et al.*, 2000).

Results

Identifying potential residues important for specificity

We carried out a sequence analysis and structural comparison of amylases that have the ability to perform transglycosylation reactions with those which are mainly hydrolytic (Figure 1). From this analysis, conserved regions in the C-terminal end of the β -strands (β 4, β 5, β 6 and β 7) of the TIM barrel domain were found, including the three classical regions previously identified in the α -amylase family (loops 4, 5 and 7), which contain the catalytic residues Asp231, Glu261 and Asp328, respectively (*B.licheniformis* α -amylase numbering) (Vihinen *et al.*, 1990; Takata *et al.*, 1992; Henrissat *et al.*, 1995; Kuriki *et al.*, 1996; Henrissat and Davies, 1997; Janecek, 2000). However, we also found one more conserved region corresponding to loop 6 (see Figure 1). Within this region, we identified a residue at position 286 (*B.licheniformis* α -amylase numbering) showing an altered pattern between liquefying and saccharifying enzymes. In the former, small residues are observed, whereas for the latter, aromatic residues are predominant. Based on these results, we constructed the Val286Tyr and Val286Phe mutants from *B.licheniformis* α -amylase, in order to evaluate how this position affects transferase activity and other enzyme properties including product specificity.

Activity

A comparison of the catalytic parameters of the Val286Tyr and Val286Phe variants with those of the WT enzyme was carried out using soluble starch as a substrate, measuring the release of reducing sugars. In the case of the Val286Tyr variant and the WT enzymes, benzylidene-blocked pNPG7 was also used, measuring the release of *p*-nitrophenol. All enzymes exhibited a Michaelis–Menten kinetic behavior. Table I shows the kinetic parameters obtained on starch, where it may be observed that the Val286Tyr mutant has a catalytic efficiency five times higher than the WT enzyme. This result is mainly due to an increase in the turnover number rather than to a change in K_{M} .

Table I. Kinetic parameters obtained for starch by different WT and mutant α -amylases at different temperatures

Enzyme	<i>B.licheniformis</i> α -amylase at 80°C			<i>B.stearothermophilus</i> α -amylase at 60°C		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mg/ml)	k_{cat}/K_M (ml/mg·s)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mg/ml)	k_{cat}/K_M (ml/mg·s)
WT	$1.2 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^2$	1.15 ± 0.09	$1.1 \times 10^3 \pm 1.8 \times 10^2$	$1.9 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^3$	3.4 ± 0.5	$5.5 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3$
Val286Phe	$1.4 \times 10^3 \pm 2.9 \times 10^2$	4.4 ± 0.9	$3.6 \times 10^2 \pm 1.2 \times 10^2$	$5.1 \times 10^3 \pm 3.4 \times 10^2$	2.0 ± 0.3	$2.5 \times 10^3 \pm 5.4 \times 10^2$
Val286Tyr	$6.9 \times 10^3 \pm 8.9 \times 10^2$	1.4 ± 0.19	$5.4 \times 10^3 \pm 1.3 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3 \pm 81$	1.9 ± 0.4	$6.3 \times 10^2 \pm 1.7 \times 10^2$
Trp263Leu	ND	ND	ND	NM	NM	NM
Trp263Leu/Val286Tyr	$8.4 \times 10^2 \pm 1.3 \times 10^2$	2.4 ± 0.41	$3.8 \times 10^2 \pm 1.08 \times 10^2$	NM	NM	NM

Kinetic parameters of *B.licheniformis* α -amylase WT and mutants (Val286Phe, Val286Tyr, Trp263Leu and Trp263Leu/Val286Tyr). The errors are shown as standard deviations. k_{cat} = μ mol dextrose equivalents per minute per mg of protein. K_M = starch dissociation constant. The parameters for *B.stearothermophilus* α -amylase WT and mutants are shown for comparison (Saab-Rincon *et al.*, 1999). NM, activity not measured; ND, activity not detected after several hours.

In contrast, the Val286Phe mutant, in which a Val residue is also replaced by an aromatic one, had a 3-fold decrement in catalytic efficiency as a result of a higher K_M , leaving k_{cat} practically unchanged. The Val286Tyr mutant showed the same behavior with benzylidene-blocked pNPG7 as with starch, yielding a 10-fold increment in turnover number relative to the WT enzyme ($k_{catWT} = 8.4 \times 10^{-1}$; $k_{catV286Y} = 8.02 \text{ s}^{-1}$, $K_{MWT} = 0.21$ and $K_{MV286Y} = 0.43 \mu\text{M}$). Owing to their similar structure, we think that the different behaviors observed for the two mutants can be attributed to the polarity and hydrogen-bonding capability of the hydroxyl group.

The previous work on α -amylase from *B.stearothermophilus* suggested that the mutation of the equivalent position to an aromatic residue affected the orientation of a Trp residue that interacts with the catalytic Glu through a water molecule. In order to demonstrate if such an interaction could exist in the context of the *B.licheniformis* α -amylase, we constructed the double mutant Val286Tyr/Trp263Leu. The catalytic parameters of this mutant, also shown in Table I, are similar to those of the WT enzyme, suggesting that indeed there is an interaction between a bulkier amino acid such as Tyr with Trp at position 263 that changes the catalytic site giving rise to the modified activity.

Role of residue at positions 286 and 263 in the active site

In order to explain the differences found in catalytic properties between the mutants Val286Tyr, Val286Phe, Trp263Leu/Val286Tyr and the WT enzyme in terms of the structure, we built models using a public Website, Swiss-Model (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>), using the coordinates of the WT from *B.licheniformis* α -amylase (1VJS pdb entry) as template. Swiss-Model works with a Relax module that uses a library of allowed side-chain rotamers, sorted by increasing frequency of occurrence in known 3D structures. First the distorted but complete side chains are corrected. A van der Waals exclusion test and dihedral angle constraints are then used to select among allowed rotamers. The geometries of the side chains of the models were evaluated using the WHAT_IF (Vriend, 1990) and WHAT_CHECK programs (Hooft *et al.*, 1996). We generated a structural superposition of the *B.licheniformis* α -amylase and chimera α -amylase (taking residues 1–300 from the *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase and residues 301–483 from the *B.licheniformis* α -amylase) and the model generated for the mutants Val286Tyr and Val286Phe (see Figure 2a). The models for the Phe and Tyr mutants are practically identical, except for the hydroxyl group of the Tyr which seems to be very close to the main-chain carbonyl of the catalytic Glu residue (OH-C α 2.7 Å and OH-C γ 2.4 Å) (Figure 2b). The superposition of the decarboxose on the generated models, based on the structure of the chimeric α -amylase, B. amylo, suggests that close contact could occur between the Tyr and the sugar ring above it, involving subsites +2 and +3 (see Figure 2a).

The structural alignment between the modeled mutants and WT enzyme do not show positional differences for the side chain of Trp263 (see Figure 2a). Usually in α -amylases, those enzymes which carry an aromatic residue at the position equivalent to Val 286 do not contain an aromatic residue at the position equivalent to Trp263 (see Figure 1), with the only exception of barley α -amylase in which the equivalent position to 286 is occupied by a Phe residue and a Trp at the position equivalent to 263 (see Figure 1). It is noteworthy that in the

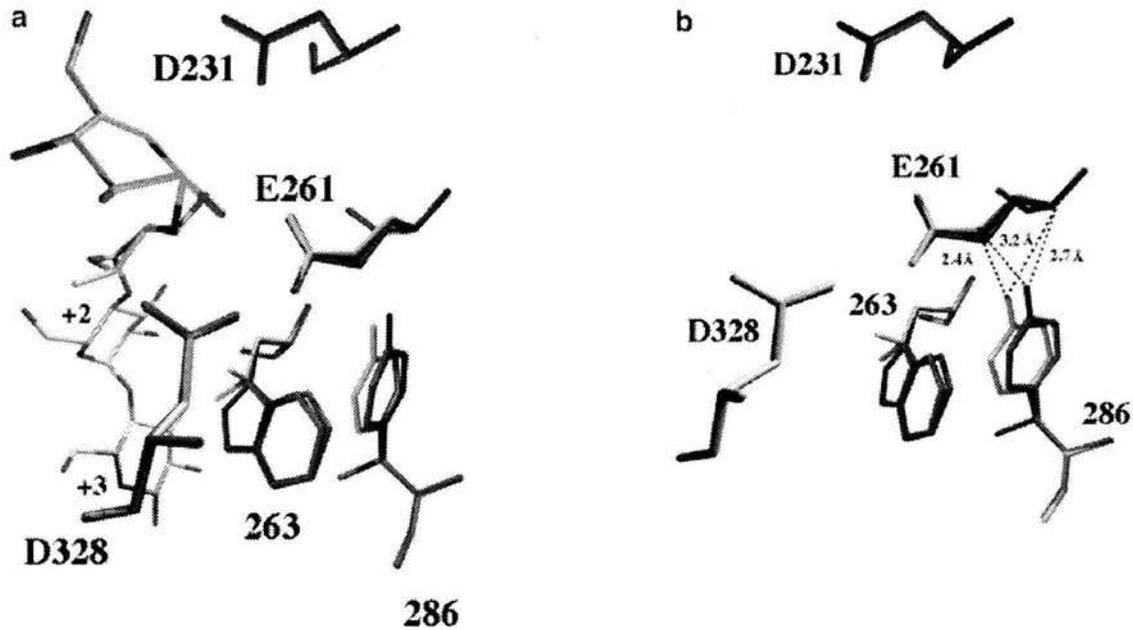


Fig. 2. View of the aligned active site of *B.licheniformis* α -amylase WT and modeled mutants (Val286Tyr, Val286Phe and Val286Tyr/Trp263Leu). The corresponding residues in WT enzyme are in green and the mutants in blue, red and yellow, respectively. (a) The units of glucose from acarbose superimposed show the subsites +2 and +3 and are located over the residue 263 as reference. (b) The distances between the hydroxyl group of Tyr at position 286 and the main-chain atoms of residue 261 are indicated.

crystal structure of this enzyme (Kadziola *et al.*, 1998), the equivalent Phe residue orients the Trp equivalent to 263 by stacking interactions. This Trp residue is bridged to the main-chain carbonyl oxygen of the active site Glu residue through a water molecule. In our generated models, the orientation of the Trp residue is only slightly rotated relative to the WT structure and continues to be perpendicular to the Tyr286 residue. We cannot discard that the orientation of the Trp residue found in the models is biased by the WT structure used as template. We have to recognize that water molecules that play an important role in hydrogen-bond networks along the structure, and also the possible stabilization by stacking interactions among aromatic residues, are not taken into account in the modeling process. Our experimental results with the double mutant Val286Tyr/Trp263Leu clearly point to an interaction between the two positions when occupied by aromatic residues. The replacement of Trp263 by Leu removes the positive effect in the catalytic efficiency obtained upon Val286Tyr mutation. If the contributions to the activity of the two aromatic residues were independent of one another, their effect would be additive and then the $\Delta(\Delta G^\ddagger)$ values between the Val286Tyr relative to WT and Val286Tyr/Trp263Leu relative to the single mutant Trp263Leu would be the same. We constructed the single mutant Trp263Leu to corroborate this hypothesis. As can be observed in Table I, the deleterious effect of this mutation is much more dramatic in the context of the WT enzyme than in the context of the Val286Tyr mutant, demonstrating that there is a synergistic effect when these positions are both occupied by aromatic residues.

As for the difference in activity between the Val286Phe and Val286Tyr mutant enzymes, in the generated model of the Val286Tyr mutant the hydroxyl group points towards the main-

chain of Glu261 (Figure 2a). Although the model does not predict any hydrogen bonding between these residues, an interaction through a water molecule could exist. Glu261 is the general acid catalyst that protonates the leaving group of natural substrates during the first step of the double displacement reaction and that activates the acceptor group (either water or another glycosyl residue) during the second step (Uitdehaag *et al.*, 1999a,b; Rydberg *et al.*, 2002). Thus, Tyr286 could be acting as a reservoir of water, favoring the hydrolytic reactions.

Specificity and product profile

Hydrolysis product profile using oligosaccharides (G1–G7) as substrate. In order to establish if the reaction rate observed in the mutants is a result of a change in the product specificity, we compared the hydrolysis digestion patterns among the constructed variants and the WT enzyme using starch and various oligosaccharides as substrates (G3, G4, G5, G6 and G7). Although, in general terms, the main starch digestion products reported previously for the commercial WT enzyme at pH 6.5–6.9 and 90°C (Marchal *et al.*, 1999) are the same as those obtained with the recombinant enzyme used in the present study (G5, G3 and G2), a significant production of G1 was observed (data not shown). This pattern was the same for WT and all the mutants with the exception of the double mutant Val286Tyr/Trp263Leu, which showed a lower proportion of G1 (data not shown). As far as the use of small oligosaccharides as substrates is concerned, only the WT and Val286Phe enzymes showed activity with G3. For the other mutants, G4 was the smallest oligosaccharide they were able to hydrolyze at a very slow rate. During short incubation times (up to 1 h), only the WT enzyme shows high transglycosylation and hydrolysis

Table II. Hydrolytic activities of the WT and mutant enzymes determined by HPLC after 49 h of reaction at 80°C

	G4				G5			
	WT	Val286Tyr	Val286Phe	Trp263Leu/Val286Tyr	WT	Val286Tyr	Val286Phe	Trp263Leu/Val286Tyr
G1	0.43	0.05	0.2	0.06	0.4	0.05	0.2	0.2
G2	1.5	0.3	0.8	0.9	1.5	0.8	1.1	1.7
G3	1.2	0.5	0.7	3.2	1.2	0.9	0.9	2.2
G4	0.6	3.1	0.5	7.7	0.7	0.2	0.6	1.1
G5	0.9	0.04	0.7	0.5	0.8	3.6	0.9	6.4
G6	0.5	0.0	0.9	0.0	0.6	0.0	1.1	0.0
G7	0.2	0.0	0.4	0.0	0.3	0.0	0.5	0.0

	G6				G7			
	WT	Val286Tyr	Val286Phe	Trp263Leu/Val286Tyr	WT	Val286Tyr	Val286Phe	Trp263Leu/Val286Tyr
G1	0.4	0.2	0.4	0.7	0.4	0.2	0.3	0.3
G2	1.4	1.0	1.3	3.5	1.4	1.3	1.2	3.1
G3	1.1	0.8	1.1	3.3	1.1	1.2	1.1	2.7
G4	0.6	0.1	0.5	1.4	0.6	0.2	0.7	0.9
G5	0.8	1.6	0.8	5.1	0.8	2.1	1.0	3.3
G6	0.6	0.06	0.7	0.2	0.5	0.0	1.2	0.0
G7	0.4	0.0	0.4	0.0	0.1	0.0	0.6	0.0

Different small oligosaccharides were used as substrate and the concentrations of products are represented in mM. The start concentrations used for each oligosaccharide were G4 21, G5 16, G6 13 and G7 11 mM.

activities with G4 as a substrate (data not shown). After periods of incubation as long as 49 h, when equilibrium is reached, the product profiles of WT and Val286Phe mutant are very similar, leaving only 6.09 and 6.25% of G4, respectively, and producing mainly G1 and G2 (see Table II and Figure 3) in addition to products of transglycosylation, such as G5, G6, G7 and larger oligosaccharides. In contrast, the mutants containing Tyr at position 286 were less efficient in the use of G4 (59.3 and 49.4% unreacted substrate, respectively), accumulating some G5 as result of transglycosylation and producing different amounts of G3, G2 and G1 (see Table II and Figure 3). When G5 was used as substrate, the Val286Tyr and Val286Tyr/Trp263Leu mutants showed some hydrolysis products early in the reaction. However, the increase of these products was very slow, reaching only ~9.6 and 14.45% of G1, ~37.89 and 35.9% of G2, 15.51 and 16.74% of G3 and 2.85 and 7.13% of G4, respectively, after 49 h of reaction. In contrast, the WT enzyme clearly showed the presence of transglycosylation products, in addition to the hydrolysis products, yielding a more efficient degradation of G5 at equilibrium, although also the accumulation of G6 and G7 as a result of transglycosylation reactions (see Figure 3). The Val286Phe mutant showed a slower but similar behavior to the WT enzyme, generating at the end a similar product profile (Table II). When G6 and G7 were used as substrates, activity was evident for all the mutants at short incubation times (10 min, data not shown). It is clear from the high molecular weight products that the mutants containing Tyr at position 286 are able to transglycosylate. However, at long incubation times, all these products are hydrolyzed, yielding a product pattern in which G2, G3 and G5 are the predominant species. In contrast, the WT and Val286Phe mutant enzymes yield a more spread product profile, with G1 and G2 being the main products, but showing the presence of larger oligosaccharides, products of transglycosylation reactions (Figure 3). Since these two enzymes are capable of using G6 and G7 as substrates, the accumulation of these and larger oligosaccharides at long incubation periods suggests a higher transglycosylation/hydrolysis ratio for them. The production of

G5, G6 and G7 suggests transglycosylation activity for all the variants when G4 was used as substrate. This activity was also reported by Marchal *et al.* (Marchal *et al.*, 1999), who observed an increased contribution of transglycosylation reactions to hydrolysis of small oligosaccharides (G3–G7) with commercial α -amylase from *B.licheniformis* (Maxamyl®, Genencor) at higher temperatures, reducing the end product specificity.

Transglycosylation profile using radioactive maltose (G2^r) as acceptor with G4 as substrate detected by α -naphthol and visualized on a Molecular Dynamics PhosphorImager

The different product profile obtained with the variant enzymes suggests either a change in the reaction mechanism or a change in the specificity of the subsites. The results obtained are consistent with the existence of at least eight subsites for both WT and variants of α -amylase from *B.licheniformis*. When all of them are occupied (using substrates longer than G7), no difference in the product profile is observed. However, when the enzymes reach the limiting size substrates, differences start to show up, outlining the different affinity in at least one of the subsites among the different variants. In order to investigate this hypothesis, we decided to study the hydrolysis of G4 (see Figure 4) in the presence of traces of radioactively labeled G2. If transglycosylation reactions take place, then radioactively labeled maltose (that could act as an acceptor in transglycosylation reactions) would distribute among the products according to the enzyme specificity. It is important to take into account that transglycosylation products would be hydrolyzed relatively fast and this will be reflected in the product profile. Figure 4a and b show the incorporation of the labeled G2 after 48 h of reaction. WT and Val286Phe mutant enzymes showed a very similar product profile with the production of radiolabeled G1. In contrast, Val286Tyr and the double mutant Val286Tyr/Trp263Leu incorporated much less labeled G2, produced less G1 (observed both by radioactivity and by development with α -naphthol) and accumulated more G4. It is interesting to observe the difference in concentration of G4 for the Val286Tyr and the double mutant Val286Tyr/Trp

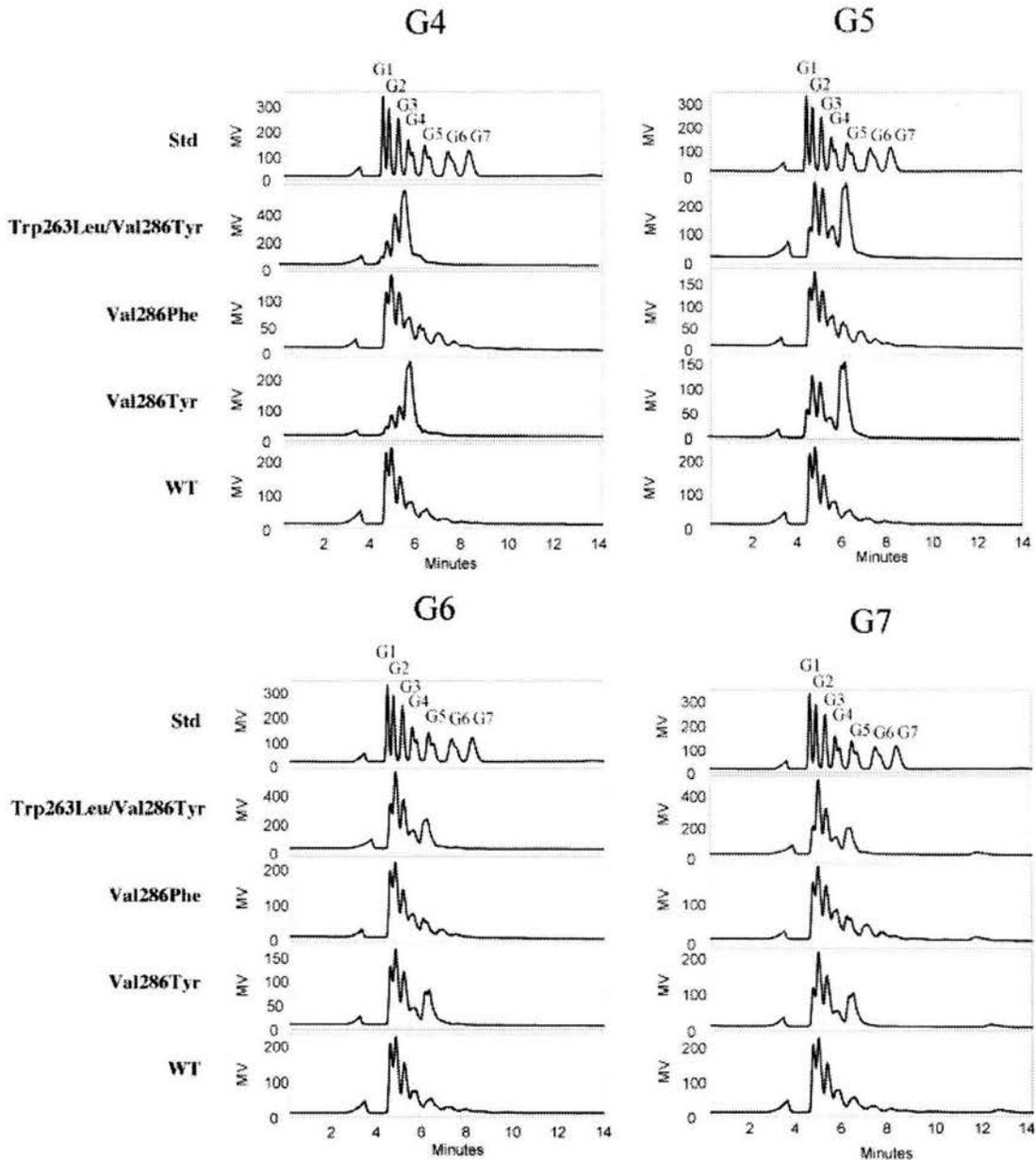


Fig. 3. Comparative products profile using small oligosaccharides as substrates determined by HPLC after 49 h of reaction at 80°C. At the top of each series is indicated the oligosaccharide used as a substrate and on the left the variant enzyme that produced the digestion profile shown.

263Leu when observed by radioactivity (Figure 4b) compared to revealing with α -naphthol (Figure 4a). This indicates that, indeed, the higher accumulation of G4 for these two variants is due to a lower activity towards this substrate rather than the feedback as a result of transglycosylation, suggesting a decrement in affinity of a subsite on the reducing end positions (after the cleavage site). A recent report of the subsite mapping of *B.licheniformis* α -amylase demonstrates that subsite -5 is indeed the highest affinity subsite, followed by subsite -2, then subsite +3 and finally subsites +2 and -3, for which the authors report equal apparent binding energies (Kandra *et al.*, 2002). Since the residue that we are mutating is between subsites +2 and +3, we do not expect the affinity of subsite -5 to be affected, and therefore the higher accumulation of G5 in the

Tyr mutants must be attributed to a decrease in the affinity of subsites +2 and/or +3. In agreement with this hypothesis, a 2-fold increment in K_M for the Val286Tyr mutant was observed when benzylidene-blocked pNPG7 was used as substrate relative to the WT enzyme. In the case of the Val286Phe mutant we do not have affinity constants for small oligosaccharides; however, its loss of catalytic efficiency is mainly attributed to an increase in the K_M for starch, so that as it is as bad as the Val286Tyr mutant in binding small oligosaccharides in a productive way, the only explanation for its higher efficiency in the process of both G5 and G4 is its higher transglycosylation capability, so that the few productive events give rise to larger products that are more efficiently processed. These results further demonstrate the lower transglycosylation

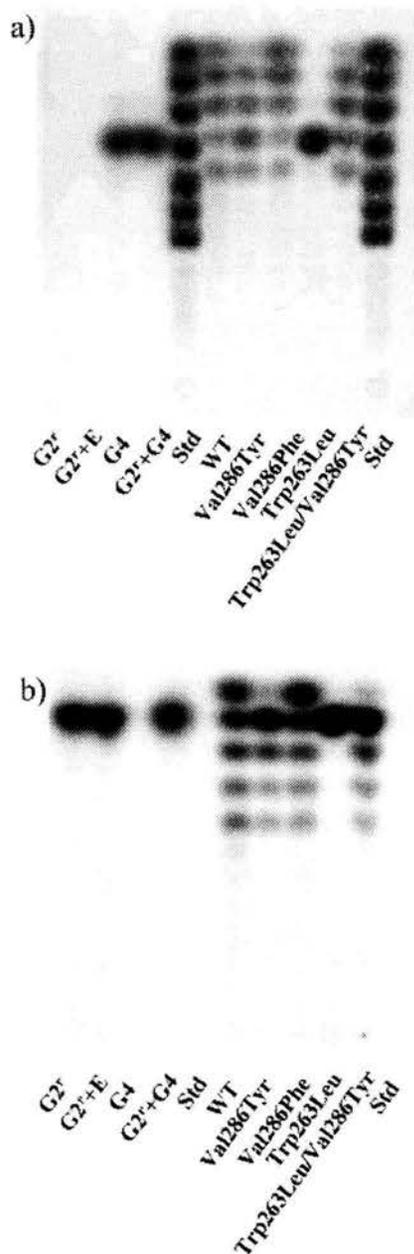


Fig. 4. Hydrolytic activity on maltotetraose (G4) and radioactive maltose (G2') of WT and mutants (Val286Tyr, Val286Phe, Trp263Leu and Trp263Leu/Val286Tyr) detected by TLC at 48 h. We used maltodextrins (G1–G7) as standard (Std), G2' without enzyme, G2' with WT enzyme, G4 without enzyme and G2' + G4 without enzyme as controls. (a) Hydrolysis of G4 detected by α -naphthol and (b) transglycosylation of labeled maltose visualized on a Molecular Dynamics PhosphorImager.

activity of the Tyr mutation at position 286. The presence of the hydroxyl group of tyrosine must favor the entrance of water over other acceptor groups, shifting the reaction towards hydrolysis, which is limited by the low affinity of the enzyme for such small substrates. Val286Phe and the WT enzyme, having more hydrophobic side chains, favor the entrance of less polar acceptors than water, as previously proposed by Matsui *et al.* (Matsui *et al.*, 1994).

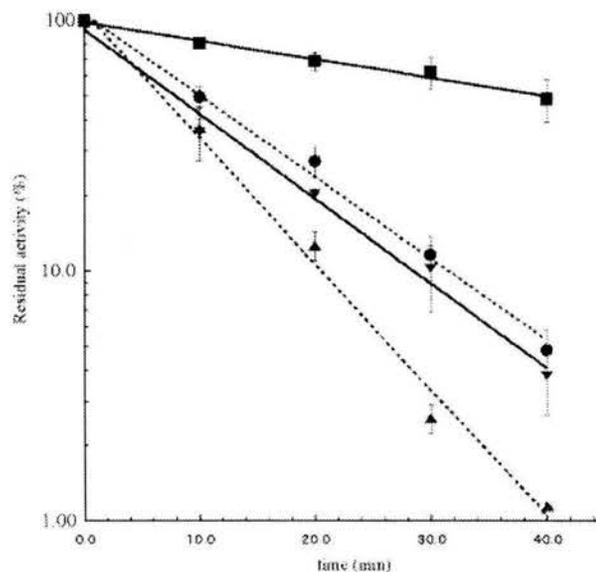


Fig. 5. Irreversible thermal inactivation at 80°C, pH 7.5, 1 mM CaCl₂, of WT (filled circles) and mutants Val286Tyr (filled triangles and dotted line), Val286Phe (filled squares) and Trp263Leu/Val286Tyr (filled inverted triangles and solid line). The linear regression of $\ln(\text{activity})$ versus incubation time was used to determine the $t_{1/2}$ of enzymes graphically. The $t_{1/2}$ for the WT was ~10 min and that for the mutant Val286Tyr was ~7 min. The $t_{1/2}$ for Val286Phe was ~40 min and that for the double mutant Trp263Leu/Val286Tyr was ~8 min.

Thermostability

For industrial applications it is important to demonstrate the thermostability of the more active Val286Tyr mutant. When this variant and the WT enzyme were incubated at 80°C in buffer containing 10 mM Ca²⁺, no activity loss was observed after incubating over a period of 6 h for either of the two enzymes. This time is three times longer than that required for industrial liquefaction of starch. In order to stress any possible difference in stability, the irreversible thermal inactivation of the mutants Val286Tyr and Val286Phe, the double mutant Val286Tyr/Trp263Leu and WT were investigated by incubating the purified enzymes at 80°C for different intervals of time, reducing the concentration of Ca²⁺ to 1 mM to destabilize them. After different intervals of incubation, samples were taken and placed on ice for 15 min and their residual activity towards starch measured at 80°C. Figure 5 shows the residual activities against incubation time at 80°C for the WT and variants. All the curves were described by an exponential first-order decay model, yielding a half-life of 7 min for the Val286Tyr mutant, 8 min for the double mutant Val286Tyr/Trp263Leu and 40 min for the Val286Phe mutant compared with 10 min for the WT enzyme. In conclusion, under a high-stress assay, a decrease in stability was observed for the proteins carrying the Val286Tyr mutation. Interestingly, the Val286Phe was the most thermostable.

Discussion

To our surprise, mutant Val286Tyr had an increased activity when compared with the WT enzyme. The same mutation in the context of the α -amylase from *B.stearothermophilus* resulted in a reduction of the hydrolytic activity and a change in product profile, explained by the introduction of trans-

glycosylation activity (Saab-Rincon *et al.*, 1999). This different behavior for the same mutation in both enzymes is unexpected considering the degree of identity between them (63%). However, these enzymes show some functional differences from the beginning. Whereas WT α -amylase from *B.stearothermophilus* was not able to transglycosylate at all, the WT α -amylase from *B.licheniformis* had some transglycosylation activity, particularly at high temperatures and with excess of substrate (Marchal *et al.*, 1999). Thus, in the case of the α -amylase from *B.stearothermophilus*, it was easy to identify the new activity over a null background, whereas in the *B.licheniformis* enzyme it is difficult to observe clear differences in the transglycosylation or in the product profile when starch is used as substrate. However, we found some differences among the variant generated enzymes on reaction with small oligosaccharides. With the smallest oligosaccharide that all the enzymes were able to hydrolyze, G4, the WT and V286F variant enzymes yielded G1 and G2 in high proportion, whereas the V286Y mutant produced only a small amount of G1 and processed less G4. Since this mutant has been demonstrated to be more active than WT and V286F variant, this lower activity towards G4 can only be explained by a lower affinity for this substrate and/or to its lower capability of carrying out transglycosylation reactions. Since both transglycosylation and hydrolysis reactions are occurring simultaneously, it is complicated to quantify their individual contributions to the final result. However, in the case of the mutants containing Tyr at position 286, a loss of affinity for substrates smaller than G5 is clear, but also a lower incorporation of G2, suggesting a lower transglycosylation activity. In the case of the Val286Phe mutant enzyme, any possible loss of affinity is clearly compensated by its higher transglycosylation activity. Explaining these differences in structural terms is difficult, since an equivalent change in orientation of Trp263 is expected whether Tyr or Phe is at position 286. Both mutations seem to have a negative effect on K_M and therefore on the catalytic efficiency. In the case of Tyr, the hydroxyl group points out towards the catalytic site, probably contributing to a more polar environment, which not only compensates for the loss in affinity, but also increases k_{cat} . From the analysis of the behavior of the different mutants generated, two effects can be isolated: (i) the increase in activity seems to be directly related to the presence of the hydroxyl group in a certain geometry relative to the active site; a change in the position of this hydroxyl group, as possibly occurred in the Val286Tyr/Trp263Leu double mutant, cancelled the increment in activity observed upon the first mutation; and (ii) the decrease observed in the transglycosylation reaction is directly related to the polarity of the residue at position 286. This last statement is supported by the results with the double mutant, whose activity is closer to the WT; however, it is less transglycosidic, yielding a product profile more similar to the obtained with the Val286Tyr mutant.

The irreversible thermal inactivation of the *B.licheniformis* α -amylase was studied by Declerck *et al.* in detail (Declerck *et al.*, 2000). These authors identified, by site-directed mutagenesis, the structural determinants for the stability, such as residues involved in salt bridges, calcium binding or potential deamidation processes. They demonstrated that the structural determinants that contribute to the thermal stability are concentrated in domain B and its interface with the catalytic domain (domain A). It was interesting to observe a 30% decrement in the half-life of the Val286Tyr mutant,

whereas the Val286Phe mutant showed a 4-fold increase in half-life under the same conditions. Again, one would expect that any steric effect from the introduction of an aromatic ring would disturb the structure in a similar way; however, the presence of the hydroxyl group seems to be producing major rearrangements, at least when the concentration of Ca^{2+} is held below 1 mM. The change of the bulky Trp263 by a smaller Leu residue counteracted the disturbance produced by the introduction of the Tyr at position 286, showing a half-life similar to the WT enzyme. In practical terms, the conditions used for the determination of stability are more stressing than those used in the industrial process of starch, conditions under which we did not observe any change in thermal inactivation of the Val286Tyr mutant for several hours.

Conclusions

By modifying residues near the active site, we obtained an enzyme that is five times more active than the WT without altering in practical terms its thermostability or its product specificity towards starch. The different behaviors of the Phe and Tyr mutants allowed the identification of the importance of the polarity and/or hydrogen bonding for the conformation of the (general acid) active residue Glu261, and also the importance of the hydrophobicity at position 286 to increase transglycosylation. The results obtained here support the idea stated previously (Saab-Rincon *et al.*, 1999) that an increase in transglycosylation is at the expense of the hydrolysis rate and vice versa. On the other hand, the introduction of transglycosylation shifts the product profile towards shorter oligosaccharides owing to the efficient recycling of medium-sized oligosaccharides to generate longer ones that can be more efficiently digested by the enzyme. The results shown here can be extended to identify other residues important to dictating the specificity of the reaction products and thus engineering proteins to modify their specificity and improve their catalysis, with important implications for the starch industrial process.

Acknowledgements

We thank Fernando González Muñoz for technical assistance in the HPLC analysis of samples, Eugenio López and Paul Gaytán for the synthesis of oligonucleotides and René Hernández and Maricela Olvera for sequencing of clones. This work was supported by CONACyT Grant NC230 to X.S. and PAPIIT Grant IN222999 to A.L.-M.

References

- Aghajari, N., Feller, G., Gerday, C. and Haser, R. (1998) *Protein Sci.*, **7**, 564–572.
- Aghajari, N., Roth, M. and Haser, R. (2002) *Biochemistry*, **41**, 4273–4280.
- Beier, L., Svendsen, A., Andersen, C., Frandsen, T.P., Borchert, T.V. and Cherry, J.R. (2000) *Protein Eng.*, **13**, 509–513.
- Brady, R.L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E.J. and Dodson, G.G. (1991) *Acta Crystallogr. B*, **47**, 527–535.
- Brzozowski, A.M. and Davies, G.J. (1997) *Biochemistry*, **36**, 10837–10845.
- Brzozowski, A.M., Lawson, D.M., Turkenburg, J.P., Bisgaard-Frantzen, H., Svendsen, A., Borchert, T.V., Dauter, Z., Wilson, K.S. and Davies, G.J. (2000) *Biochemistry*, **39**, 9099–9107.
- Crabb, W.D. and Mitchinson, C. (1997) *TIBTECH*, **15**, 349–352.
- Dauter, Z., Dauter, M., Brzozowski, A.M., Christensen, S., Borchert, T.V., Beier, L., Wilson, K.S. and Davies, G.J. (1999) *Biochemistry*, **38**, 8385–8392.
- David, H. (1982) *Clin. Chem.*, **28**, 1485–1489.
- Davies, G.J., Dauter, M., Brzozowski, A.M., Bjornvad, M.E., Andersen, K.V. and Schulein, M. (1998) *Biochemistry*, **37**, 1926–1932.
- Declerck, N., Joyet, P., Trosset, J.Y., Garnier, J. and Gaillardin, C. (1995) *Protein Eng.*, **8**, 1029–1037.
- Declerck, N., Machius, M., Chambert, R., Wiegand, G., Huber, R. and Gaillardin, C. (1997) *Protein Eng.*, **10**, 541–549.

- Declerck,N., Machius,M., Wiegand,G., Huber,R. and Gaillardin,C. (2000) *J. Mol. Biol.*, **301**, 1041–1057.
- Fujimoto,Z., Takase,K., Doui,N., Momma,M., Matsumoto,T. and Mizuno,H. (1998) *J. Mol. Biol.*, **277**, 393–407.
- Gottschalk,T.E., Tull,D., Aghajari,N., Haser,R. and Svensson,B. (2001) *Biochemistry*, **40**, 12844–12854.
- Guex,N. and Peitsch,M.C. (1997) *Electrophoresis*, **18**, 2714–2723.
- Guzman-Maldonado,H. and Paredes-Lopez,O. (1995) *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **35**, 373–403.
- Henrissat,B. and Davies,G. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 637–644.
- Henrissat,B., Callebaut,I., Fabrega,S., Lehn,P., Morion,J.P. and Davies,G. (1995) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 7090–7094.
- Hooft,R.W.W., Vriend,G., Sander,C. and Abola,E.E. (1996) *Nature*, **381**, 272.
- Hwang,K.Y., Song,H.K., Chang,C., Lee,J., Lee,S.Y., Kim,K.K., Choe,S., Sweet,R.M. and Suh,S.W. (1997) *Mol. Cells*, **7**, 251–258.
- Igarashi,K., Hatada,Y., Ikawa,K., Araki,H., Ozawa,T., Kobayashi,T., Ozaki,K. and Ito,S. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**, 372–377.
- Inohara-Ochiai,M., Nakayama,T., Goto,R., Nakao,M., Ueda,T. and Shibano,Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 1601–1607.
- Ishii,N., Haga,K., Yamane,K. and Harata,K. (2000) *J. Biochem. (Tokyo)*, **127**, 383–391.
- Janecek,S. (2000) In Ohnishi,M., Hayashi,T., Ishihima,S. and Kuriki,T. (eds), *Glycoenzymes*. Vol. 1. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 19–54.
- Kadziola,A., Abe,J., Svensson,B. and Haser,R. (1994) *J. Mol. Biol.*, **239**, 104–121.
- Kadziola,A., Sogaard,M., Svensson,B. and Haser,R. (1998) *J. Mol. Biol.*, **278**, 205–217.
- Kamitori,S., Kondo,S., Okuyama,K., Yokota,T., Shimura,Y., Tonozuka,T. and Sakano,Y. (1999) *J. Mol. Biol.*, **287**, 907–921.
- Kandra,L., Gyemant,G., Remenyik,J., Hovanzski,G. and Liptak,A. (2002) *FEBS Lett.*, **518**, 79–82.
- Kaufman,R.A. and Tietz,N.W. (1980) *Clin. Chem.*, **26**, 846–853.
- Kim,J.S. et al. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 26279–26286.
- Klein,C. and Schulz,G.E. (1991) *J. Mol. Biol.*, **217**, 737–750.
- Kuriki,T., Kaneko,H., Yanase,M., Takata,H., Shimada,J., Handa,S., Takada,T., Umeyama,H. and Okada,S. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 17321–17329.
- Lawson,D.M., Brzozowski,A.M., Rety,S., Verma,C. and Dodson,G.G. (1994) *Protein Eng.*, **7**, 543–550.
- Lorentz,K. (2000) *Clin. Chem.*, **46**, 644–649.
- Marchal,L.M., van de Laar,A.M., Goetheer,E., Schimmelpennink,E.B., Bergsma,J., Beefink,H.H. and Tramper,J. (1999) *Biotechnol. Bioeng.*, **63**, 344–355.
- Matsui,I. and Svensson,B. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 22456–22463.
- Matsui,I., Yoneda,S., Ishikawa,K., Miyairi,S., Fukui,S., Umeyama,H. and Honda,K. (1994) *Biochemistry*, **33**, 451–458.
- Matsuura,Y., Kusunoki,M., Harada,W. and Kakudo,M. (1984) *J. Biochem. (Tokyo)*, **95**, 697–702.
- Miller,G.L. (1959) *Anal. Chem.*, **31**, 426–428.
- Mirza,O., Skov,L.K., Remaud-Simeon,M., Potocki de Montalk,G., Albenne,C., Monsan,P. and Gajhede,M. (2001) *Biochemistry*, **40**, 9032–9039.
- Morishita,Y., Hasegawa,K., Matsuura,Y., Katsube,Y., Kubota,M. and Sakai,S. (1997) *J. Mol. Biol.*, **267**, 661–672.
- Nagano,N., Porter,C.T. and Thornton,J.M. (2001) *Protein Eng.*, **14**, 845–855.
- Nielsen,J.E., Beier,L., Otzen,D., Borchert,T.V., Frantzen,H.B., Andersen,K.V. and Svendsen,A. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **264**, 816–824.
- Qian,M., Nahoum,V., Bonicel,J., Bischoff,H., Henrissat,B. and Payan,F. (2001) *Biochemistry*, **40**, 7700–7709.
- Rauscher,E., Neumann,U., Schaich,E., von Bulow,S. and Wahlefeld,A.W. (1985) *Clin. Chem.*, **31**, 14–19.
- Rydberg,E.H. et al. (1999) *Protein Sci.*, **8**, 635–643.
- Rydberg,E.H., Li,C., Maurus,R., Overall,C.M., Brayer,G.D. and Withers,S.G. (2002) *Biochemistry*, **41**, 4492–4502.
- Saab-Rincon,G., del-Rio,G., Santamaria,R.I., Lopez-Munguia,A. and Soberon,X. (1999) *FEBS Lett.*, **453**, 100–106.
- Sarker,G. and Sommer,S. (1990) *Biotechniques*, **8**, 404–407.
- Shaw,A., Bott,R. and Day,A.G. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**, 349–352.
- Strobl,S., Maskos,K., Betz,M., Wiegand,G., Huber,R., Gomis-Ruth,F.X. and Glockshuber,R. (1998) *J. Mol. Biol.*, **278**, 617–628.
- Suvid,D., Fujimoto,Z., Takase,K., Matsumura,M. and Mizuno,H. (2001) *J. Biochem. (Tokyo)*, **129**, 461–468.
- Takata,H., Kuriki,T., Okada,S., Takesada,Y., Iizuka,M., Minamiura,N. and Imanaka,T. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 18447–18452.
- Thompson,J.D., Gibson,T.J., Plewniak,F., Jeanmougin,F. and Higgins,D.G. (1997) *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4876–4882.
- Uitdehaag,J.C., Kalk,K.H., van Der Veen,B.A., Dijkhuizen,L. and Dijkstra,B.W. (1999a) *J. Biol. Chem.*, **274**, 34868–34876.
- Uitdehaag,J.C., Mosi,R., Kalk,K.H., van der Veen,B.A., Dijkhuizen,L., Withers,S.G. and Dijkstra,B.W. (1999b) *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 432–436.
- Vihinen,M., Ollikka,P., Niskanen,J., Meyer,P., Suominen,I., Karp,M., Holm,L., Knowles,J. and Mantsala,P. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)*, **107**, 267–272.
- Vriend,G. (1990) *J. Mol. Graph.*, **8**, 52–56.
- Watanabe,K., Hata,Y., Kizaki,H., Katsube,Y. and Suzuki,Y. (1997) *J. Mol. Biol.*, **269**, 142–153.
- Wind,R.D., Uitdehaag,J.C., Buitelaar,R.M., Dijkstra,B.W. and Dijkhuizen,L. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 5771–5779.

Received April 28, 2003; revised May 29, 2003; accepted June 2, 2003