



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

GENERACIÓN DE MUTANTES DE  $\alpha$ -AMILASA  
DE *Thermotoga maritima* CON UNA ACTIVIDAD  
ALCOHOLITICA INCREMENTADA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS  
P R E S E N T A :  
BIOL. JUANITA YAZMIN DAMIAN ALMAZO

Tutor: Dra. Gloria Saab Rincón

Cuernavaca, Mor.

Diciembre 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**Este trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Xavier Soberón Mainero, en el departamento de Ingeniería celular y biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Gloria Saab Rincón, contando con el apoyo económico para la realización de los estudios de maestría por parte del CONACYT.**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
Glicosil hidrolasas	1
Alquil glicósidos	4
Producción de alquil glicósidos mediante glicosidasas	5
$\alpha$ -Amilasas	6
Características	6
Reacciones de alcoholólisis en $\alpha$ -Amilasas	9
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>13</b>
$\alpha$ -Amilasas de <i>Thermotoga maritima</i> MSB8	13
Reacción de alcoholólisis catalizada por AmyA	14
Aumento de la actividad alcoholólica de AmyA de <i>T. maritima</i> mediante mutagénesis sitio dirigida	15
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>20</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>21</b>
Generación del modelo estructural de la $\alpha$ -Amilasa de <i>T. maritima</i>	21
Construcción y clonación de los genes mutantes	21
Construcción de megaprimers	21
Amplificación de los genes mutantes	22
Digestión y ligación de los genes en el vector	25
Transformación y clonación de los genes	26
Cambio de péptido señal en la enzima silvestre y mutantes mas alcoholíticas	26
PelB	27
TorA	29
Expresión de las proteínas	29
Purificación de las proteínas	29
Enzima silvestre	29
Enzima silvestre y mutantes expresadas con 6-His	30
Enzima silvestre y mutantes expresadas co PelB y 6-His	32
Caracterización de las mutantes	32
Determinación de actividad específica	33
Cinética tipo Michaelis-Menten	33
Ensayo de estabilidad	33
Perfil de productos con diferentes sustratos	33
a) Almidón 10 mg/ml (1%)	34
b) Maltodextrinas (G1-G7) 2%	34
Reacciones de alcoholólisis usando almidón 6%-metanol 20%	34
a) Cuantificación de reacciones de alcoholólisis empleando glucoamilasa	34
b) Análisis de productos de reacción	35
Análisis de la expresión de mutantes H222 con péptidos PelB y TorA	35
<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
Modelo estructural de la $\alpha$ -Amilasa AmyA de <i>Thermotoga maritima</i>	37

Expresión y purificación de las enzimas	40
Expresión de las proteínas con PelB y TorA	41
Actividad específica y parámetros catalíticos de las enzimas silvestre y mutantes	43
Perfil de productos con diferentes sustratos	44
a) Hidrólisis de almidón 10 mg/ml	44
b) Transglicosidación empleando G7 al 2%	45
c) Transglicosidación (Alcoholólisis) empleando almidón 6%-metanol 20%	47
Cuantificación de metilglucósido generado por la enzima silvestre y las mutantes H222D, H222E y H222Q	48
Perfil de productos empleando maltodextrinas G2 a G7 2%	51
Termoestabilidad	54
<b><u>DISCUSION</u></b>	<b>55</b>
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>59</b>
<b><u>REFERENCIAS</u></b>	<b>60</b>
<b><u>ANEXOS</u></b>	<b>64</b>
ANEXO I Residuos del modelo generado para la $\alpha$ -amilasa de <i>Thermotoga maritima</i> localizados a 4 -5 Å alrededor de la molécula de acarbosa	64
ANEXOII Determinación de la concentración de proteína mediante Bio-Rad	65
ANEXO III Determinación de actividad específica mediante la formación de azúcares reductores	67
ANEXO IV Cuantificación de metilglucósido y determinación de actividad hidrolítica y alcoholítica de la enzima silvestre y mutantes H222DEQ	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AmyA</b>	$\alpha$ -amilasa A de <i>Thermotoga maritima</i>
<b>AmyB</b>	$\alpha$ -amilasa B de <i>Thermotoga maritima</i>
<b>AmyC</b>	$\alpha$ -amilasa C de <i>Thermotoga maritima</i>
<b>CGTasas</b>	Ciclodextringlicosil transferasas
<b>Cicl</b>	Coclodextrinas
<b>DNS</b>	Acido 3,5-Dinitrosalicilico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Acido tetracetico etilen diamina
<b>FPLC</b>	Fast Protein liquid Chromatography
<b>G1</b>	Glucosa
<b>G2</b>	Maltosa
<b>G3</b>	Maltotetriososa
<b>G4</b>	Maltotetraosa
<b>G5</b>	Maltopentaosa
<b>G6</b>	Maltohexaosa
<b>G7</b>	Maltoheptaosa
<b>G8</b>	Maltocataosa
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactosido
<b>Mdx</b>	Maltodextrinas
<b>Met</b>	Metilglucósido
<b>TAE</b>	Amortiguador Tris acetato EDTA
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>Tris</b>	Amortiguador Tris(hidroximetil)aminometano
<b>UDP</b>	Uridina difosfato

# INTRODUCCION

## GLICOSIL HIDROLASAS

Las glicosil hidrolasas o glicosidasas (EC 3.2.1) son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico formado entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato unido a otra molécula.

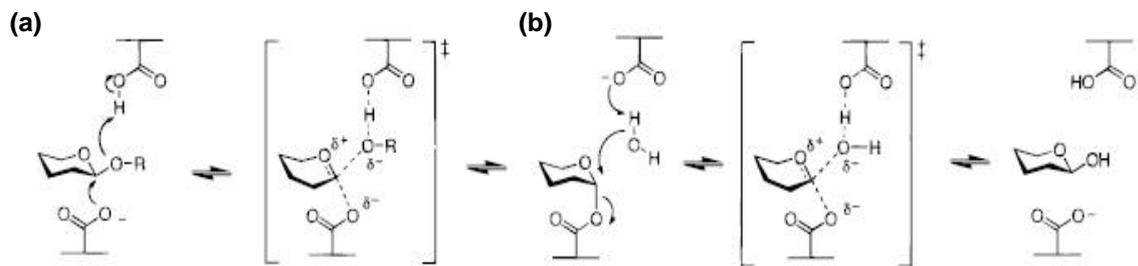
La hidrólisis del enlace se lleva a cabo mediante una catálisis general ácida en la que se requiere de la participación de dos residuos, uno que actúe como donador de un protón (ácido) y otro que actúe como nucleófilo/base (Davies y Henrissat., 1995).

De acuerdo a la forma en que las glicosidasas hidrolizan el enlace glicosídico de su sustrato, se clasifican en dos tipos: aquellas que hidrolizan al sustrato invirtiendo la configuración anomérica del producto ( $\beta$ -Amilasa, Endoglucanasa, Glucoamilasa) y aquellas que retienen la configuración de éste (Ej.  $\alpha$ -Amilasa,  $\beta$ -Galactosidasa, Invertasa, Lisozima).

La hidrólisis del enlace glicosídico efectuada por las glicosidasas que retienen la configuración anomérica del producto se efectúa mediante un mecanismo de doble desplazamiento en el que participan dos carboxilos catalíticos del sitio activo de la enzima, un ácido glutámico 261 que actúa como ácido/base y un aspártico 231 que funciona como nucleófilo (numeración de acuerdo a la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis*), los cuales se encuentran separados por una distancia de 5.5 Å.

En el primer paso de la reacción (glicosilación) (Fig. 1a, 2a), cuando un sustrato se une al sitio activo de la glicosidasa, el ácido glutámico en su forma ácida dona un protón al oxígeno que forma el enlace glicosídico del oligosacárido (molécula donadora) produciendo la liberación del sacárido protonado y dejando un intermediario oxocarbonio que es inmediatamente estabilizado por el ataque nucleofílico del aspártico 231 formándose un intermediario covalente acil-enzima.

Durante la siguiente etapa, deglicosilación (Fig 1b y 2b), una molécula de agua entrante (molécula aceptora) es desprotonada por el glutámico ahora en su forma básica. Esta molécula activada ataca el enlace covalente formado entre el oxígeno del nucleófilo y el C1 del residuo de glucosa formando un nuevo grupo hidroxilo, desplazando al azúcar del complejo. (Zechel D. L., Withers S. G., 2000).



**Fig. 1** Mecanismo de doble desplazamiento empleado por glicosidasas que retienen la configuración del carbono anomérico. En la etapa de glicosilación (a) se lleva a cabo la hidrólisis del enlace glicosídico del sacárido donador y la formación del complejo glicosil enzima; posteriormente (b) la molécula aceptora entrante es activada propiciando la liberación del azúcar.

*In vitro* estas glicosidasas también pueden actuar como transferasas al utilizar aceptores diferentes al agua durante la segunda etapa de la reacción (Ej. Oligosacáridos, alcoholes, moléculas activadas). De tal forma, si emplea como nucleófilo un oligosacárido, la enzima cataliza la formación de un nuevo azúcar mediante una reacción de **transglicosilación** (Davies *et al.*, 1997; McCarter and Withers, 1994); en el caso de que el nucleófilo sea un alcohol, la reacción de transglicosilación se denomina **alcohólisis**, generándose alquil glicósidos (Ismail *et al.*, 1999a; Vic *et al.*, 1996).

Durante la reacción de transglicosilación/alcohólisis, el intermediario glicosil enzima puede reaccionar con cualquiera de los sustratos disueltos en la mezcla de reacción, ya sea con agua (Fig. 2b), con un alcohol (Fig. 2d) o con el producto formado (Fig. 2c) y es esta competencia la que determina el rendimiento del sacárido o alquil glicósido producido.

Debido a que esta reacción es controlada cinéticamente, las propiedades de la enzima, así como las concentraciones o actividades de los nucleófilos (alcohol y agua) influenciarán sobre la cantidad de producto formado, es decir, si la selectividad de la enzima hacia un alcohol es buena, el equilibrio de la reacción puede desplazarse hacia la formación de alquil-glicósidos, dando un rendimiento mucho mayor al esperado. Otro factor que afecta el rendimiento de la reacción es la hidrólisis del producto ya formado por la misma enzima, si la hidrólisis secundaria es mayoritaria con respecto a las reacciones de alcohólisis, puede causar el decremento en la producción de alquil glicósido generado.

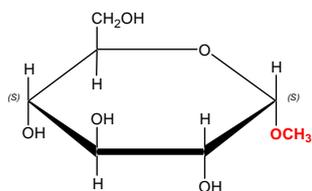
La capacidad de transferencia, ya sea mediante hidrólisis reversa o por reacciones de transglicosilación, observada en las glicosil hidrolasas que retienen la configuración del carbono anomérico las han hecho atractivas para propósitos de producción enzimática de alquil glicósidos, moléculas que representan una nueva generación de surfactantes no iónicos, cuyo uso se ha incrementado considerablemente en los últimos años debido a sus diversas propiedades.



**Figura 2.** Mecanismo catalítico llevado a cabo por glicosidasas que hidrolizan el enlace glicosídico reteniendo la configuración del carbono anomérico. En un primer paso de la reacción (a) se lleva a cabo la hidrólisis del enlace glicosídico del sacárido donador y la formación del complejo glicosil enzima; posteriormente (b) la molécula aceptora entrante (agua) es activada propiciando la liberación del azúcar. Si el nucleófilo entrante es diferente al agua, la enzima lleva a cabo una reacción de transferencia, denominada transglicosidación (c) si la molécula entrante es un oligosacárido, o alcohólisis (d) si el nucleófilo es un alcohol.

## ALQUIL GLICOSIDOS

Estas moléculas (Fig. 3) están constituidas por un carbohidrato, un monosacárido u oligosacárido, (extremo glicona) y por una molécula de alcohol (extremo aglicon), unidos a través de un enlace glucosídico. Su formación se produce al reemplazar el grupo hidroxilo del carbono anomérico del carbohidrato por el grupo  $-OR$  de la molécula hidrofóbica, uniéndose mediante un enlace glucosídico y liberándose una molécula de agua. Debido a que la molécula hidrofóbica puede unirse al carbohidrato por cualquiera de las dos "caras" del anillo se pueden formar las formas anoméricas  $\alpha$  ó  $\beta$  de la molécula. Se nombran a partir del carbohidrato y del alcohol del cual provienen, de esta manera la glucosa produce alquil glucósidos; la manosa, alquil manósidos y así sucesivamente, mientras que el prefijo "alquil" cambiará de acuerdo a la naturaleza del alcohol que se unió en el extremo aglicón, es decir, si el alcohol es metanol los compuestos anteriores se llamarán metil glucósido y metil manósido.



**Fig. 3** Los alquil glicósidos están formados por la unión de un sacárido (extremo glicon, negro) a un alcohol (extremo aglicon, rojo) mediante un enlace glucosídico; en este caso se representa la molécula de metil- $\alpha$ -D-glucósido, formado por la unión de una molécula de  $\alpha$ -D-glucosa a metanol.

La gran variedad de alcoholes que pueden unirse a los azúcares en el extremo aglicón hacen que los alquil glicósidos presenten propiedades físicas y químicas muy versátiles, ya que pueden actuar como detergentes, espumantes, humectantes, emulsificantes, fluidizantes, antimicrobianos, (Baltzer, 1991; Matsumura *et al*, 1990) como materia prima para la síntesis de ésteres azúcar de ácidos grasos (Mutua L. N., Akoh C. C., 1993) y mas aun, al ser sustancias estables en un amplio rango de pH, no tóxicas, no irritantes a la piel y biodegradables su aplicación puede abarcar diversas áreas de la industria farmacéutica, química, cosmética, de alimentos y detergentes (Ismail *et al*, 1999a; Laroute V., Willemont R., 1992).

Actualmente los alquil glicósidos son usados como iniciadores en la fabricación de espuma de poliuretano y en la síntesis de surfactantes (octil glucopiranósido y dodecil maltósido). Compuestos como metil glucósidos polietoxilados son humectantes muy efectivos que además tienen la capacidad de modificar la viscosidad del medio con niveles de irritación muy bajos para la piel, otros más, como el metil- $\alpha$ -D-glucopiranósido, son componentes de emulsificantes aplicados a productos de cuidado personal como cremas para la piel, lociones y cosméticos. De hecho los alquil glicósidos formados por alcoholes de cadena larga ( $C \geq 6$ ) poseen propiedades espumantes, mientras que aquellos producidos a partir de alcoholes de cadena corta, como butanol, son

empleados como fluidizantes, emulsificantes o substratos para síntesis de ésteres azúcar de ácidos grasos (Ismail *et al.*, 1999a).

## **PRODUCCION DE ALQUIL GLICOSIDOS MEDIANTE GLICOSIDASAS**

La síntesis enzimática de alquil glicósidos, a diferencia de su “clásica” síntesis química (Schmid R., Klötz V., 1990), controla la regioespecificidad y la esteroespecificidad de los productos sin la necesidad de utilizar grupos funcionales protectores, además no se generan anómeros  $\alpha$  y  $\beta$  en la muestra o productos secundarios que pudieran interferir en el proceso y debido a que las reacciones se llevan a cabo en condiciones de presión y temperatura moderadas se facilita su escalamiento a nivel industrial.

La ventaja al emplear glicosil hidrolasas para sintetizar estos compuestos radica en que a diferencia de las glicosil transferasas (EC 2.4) (enzimas que de forma natural catalizan la formación de enlaces glicosídicos), no requieren el uso de cofactores costosos como uridina difosfato (UDP) para llevar a cabo la reacción, además varias de ellas están disponibles de manera comercial y son relativamente económicas (Ljunger *et al.*, 1994; Panitrarux *et al.*, 1995; Vulfson *et al.*, 1990).

Gran parte de las investigaciones efectuadas para sintetizar enzimáticamente alquil-glicósidos se ha centrado en el uso de exoglicosidasas, tales como  $\beta$ -Glucosidasas (EC 3.2.1.21),  $\beta$ -Galactosidasas (EC 3.2.1.22),  $\beta$ -Xilosidasas (EC 3.2.1.37) e Invertasas (EC 3.2.1.26) (Tabla 1), con las cuales se ha logrado producir alquil  $\beta$ -glicósidos partiendo de monosacáridos como substratos donadores, entre ellos celobiosa, xilobiosa, lactosa y sacarosa, junto con alcoholes primarios, secundarios (Laroute V., Willemont R., 1992) y terciarios (Svasti *et al.*, 2003), aunque estos últimos en menor grado, ya sea mediante reacciones de hidrólisis reversa (Ismail *et al.*, 1999b; Laroute V., Vulfson *et al.*, 1990) o por alcoholólisis (Ismail *et al.*, 1999a).

La producción de alquil glicósidos empleando endoglicosidasas como celulasa (EC 3.2.1.4) o  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1) (Tabla 1, 2) también se ha reportado aunque en menor grado. La ventaja de emplear estas endoglicosidasas en reacciones de alcoholólisis radica en la posibilidad de utilizar como sustratos donadores, celulosa o almidón respectivamente, los cuales al ser oligosacáridos ampliamente distribuidos en la naturaleza disminuirían el problema de disponibilidad de sustrato presente en las reacciones de alcoholólisis efectuadas con exoglicosidasas.

**Tabla 1.** Algunas glicosidasas empleadas para la síntesis de alquil glicósidos.

Tipo de enzima	Fuente	Azúcar donador	Aceptor	Referencia
β-Galactosidasa	<i>Aspergillus oryzae</i>	Lactosa, β-D-glucosa, metil-1-β-glucosa	Etanol, Butanol, Hexanol, Octanol	Ismail <i>et al.</i> , 1999a ; Papanikolaou, 2001.
β-Galactosidasa	<i>Escherichia coli</i>	Lactosa, <i>p</i> -nitrofenil-β-galactosido	Hexanol	Hansson <i>et al.</i> , 2001; Stevenson <i>et al.</i> , 1993.
β-Galactosidasa	<i>C. saccharolyticum</i>	Lactosa	Etanol	Stevenson <i>et al.</i> , 1996.
β-Galactosidasa	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	<i>p</i> -nitrofenil-β-galactosido	Hexanol	Hansson <i>et al.</i> , 2001.
β-Glucosidasa	Almendra	Celobiosa, Glucosa, Pentil, y <i>p</i> -nitrofenil-β-glucósido, β-D-glucosa, metil-1-β-glucosa	Butanol, Hexanol, Octanol	Chahid <i>et al.</i> , 1992; Ismail <i>et al.</i> , 1999b; Papanicolaou, 2001; Vulfson <i>et al.</i> , 1990.
β-Glucosidasa	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Pentil, y <i>p</i> -nitrofenil-β-glucósido Celobiosa	Alcoholes primarios y terciarios, Hexanol	Fischer <i>et al.</i> , 1996; Hansson <i>et al.</i> , 2001.
β-Glucosidasa	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Glucosa	Alcoholes terciarios	Svasti <i>et al.</i> , 2003.
β-Glucosidasa	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	Pentil, y <i>p</i> -nitrofenil-β-glucósido	Hexanol	Hansson <i>et al.</i> , 2001.
β-Xilosidasa	<i>Aspergillus niger</i>	Xilobiosa, Xilosa	Etanol, Propanol	Shinoyama <i>et al.</i> , 1998.
β-Xilosidasa	<i>T. reesei</i>	Xil-β-OCH <sub>3</sub>	Etanol, <i>n</i> -Propanol	Drouet <i>et al.</i> , 1994.
Celulasa	<i>Aspergillus niger</i>	Manobiosa	Etanol	Holazo <i>et al.</i> , 1992.
Invertasa	Levadura	Sacarosa, Frutosa		Rodríguez <i>et al.</i> , 1996; Rodríguez <i>et al.</i> , 1997; Selisko <i>et al.</i> , 1990.

## α-AMILASAS

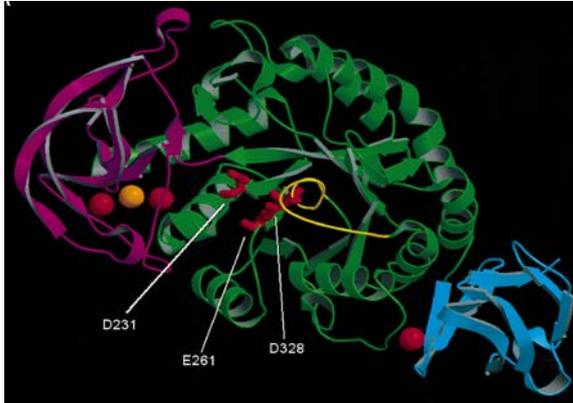
### Características

Las α-amilasas (1,4-α-D-glucanhidrolasas) son endoglicosidasas distribuidas en una gran variedad de organismos tanto en archaeas, bacterias y eucariotas (Pandey *et al.*, 2000).

A nivel estructural, podemos identificar en estas enzimas tres dominios (Fig. 4), el primero de ellos, el **dominio A** es el dominio central y es el que presenta la actividad catalítica; su estructura es de barril (α/β)<sub>8</sub> o TIM conformada por ocho láminas β paralelas rodeadas por ocho α-hélices (Fig. 6); en este dominio se encuentran los tres residuos conservados del sitio activo, Asp 231, Glu 261 y Asp 328 (numeración de acuerdo a la α-amilasa de *Bacillus licheniformis*) así como algunos aminoácidos esenciales para la estabilidad del barril (Janecek, 1997).

El **dominio B** se forma por una extensión de la tercera lámina β y la tercera α-hélice del barril, su tamaño y forma varía entre las α-amilasas. Este dominio forma parte de la hendidura donde se une el sustrato y se piensa es responsable de las diferencias en el patrón de productos generados por las diversas α-amilasas; la mayoría de las α-amilasas contienen iones de calcio en la interfase de los dominios A y B, los cuales no participan en la catálisis pero son esenciales para la estabilidad de la enzima. Por último, el **dominio C** es un dominio que posee un motivo con forma de llave

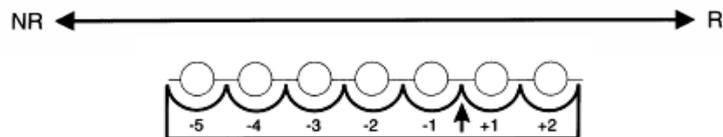
griega y constituye la parte carboxilo terminal de la proteína y se le adjudica como función, la unión del sustrato.



**Figura 4.** Organización de dominios de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* (código PDB 1Bli). Dentro del dominio A (verde) se localizan los tres residuos catalíticos, D231, E261 y D328, el loop que conecta  $\beta 7$  y  $\alpha 7$  se muestra en amarillo. En la interfase del dominio A y dominio B (rojo) se localizan iones de sodio (esfera amarilla) y calcio (esferas rojas), éste último también localizado en el dominio C (azul).

Nielsen J., Borchert T., 2000

El sitio activo de la enzima se localiza entre el dominio A y el dominio B (Svenson, 1994), dentro de éste se encuentra el sitio de unión al sustrato el cual, dependiendo del origen de la  $\alpha$ -amilasa, puede aceptar entre 4 y 10 unidades de glucosa, cada una de ellas sujeta por ciertos residuos, generalmente residuos aromáticos, que forman el subsitio de unión para esa unidad de sacárido. En  $\alpha$ -amilasa hay dos o tres subsitios presentes hacia el extremo reductor que se designan a partir del sitio de corte (+1, +2, +3) mientras que el número de subsitios en el extremo no reductor varía entre dos y siete y se designan como subsitios -1, -2, -3, etc. (Fig. 5) (Brzozowski *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 1997., Mac Gregor, 1988).



Davies *et al.*, 1997

**Figura 5.** Representación esquemática de los subsitios de unión a azúcares en glicosil hidrolasas. Cada unidad de glucosa (círculos) del sacárido se une a un subsitio, siendo sitio de corte el enlace localizado entre los subsitios -1 y +1 (flecha). Cada subsitio se designa como  $-n$  a  $+n$ , siendo  $-n$  el extremo no reductor (NR) y  $+n$  la terminal reductora (R).

A nivel de secuencia proteica, las  $\alpha$ -amilasas se caracterizan por tener cuatro regiones (Fig. 6), todas localizadas en el barril TIM, con residuos altamente conservados:

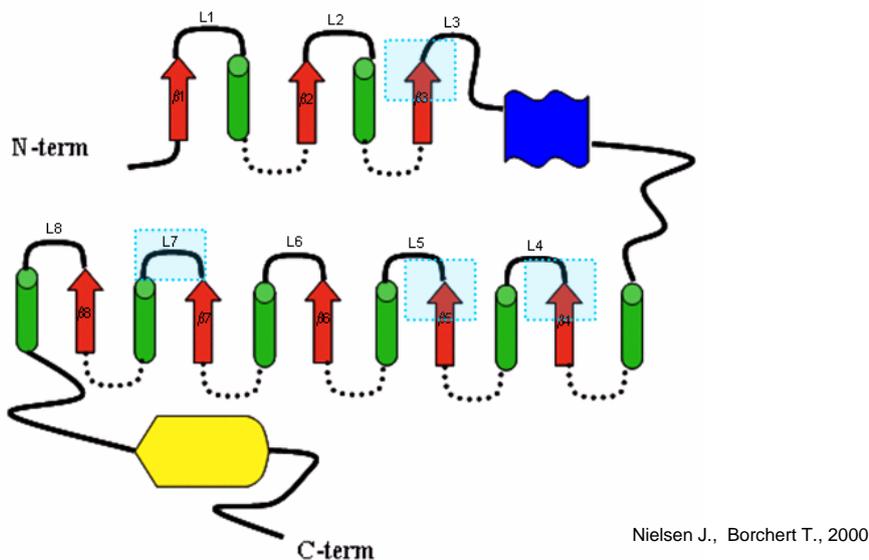
**Región I.-** Los tres residuos conservados de esta región, Asp 100, Asn 104, His 105, se encuentran localizados en el extremo carboxilo terminal de la tercera lámina  $\beta$  del barril. El residuo Asp 100 es importante para la integridad del sitio activo, en cambio la Asn 104 no participa

directamente en la estabilización del sitio activo, pero coordina el ion de calcio localizado entre los dominios A y B. La His 105 es un residuo que estabiliza la interacción del carboxilo terminal de la tercera lámina  $\beta$  y el resto del barril.

**Región II.-** Se localiza en la cuarta lámina  $\beta$  y contiene el nucleófilo catalítico Asp 231 así como el residuo Arg 229, residuos que se consideran indispensables para la actividad catalítica. Además se encuentran los residuos Lys 234 e His 235 que forman parte del subsitio +2 y se piensa que participan en unir el extremo reductor de la cadena de glucosa en el sitio activo.

**Región III.-** En esta región se encuentra otro residuo catalítico, el Glu 261 localizado en la región carboxilo terminal de la quinta lámina  $\beta$  del barril TIM.

**Región IV.-** Esta región se localiza en el asa que conecta a la séptima lámina  $\beta$  con la séptima  $\alpha$ -hélice y contienen un único residuo conservado, el Asp 328, el cual se piensa esta involucrado en la estabilización del intermediario carbocatión.



**Figura 6.** Diagrama topológico del dominio A de  $\alpha$ -amilasa.

El dominio A se forma por un barril  $(\alpha/\beta)_8$  o TIM conformado por ocho láminas  $\beta$  paralelas (rojo) rodeadas por ocho  $\alpha$ -hélices (verde) unidas por loops, los residuos catalíticos se localizan en los extremos carboxilo de las láminas  $\beta$  4 y 5, las cuales forman parte de las cuatro regiones conservadas del barril (recuadros punteados). El dominio B (azul) se forma por una extensión entre la tercer lámina  $\beta$  y la tercer  $\alpha$ -hélice; mientras que el dominio C (amarillo) se localiza en la parte terminal de la enzima.

Con base clasificación propuesta para las glicosil hidrolasas (basada en las similitudes de secuencias de aminoácidos) (Henrissat B., 1991), las  $\alpha$ -amilasas junto con enzimas que catalizan reacciones muy similares (Tabla 2) se ubican dentro de la familia 13 también llamada familia  $\alpha$ -amilasa. Las diversas enzimas agrupadas dentro de esta familia además de poseer las cuatro

regiones conservadas en estructura primaria, pueden hidrolizar enlaces glicosídicos para producir mono u oligosacáridos con la configuración  $\alpha$ , forman enlaces glicosídicos  $\alpha$ 1-4 o 1-6 (transglicosidación) o una combinación de ambas actividades, además todas poseen una estructura en forma de barril (b/a)<sub>8</sub> que contiene los residuos catalíticos.

**Tabla 2.** Enzimas pertenecientes a la familia 13 de acuerdo a la clasificación establecida para glicosil hidrolasas\*

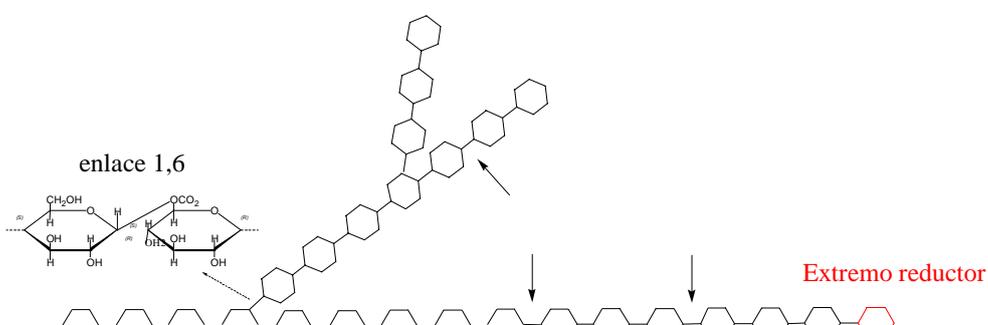
Enzima	Número EC	Dominios	Sustrato principal	Entradas a ENZYME Data Bank al 5 Sep 06 **
Amilosacarasa	2.4.1.4		Sacarosa	10
Sacarosa fosforilasa	2.4.1.7		Sacarosa	1
Glucan branching enzyme	2.4.1.18	A, B, F	Almidón, Glicógeno	2
Ciclodextrin glicosiltransferasa	2.4.1.19	A, B, C, D, E	Almidón	48
Amilomaltasa	2.4.1.25	A, B1, B2	Almidón, Glicógeno	11
$\alpha$ -amilasa maltopentaosa-forming	3.2.1.-	A, B, I	Almidón	24
$\alpha$ -amilasas	3.2.1.1	A, B, C	Almidón	93
Oligo $\alpha$ 1-6 glucosidasa	3.2.1.10	A, B	Amilopectina	1
$\alpha$ -glucosidasa	3.2.1.20		Almidón	3
Amilo pululanasa	3.2.1.41	A, B, H, G, I	Pululano	6
Ciclomaltodextrinasa	3.2.1.54	A, B	Ciclodextrinas	2
Isopululanasa	3.2.1.57		Pululano	6
$\alpha$ -amilasa maltotetraose-forming	3.2.1.60	A, B, C, E	Almidón	10
Isoamilasa	3.2.1.68	A, B, F, 7	Amilopectina	1
Glucodextrinasa	3.2.1.70		Almidón	-
trehalosa-6-fosfato hidrolasa	3.2.1.93		Trehalosa	-
$\alpha$ -amilasa maltohexaose-forming	3.2.1.98		Almidón	4
Amilasa maltogénica	3.2.1.133	A, B, C, D, E	Almidón	2
Neopululanasa	3.2.1.135	A, B, G	Pululano	29
Malto-ologosil trehalose sintasa	5.4.99.16		Maltosa	-

\* Información tomada de la base de datos Carbohydrate Active Enzymes (CAZY) (Coutinho P. M., Henrissat B., 1999)

\*\* <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/>

### Reacciones de alcoholisis en $\alpha$ amilasas

Las  $\alpha$ -amilasas son enzimas que hidrolizan los enlaces glicosídicos  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4 de polímeros de almidón (amilasa y amilopectina) reteniendo la configuración del carbono anomérico en los productos (Fig. 7). De acuerdo al grado en que hidrolizan el almidón se pueden clasificar como amilasas sacarificantes o licuefactantes; las primeras se caracterizan por hidrolizar el sustrato en un 50-60%, mientras que las enzimas licuefactantes hidrolizan el almidón en un 30-40%. Aunque ambos tipos de  $\alpha$ -amilasas se han encontrado en bacterias, las  $\alpha$ -amilasas fungales son principalmente sacarificantes (Vihinen *et al.*, 1989).



Son pocos los estudios efectuados para caracterizar la actividad alcoholítica de  $\alpha$ -amilasas sacarificantes y licuefactantes en presencia de almidón como sustrato, sin embargo se ha observado que en  $\alpha$ -amilasas licuefactantes bacterianas de *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus licheniformis* no existe actividad alcoholítica en presencia de almidón y alcoholes de bajo peso molecular (Santamaría *et al.*, 1999) a pesar de que la última posee actividad transglicosídica. Por el contrario, las  $\alpha$ -amilasas fungales son enzimas que han sido empleadas con éxito en reacciones de transferencia y alcoholisis, empleando como sustratos fenil y *p*-nitrofenil- $\alpha$ -maltosido (*Aspergillus oryzae*) o almidón y sus derivados (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*), junto con alcoholes como metanol, etanol y butanol (Matsubara, S., 1961; Santamaría *et al.*, 1999).

Dentro de las enzimas fungales, las reacciones de alcoholisis catalizadas por  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae* han sido las más caracterizadas (Larsson *et al.*, 2005; Park *et al.*, 1999; Santamaría *et al.*, 1999), observándose que en un medio que contenga alcoholes de diferente peso molecular y almidón (Tabla 3), esta enzima genera una gran variedad de alquil glicósidos que van desde alquil maltósido hasta alquil maltopentaosido, además de diversos sacáridos cuando la molécula aceptora es metanol. Por otra parte en reacciones de alcoholisis efectuadas con *A. niger* ensayadas en presencia de metanol (Santamaría *et al.*, 1999) también se observa la formación de varios sacáridos, así como diversos metil glicósidos que van desde metil glucósido hasta metil maltopentaosido.

Aunque la cuantificación de alquil glicósidos generados por ambas enzimas se dificulta debido a la carencia de estándares, la cuantificación del metil glucósido generado después de tratar las muestras con glucoamilasa, indica que las reacciones de alcoholisis efectuadas por la  $\alpha$ -amilasa

de *A. niger* son mas eficientes que las reacciones efectuadas por la amilasa de *A. oryzae*, ya que la cantidad de metil glucósido cuantificado para la primera es de 2.32 mg/ml contra 0.76 mg/ml presentado por *A. oryzae*.

**Tabla 3.** Productos generados por las  $\alpha$ -amilasas fungales *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* durante la síntesis de alquil glicósidos empleando almidón soluble como sustrato.

Fuente	Donador	Aceptor	Productos	Referencia
<i>Aspergillus oryzae</i>	Almidón soluble	Metanol 15%-40% v/v	Glucosa (poca), Maltosa, Maltotriosa, Maltotetraosa	Larsson <i>et al.</i> , 2005; Santamaría <i>et al.</i> , 1999.
			Metil maltosido	
			Metil maltotriosido	Larsson <i>et al.</i> , 2005.
		Etanol 20%-30% v/v	Etil maltosido	
		N-propanol 20%-30% v/v	Etil maltotetraosido	
		N-butanol 5%-15% v/v	No producto	
N-hexanol 50 g/l				
N-octanol 50 g/l				
Alcohol benzilico 50 g/l		Benzil maltosido Benzil maltotriosido Benzil maltopentaosido		
<i>Aspergillus niger</i>	Almidón soluble	Metanol 20%-40% v/v	Glucosa (poca) Maltosa, Maltotriosa, Maltotetraosa, Maltopentaosa, Maltohexaosa	Santamaría <i>et al.</i> , 1999.
			Metil glucósido	
			Metil maltosido	
			Metil maltotetraosido	
			Metil maltopentaosido	

Estos resultados indican que son las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes fungales las enzimas capaces de producir alquil glicósidos partiendo de almidón como sustrato. Sin embargo, la realización de estas reacciones a nivel industrial conllevaría un procesamiento inicial del almidón con  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus licheniformis*, las cuales participan en la etapa conocida como licuefacción, en donde el almidón gelatinizado es hidrolizado de manera parcial a altas temperaturas (95-100 °C) en varios oligosacáridos con diferente grado de polimerización (van der Maarel, *et al.*, 2002). Y aunque la  $\alpha$ -amilasa termoresistente de *Bacillus licheniformis* ya posee actividad transglicosídica, su incapacidad de llevar a cabo reacciones de alcoholisis impide su uso para la producción de alquil glicósidos empleando almidón como sustrato, mientras que las enzimas fungales que si pueden llevar a cabo reacciones de alcoholisis no pueden participar durante la licuefacción del almidón debido a las elevadas temperaturas que exige el proceso y aunque su participación durante la etapa de sacarificación es viable, la poca tolerancia de estas enzimas a solventes orgánicos se vuelve un impedimento. Por lo que resulta interesante investigar la capacidad alcoholítica de mas amilasas termo- resistentes, las cuales además de ser estables a elevadas temperaturas, también se espera que presenten resistencia a agentes desnaturalizantes, a solventes y a proteólisis enzimática (Bragger *et al.*, 1989).

A pesar de que se han descubierto varias enzimas amilolíticas de organismos hipertermófilos tanto en bacterias como archaeas, estas no han sido exploradas. No es sino recientemente que en el

laboratorio del Dr. López-Munguía se ha empezado a estudiar el uso de la  $\alpha$ -amilasa AmyA de la bacteria hipertermofila de *Thermotoga maritima* para llevar a cabo reacciones de alcoholisis (Moreno *et al.*, comunicación personal). Aunque la reacción de alcoholisis efectuada por esta enzima supera a lo visto para amilasas bacilares y fungales, su capacidad de hidrolizar almidón a elevadas temperaturas así como su aparente estabilidad a solventes orgánicos hacen factible el pensar en optimizar su actividad alcoholítica mediante ingeniería de proteínas.

## ANTECEDENTES

### **$\alpha$ -AMILASAS DE *Thermotoga maritima* MSB8**

*Thermotoga maritima* MSB8 (DSM 3109) es una de las pocas bacterias hipertermófilas hasta ahora estudiadas. Su genoma se encuentra en un cromosoma circular que contiene 1,877 regiones codificantes, de las cuales el 46% aun no tienen función asignada.

Esta bacteria gram negativa aislada originalmente en sedimentos marinos geotérmicos en Vulcano, Italia, es capaz de metabolizar varios carbohidratos simples y complejos como glucosa, sacarosa, almidón, celulosa y xilano; y debido a que es raro encontrar almidón en estos sitios, la presencia de enzimas amilolíticas en este microorganismo es sorprendente. Dentro de las enzimas amilolíticas encontradas en esta bacteria solamente tres se han identificado como  $\alpha$ -amilasas: **AmyB**, es una  $\alpha$ -amilasa intracelular con una actividad óptima de 70°C y con un peso molecular estimado de 50,000 Da; aunque su secuencia de 422 aminoácidos solo presenta un 12% de identidad con otras amilasas, estos residuos se incluyen dentro de las cuatro regiones conservadas características de las  $\alpha$ -amilasas (Lim *et al.*, 2003). La segunda enzima encontrada, **AmyC** (Ballschmiter *et al.*, 2006), también es intracelular y presenta una actividad hidrolítica máxima a una temperatura de 90°C; esta enzima no tiene similitud ni en secuencia ni en estructura con las  $\alpha$ -amilasas típicas aunque el patrón de hidrólisis del sustrato y el perfil de productos generado claramente la colocan como  $\alpha$ -amilasa. Hasta ahora esta enzima es la única  $\alpha$ -amilasa de *Thermotoga maritima* MSB8 con una estructura cristalizada resuelta, la cual difiere de la clásica estructura de  $\alpha$ -amilasas (Dickmanns *et al.*, 2006).

La tercer enzima es **AmyA**, la cual es la única  $\alpha$ -amilasa extracelular encontrada hasta ahora (Schumann *et al.*, 1991) y la única caracterizada en presencia de diversos sustratos (Lieb *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, inv. en proceso). Esta enzima tiene un peso molecular de 62.6 KDa, y aunque el porcentaje de similitud que guarda su secuencia proteica con amilasas de otros organismos es tan solo de 30% (Tabla 4) se identifican las cuatro regiones altamente conservadas en  $\alpha$ -amilasas, dentro de las cuales se encuentran los residuos catalíticos y residuos posiblemente involucrados en la coordinación de calcio (Asn 127, Asp 188, His 222) (Fig. 8). Al igual que otras amilasas, AmyA también es una enzima dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  el cual es un cofactor esencial para su actividad y su estructura terciaria, aunque cantidades excesivas de este producen la inhibición de la actividad enzimática, efecto que también se ha reportado para las  $\alpha$ -amilasas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* (Lieb *et al.*, 1997).

**Tabla 4.** Porcentaje de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos de diversas  $\alpha$ -amilasas comparadas contra AmyA de *T. maritima*.

$\alpha$ -amilasa	Organismo	Identidad (%)
AmyC	<i>Dictyoglomus thermophilum</i>	38
BMA	<i>Bacillus megaterium</i>	35
AmyB	<i>Thermotoga maritima</i>	14
AmyC	<i>Thermotoga maritima</i>	10

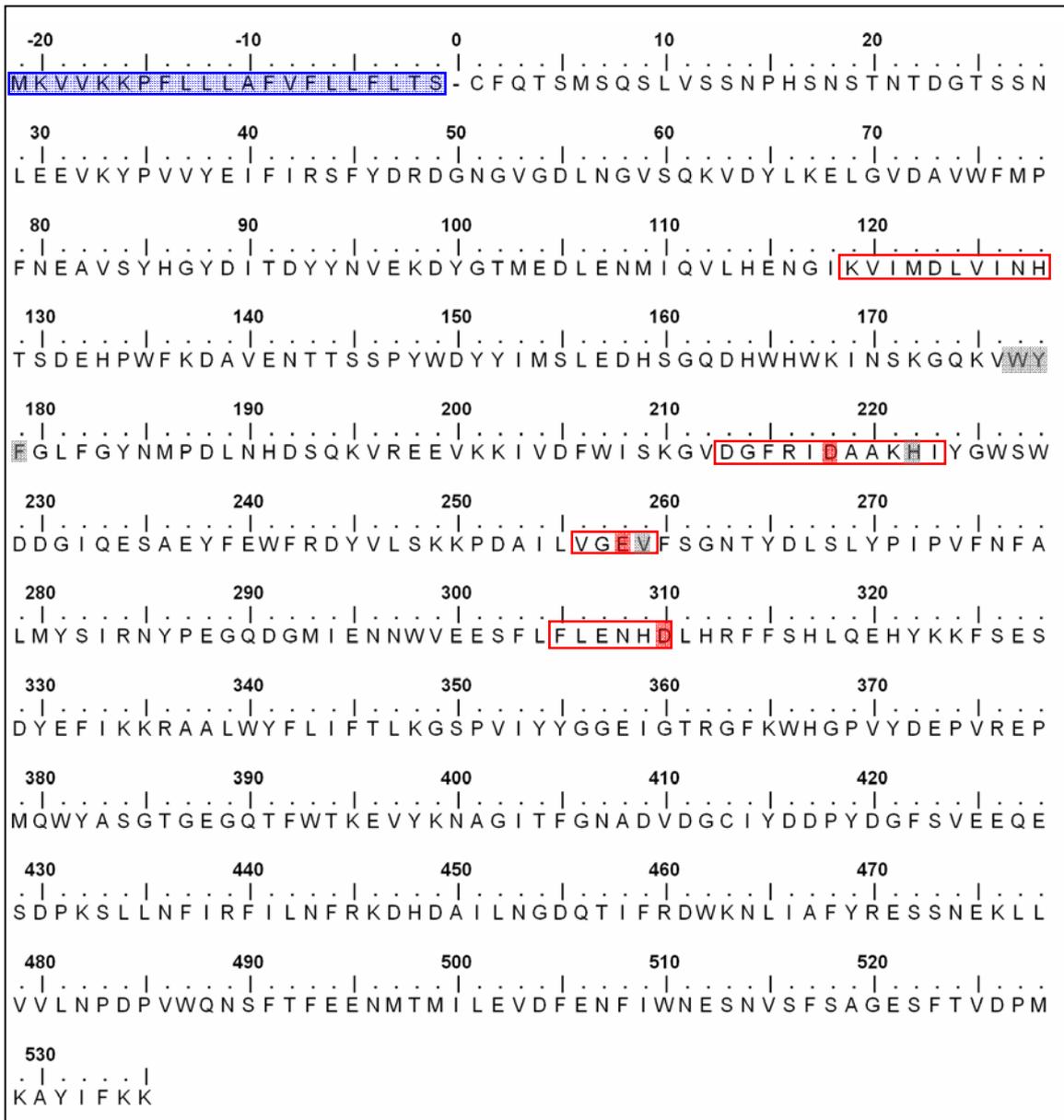
La AmyA es capaz de hidrolizar varios  $\alpha$ -glicanos como almidón, amilosa, amilopectina, glicógeno y pululano, aunque su afinidad por sustratos de cadena ramificada es menor que la observada para sustratos de cadena lineal como amilosa o almidón. Bajo condiciones óptimas (80°C, buffer 50 mM bis-tris (pH7), y 150 mM NaCl) esta amilasa sacarificante presenta una actividad específica de 3,800 U/mg cuando su sustrato es almidón soluble, lo que la convierte en una de las amilasas más eficientes (Lieb *et al* 1997).

## REACCION DE ALCOHOLISIS CATALIZADA POR AmyA

Una caracterización detallada de las reacciones de hidrólisis, transglicosidación y alcoholisis realizadas por la  $\alpha$ -amilasa AmyA de *T. maritima* MSB8 (DSM 3109) se ha estado realizando en el laboratorio del Dr. Agustín López Murguía, observándose la capacidad de esta enzima para emplear oligosacáridos de bajo peso molecular (G2-G7) como sustrato para efectuar reacciones de hidrólisis y transglicosidación. Aparentemente en tiempos cortos de reacción, la enzima emplea los oligosacáridos de bajo peso molecular para llevar a cabo reacciones de transferencia formando productos de mayor peso, los cuales son empleados en reacciones de hidrólisis generando como productos mayoritarios glucosa y maltosa cuando se ha alcanzado el equilibrio.

Cuando se emplea almidón al 6% como sustrato, la enzima genera maltosa (en mayor medida), glucosa y maltotriosa como productos mayoritarios además de otros oligosacáridos de bajo peso (G4-G8) en menor cantidad. Al adicionar concentraciones de metanol que van de 20 a 40%, se observa la formación de metil glucósido resultado de la transferencia de los productos hidrolizados por la enzima al alcohol.

La caracterización de las reacciones de alcoholisis llevadas a cabo por AmyA de *T. maritima*, arrojan resultados muy prometedores si se piensa en la síntesis de alquil glicósidos partiendo de almidón como sustrato ya que la enzima es capaz de producir una cantidad de metil glucósido superior a la encontrada para *A. niger* que es de 2.32 mg/ml.



**Figura 8.** Secuencia de aminoácidos de AmyA de *Thermotoga maritima*. El péptido señal constituye los primeros 21 aminoácidos de la secuencia (azul), los residuos catalíticos (rojo) se encuentran dentro de las cuatro regiones conservadas características de todas las  $\alpha$ -amilasas (recuadros rojos). Los residuos a mutagenizar en este trabajo (W198V, Y199V, F200V, H243DEQ, V280W) se resaltan en color gris.

## AUMENTO DE LA ACTIVIDAD ALCOHOLITICA DE AmyA DE *T. maritima* MEDIANTE MUTAGENESIS SITIO DIRIGIDA

Debido a que la estructura del sitio activo tiene gran influencia sobre las propiedades catalíticas de una enzima, la modificación de residuos cercanos al sitio de hidrólisis del sustrato empleando técnicas de ingeniería de proteínas, podrían hacer más eficientes las reacciones de

transglicosilación/alcoholólisis observadas en AmyA; puesto que, un cambio ya sea en tamaño, hidrofobicidad o polaridad de estos residuos podría favorecer un incremento en la concentración efectiva de nucleófilos menos polares (como grupos glicosilo o alcoholes) dentro del sitio activo o modificar la afinidad de residuos localizados en el sitio de unión del aceptor hacia estos aceptores.

La carencia de un método que nos permita identificar directamente las enzimas con una actividad transglicosídica/alcoholítica incrementada después de someterlas a un proceso de mutagénesis a saturación, nos obliga a explorar de manera puntual algunas posiciones dentro del sitio activo de la  $\alpha$ -amilasa AmyA de *T. maritima*. Para seleccionar las posiciones a mutagenizar se tomaron en consideración los siguientes puntos:

a) Modificación de residuos aromáticos cercanos al sitio de unión de la molécula aceptor

La importancia que poseen los residuos aromáticos en determinar la relación transferencia/hidrólisis se ha observado varias veces en transferasas y glicosil hidrolasas (Kuriki *et al.*, 1996., Nakamura *et al.* 1994., Matsui *et al.*, 1994., Rivera *et al.*, 2003., Saab *et al.* 1999); por ejemplo, en transferasas como CGTasas, residuos aromáticos como Tyr juegan un papel importante en la unión del sustrato, mientras que residuos Phe están involucrados en la unión de la molécula aceptor y posiblemente estabilicen el estado de transición (Nakamura *et al.* 1994).

Por lo anterior, pensar en modificar residuos aromáticos constituyentes de los subsitos de unión del nucleófilo, podrían cambiar la afinidad de la enzima hacia sustratos menos polares.

b) Evidencia experimental de alteración en la relación hidrólisis/transglicosidación en  $\alpha$ -amilasas por mutagénesis de determinados residuos.

Durante la investigación que Vihinen *et al* 1990, realizaban para identificar el efecto causado por mutagenizar los tres residuos más conservados del sitio activo de la  $\alpha$ -amilasa licuefactante de *Bacillus stearothermophilus* (Arg 232, His 238, Asp 331) por aminoácidos lineales, Lys, Asp, Glu, respectivamente, observaron que al emplear almidón como sustrato, la mutante His238-Asp genera un patrón de productos diferente al observado por la enzima silvestre (Tabla 5). Mientras que la enzima silvestre genera de forma mayoritaria productos como G2, G3, G5, en la mutante His238-Asp el cambio en el patrón de productos liberados genera principalmente G1 y G2. El cambio en el patrón de productos hace notar que el residuo H238 altera de alguna manera la relación transglicosilación/hidrólisis observada en la enzima silvestre haciéndola más sacarificante, por lo que si mutagenizamos el residuo His 222 (equivalente a His 238 en *B. stearothermophilus*) en la  $\alpha$ -amilasa AmyA de *T. maritima* por residuos lineales Glu, Gln, Asp la actividad transglicosídica/alcoholítica de la enzima podría aumentar.

**Tabla 5.** Patrón de productos generado por degradación de almidón por la enzima  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus*, así como de las mutantes en residuos catalíticos (Vihinen *et al.*, 1990).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Arg 232 → Lys	1.9	14.5	19	6.8	31.1	18.6
His 238 → Asp	22.4	21.5	10.5	5.9	24.3	
Asp 331 → Glu		46.5	53.2			
WT	5.7	21.9	26.7	10.3	21.9	

c) Residuos aromáticos característicos de enzimas con actividad transglicosídica.

Aparentemente la preferencia hacia residuos aromáticos, como Phe y Tyr, en determinadas regiones de la secuencia de enzimas con capacidad transglicosídica como CGTasas y  $\alpha$ -amilasas sacarificantes (Fig. 9), tiene una implicación directa la actividad de la enzima. (Kuriki *et al.*, 1996, Saab *et al.*, 1999), como muestra la introducción de actividad transglicosídica y alcoholítica en la  $\alpha$ -amilasa licuefactante de *B. stearothermophilus* debido al cambio del residuo Ala 289 por los aromáticos Phe y Tyr (Saab *et al.*, 1999). Este estudio muestra que no sólo la hidrofobicidad y los efectos electrostáticos de estos residuos aromáticos influyen sobre la actividad transglicosídica de la enzima, sino que también existe una interacción de los residuos de esta posición con el residuo Trp266, el cual interacciona directamente con el glutámico catalítico.

Por el contrario, en la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, la modificación del residuo Val286 (posición equivalente a Ala 289 de *B. stearothermophilus*) hacia aromáticos Phe y Tyr, produce un incremento en la eficiencia catalítica cuando la mutación se hace hacia Tyr así como un decremento cuando la mutación se hace hacia Phe. Al igual que para *B. stearothermophilus* estos residuos aromáticos interactúan con un Trp263 (residuo que en la mayor parte de las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes esta ausente) localizado en la vecindad de uno de los residuos catalíticos (Rivera *et al.*, 2003).

En la  $\alpha$ -amilasa AmyA de *T. maritima*, al igual que en las amilasas sacarificantes (Fig. 9), también existe un residuo aromático (Phe277) en la posición equivalente a Tyr 252 de *A. oryzae*, firma que podría indicar el carácter transglicosídico de la enzima. Sin embargo, al igual que en enzimas sacarificantes, AmyA posee un residuo aromático (Phe260) en una posición ocupada por residuos Asp, Ile, Leu en enzimas licuefactantes.

Varias secuencias de CGTasas, enzimas totalmente transglicosídicas, también presentan un patrón igual al observado por los residuos Phe de AmyA, además se aprecia una disposición característica de los dos residuos aromáticos que preceden al glutámico catalítico, siendo el primero triptofano y el segundo fenilalanina o tirosina, sin embargo, la disposición de estos residuos difiere para AmyA, en donde el segundo residuo es Val.

Si esta disposición conservada de residuos aromáticos en CGTasas esta implicada en la actividad transglicosídica de la enzima, la mutación del residuo Val259 presente en la secuencia de AmyA de *T. maritima* hacia un residuo aromático como W podría favorecer un aumento en la actividad transglicosídica/alcohólica de la enzima.

Código PDB	Organismo	Región I	Región II	Región III	Región IV			
AmyA	<i>Thema</i>	KVIMDLVINHT 129	VWYGLFG- 183	DGFRIDAAKHI 223	VGEVFSGN 263	FNFALM 280	FLENHDL 311	
2TAA	<i>A. oryzae</i>	YLMVDVVANHM 123	DCWLGDNTV 171	DGLRIDTVKHV 211	IGEVLDGD 235	LNYPYIY 255	FVENHDT 298	
2AAA	<i>A. niger</i>	YLMVDVVPDHM 123	DCWEGDTIV 171	DGLRIDSVLEV 211	VGEIDNG 235	LNYPYIY 255	FIENHDT 298	
1JXK	<i>H. sapiens sal</i>	RIYVDAVINHM 102	QVRDCRLSG 164	AGFRIDASKHM 202	YQEVIDLG 238	TEFKYG 259	FVDNHDN 301	Sacarificantes
1HNY	<i>H. sapiens pan</i>	RIYVDAVINHM 102	QVRDCRLTG 164	AGFRIDASKHM 202	YQEVIDLG 238	TEFKYG 259	FVDNHDN 301	
1HX0	Cerdo panc	RIYVDAVINHM 102	QVRDCQLVG 164	AGFRIDASKHM 202	FQEVIDLG 238	TEFKYG 259	FVDNHDN 301	
1JAE	<i>Tenebrio</i>	RIYVDAVINHM 100	NVRNCELVG 152	AGFRVDAAKHM 190	YQEVIDLG 227	LEFQFG 248	FVDNHDN 288	
1G94	<i>Alteromonas</i>	DIYVDTLINHM 90	RVQNCVLG 141	KGFRFDASKHV 179	FQEVIDQG 205	TEFKYS 226	FVDNHDN 265	
1AMY	Cebada	KAIADIVINHR 93	NPDTGADFG 144	DGWRFDFAKGY 184	VAFIWTSL 209	FDFTTK 249	FVDNHDT 286	
1VJS	<i>B. lichen</i>	NVYGDVVINH 106	YHFDGTDWD 164	DGFRIDAVKHI 236	VAFYQND 266	FDVPLH 289	FVDNHDT 329	Licuefactan.
1E43	<i>B. amylo</i>	QVYGDVVLN 104	YHFDGADWD 162	DGFRIDAAKHI 236	VAFYQNN 266	FDVPLH 289	FVDNHDT 329	
1HVX	<i>B. stearo</i>	QVYADVVDHK 107	YHFDGVDWD 165	DGFRIDAVKHI 239	VGEYWSYD 269	FDAPLH 292	FVDNHDT 332	
1BAG	<i>B. subtil</i>	KVIVDAVINHT 103	DVTQNSLLG 143	DGFRIDAAKHI 180	YGEILQDS 213	TASNYG 232	WVESHDT 270	
1CDG	<i>B. circ1</i>	KVIIDFAPNHT 141	NGIYKNLYD 196	DGIRMDAVKHM 234	FGEWFLGV 262	LDERFA 286	FIDNHDM 329	CGTasa
1CGT	<i>B. circ2</i>	KVIIDFAPNHT 141	NGIYKNLYD 196	DGIRMDAVKHM 234	FGEWFLGS 262	LDERFN 286	FIDNHDM 329	
1D7F	<i>B. specie</i>	KVIIDFAPNHT 141	NGIYKNLYD 196	DGIRMDAVKHM 234	FGEWFLGV 262	LDERFA 286	FIDNHDM 329	
1CYG	<i>B. stearot</i>	KVIIDFAPNHT 137	DGIYRNLF 192	DGIRMDAVKHM 230	FGEWFLSE 257	LDERFG 281	FIDNHDM 325	
1A47	<i>T. sulfu</i>	KVIIDFAPNHT 142	DGIYRNLF 197	DGIRMDAVKHM 235	FGEWFLGT 263	LDERFS 283	FIDNHDM 330	
1QHO	<i>Novamyl</i>	KVIVDFVPNHS 133	EAQWKNFTD 190	DGLRIDAVKHF 233	VGEWYGDD 261	LDFDLN 287	FIDNHDM 330	
1SMA	<i>Thermus sp</i>	RVMLDAVFNHC 248	PNYDTFAF- 291	DGWRLDVANEI 233	LGEIWHDA 362	MNYPLA 380	LLGSHDT 422	Maltog.

**Figura 9** Alineamiento múltiple de las cuatro regiones características de las glicosil hidrolasas pertenecientes a la familia 13.

Las secuencias alineadas corresponden a algunos miembros de esta familia,  $\alpha$ -amilasas (tanto sacarificantes como licuefactantes) CGTasas y amilasas maltogénicas todas ellas con estructura conocida, exceptuando la AmyA de *T. maritima* cuya estructura aún no se determina. Dentro del alineamiento se resaltan (negro) los tres residuos catalíticos localizados en las regiones II, III y IV, así como los residuos mutagenizados en este trabajo (enmarcados en rojo), tres de los cuales, W177, Y178 y F179 se localizan en una región poco conservada de la secuencia. Además se identifican (enmarcados en azul) los residuos aromáticos conservados en enzimas transglicosídicas aparentemente implicados en determinar la actividad transferasa dentro de  $\alpha$ -amilasas (Saab et al., 1999).

En recuadros grises se localizan residuos aromáticos conservados en CGTasas cercanos al un residuo catalítico, cuya función también podría estar relacionada con la actividad transferasa de esta enzima.

## OBJETIVO GENERAL

Generar mutantes de la  $\alpha$ -amilasa AmyA de *Thermotoga maritima* con una actividad alcohólica incrementada empleando mutagénesis sitio dirigida en residuos cercanos al sitio del aceptor.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar un modelo estructural de la enzima  $\alpha$ -amilasa AmyA de *Thermotoga maritima* empleando estructuras cristalográficas ya resueltas.
- Realizar un alineamiento múltiple de secuencias de amilasas que permita identificar de acuerdo al modelo los residuos localizados cerca del sitio de unión del aceptor, así como residuos que hayan tenido un efecto en la actividad transglicosídica en otras amilasas.
- Generar y purificar las enzimas con las mutaciones elegidas.
- Caracterización de parámetros cinéticos y de estabilidad en las mutantes generadas así como en la enzima silvestre.
- Caracterizar y cuantificar las reacciones de alcoholólisis observadas en las enzimas mutantes y silvestre en presencia de almidón y metanol como sustratos.

## MATERIAL Y METODOS

### GENERACION DEL MODELO ESTRUCTURAL DE LA $\alpha$ -AMILASA DE *T.*

#### *maritima*

Se realizó un alineamiento de las secuencias proteicas de las  $\alpha$ -amilasas de *Aspergillus oryzae* (código de acceso al PDB: 7TAA) acoplada a un hexasacárido modificado del inhibidor acarbosa y de AmyA de *Thermotoga maritima* MSB8 (código acceso a NCBI, CAA72194) empleando el paquete Clustal X (Higgins *et al.*, 1994), este alineamiento se envió al servidor de predicción de estructura Swiss-model (Guex, N., Peitsch, M. C., 1997., Peitsch, M. C. 1995., Schwede, *et al.*, 2003) el cual generó un modelo de AmyA basado en la estructura de *Aspergillus oryzae* (7TAA) la cual se encuentra cristalizada con el inhibidor acarbosa.

El modelo obtenido se corrigió forzando el solapamiento de las cuatro firmas características de las  $\alpha$ -amilasas de la estructura de AmyA con las de *A. oryzae*. Sobre el modelo final, empleando el programa DeepView/Swiss-PdbViewer (Guex N., Peitsch M.C., 1997), se identificaron los residuos localizados a una distancia de 4 y 5 Å alrededor de cada componente de la molécula de acarbosa, poniendo énfasis en los residuos localizados alrededor del sitio del aceptor, es decir los residuos localizados en los subsitios +1, +2 y +3.

### CONSTRUCCION Y CLONACION DE LOS GENES MUTANTES

La generación de las enzimas mutantes se realizó mediante mutagénesis sitio dirigida utilizando la técnica de megaprimer (Sarkar G., Sommer S. S., 1990), empleando como templado el gen de la  $\alpha$ -amilasa AmyA de *Thermotoga maritima* MSB8 clonado en el vector de expresión pET3a (Novagen) y flanqueado por los sitios de restricción NdeI y HindIII en la parte 5' y 3' del gen respectivamente introducidos por los oligos Tapón-AmyA1 y AmyA2 (Tabla 7).

#### *Construcción de megaprimers*

Después de localizar los residuos a mutagenizar dentro de la secuencia de aminoácidos de la AmyA de *T. maritima*, se diseñaron una serie de oligonucleótidos que introducen las mutaciones deseadas en el gen en la hebra no codificante del gen (Tabla 6, Fig. 12).

Empleando estos oligos junto con el oligo Tapón-AmyA1 (Tabla 6), que empalma en la parte 5' del gen e introduce un sitio de restricción NdeI, se amplificaron los diferentes megaprimers (Fig. 11 y 12) empleado un termociclador iClycler (BioRad). El tamaño esperado para cada megaprimer varía entre los 592 a 877 pares de bases de acuerdo al sitio donde se introdujo la mutación. La mezcla

de reacción y condiciones de amplificación se muestran en la figura 11. Los megaprimers amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa (Bio-Rad) al 1% empleando como amortiguador una solución 1x de Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (TAE 1x) y se purificaron empleando el Kit para purificación de productos de PCR (ROCHE). La muestra purificada se corrió junto con el marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen) en un gel de agarosa al 1% a 120 voltios para verificar la pureza y el tamaño de los productos amplificados.

**Tabla 6.** Relación de oligonucleótidos empleados para la construcción de los genes mutantes y el tamaño esperado para los megaprimers amplificados

Aminoácido a mutagenizar	Mutación introducida	Nombre del oligo	Secuencia (5'-3')*	Tamaño del megaprimer esperado (pb)
W177	V	W177V	CCG AAA T <u>A</u> C <u>A</u> CG ACT TTT TGA CC	592
Y178	V	Y178V	CCG AA <u>A</u> <u>A</u> CC CAG ACT TTT TGA CCC	595
F179	V	F179V	AGC CAA AAA GTC <u>C</u> G <u>A</u> <u>C</u> AT ACC AGA C	599
H222	D, E, Q	H222DEQ	GAC CAG CCA TAT AT <u>C</u> <u>T</u> CC TTT GCA GC**	772
H222	E	H222E	GAC CAG CCA TAT AT <u>S</u> <u>T</u> SC TTT GCA GC	772
V259	W	V259W	CCG CTG AA <u>C</u> <u>C</u> AC TCT CCC AC	877

\*Las letras subrayadas indican las bases correspondientes a la mutación introducida.

\*\* S= G o C

**Tabla 7.** Relación de oligonucleótidos empleados para la clonación del gen en los vectores de expresión pET3a, pET22a, pET28a y para su secuenciación.

Nombre del oligo	Característica introducida	Secuencia (5'-3')*
Oligo Tapón		CAC TAT CGG CAT TGC TGA CG
Tapón-AmyA1	Sitio de restricción NdeI extremo 5'	CAC TAT CGG CAT TGC TGA CG CGA AGG CAT ATG AAG GTT GTG AAG
AmyA2	Sitio de restricción HindIII extremo 3'	CGA TCC AAG CTT CAC TTT TTG AAA ATG TAC GC
AmyA2-His	Sitio de restricción HindIII que permite fusionar 6 His codificadas en pET28a	CCG CAA GCT TTT TGA AAA TGT ACG CTT TC
EcoRI-AmyA	Sitio de restricción EcoRI en sitio de corte de péptido señal de AmyA.	TCG GAT CCG AAT TCC TGC TTT CAA ACG
TorA-AmyA	Levanta péptido señal TorA complementario a AmyA	CAT AGA CGT TTG AAA GCA CGC GGT CGC ACG
Themaseq1	Secuenciación del gen	TGA CGC TGT GTG GTT TAT GC
Themaseq2	Secuenciación del gen	GTA TCC ATG GTA TGA AAC AGC
Themaseq3	Secuenciación del gen	GAT TTC TGG ATT TCC AAA GG
Themaseq4	Secuenciación del gen	CGA GTT CAT CAA AAA ACG TGC
Themaseq5	Secuenciación del gen	CTT CAG AAA AGA TCA CGA CGC

\*Las letras subrayadas indican la mutación introducida.

### *Amplificación de los genes mutantes*

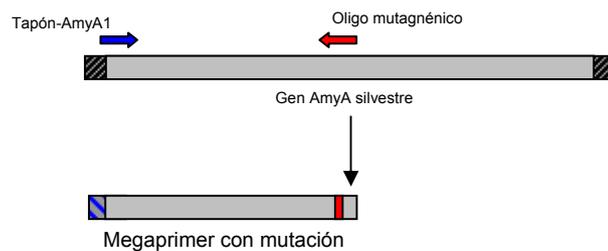
La amplificación de los genes mutantes se realizó empleando los megaprimers purificados (Fig. 11), los cuales poseen en su parte 5' una secuencia que no hibrida con el vector y para el cual se diseñó otro oligo llamado tapón que contiene sólo esta secuencia no hibridante (Tabla 7). Esta estrategia se utiliza para aumentar la eficiencia de amplificación del gen mutante. Una vez

purificado el megaprimer que contiene la mutación o mutaciones deseadas se utiliza en conjunto con el oligo AmyA2-His (Tabla 7), el cual empalma en la parte 3' del gen cambiando al codón de paro del extremo terminal del gen por un sitio de restricción HindIII complementario al vector de expresión pET28a (Invitrogen); por lo que al clonar el gene en el vector se fusiona en la parte carboxilo terminal del gen una secuencia que codifica para una serie de seis histidinas las cuales permitirán la posterior purificación de la proteína empleando columnas de afinidad de Ni<sup>2+</sup>. El uso del oligo tapón en este paso, permite amplificar preferencialmente las cadenas mutagenizadas, disminuyendo la probabilidad de encontrar genes silvestres. La mezcla de reacción y condiciones de amplificación se describen en la figura 11. Para descartar un cambio en la actividad de las enzimas mutantes debido a la introducción de las seis histidinas en la parte terminal de la proteína, también se llevó a cabo en la enzima silvestre el cambio del codón de paro por el sitio de restricción HindIII empleando los oligos AmyA1 y AmyA2-His en la mezcla de reacción.

### ***Amplificación del megaprimer***

#### Mezcla de reacción (100 µl)

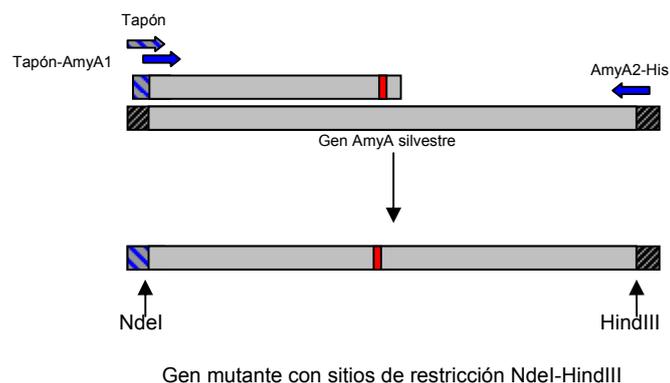
- 74 µl Agua destilada
- 8 µl dNTP's 2.5 mM (Invitrogen)
- 4 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen)
- 1 µl Taq polimerasa (Invitrogen)
- 10 µl Buffer 10x PCR (Invitrogen)
- 1 µl vector pET3a/AmyA Wt
- 1 µl oligo tapón 40 pmol
- 1 µl oligo tapón-AmyA1 40 pmol



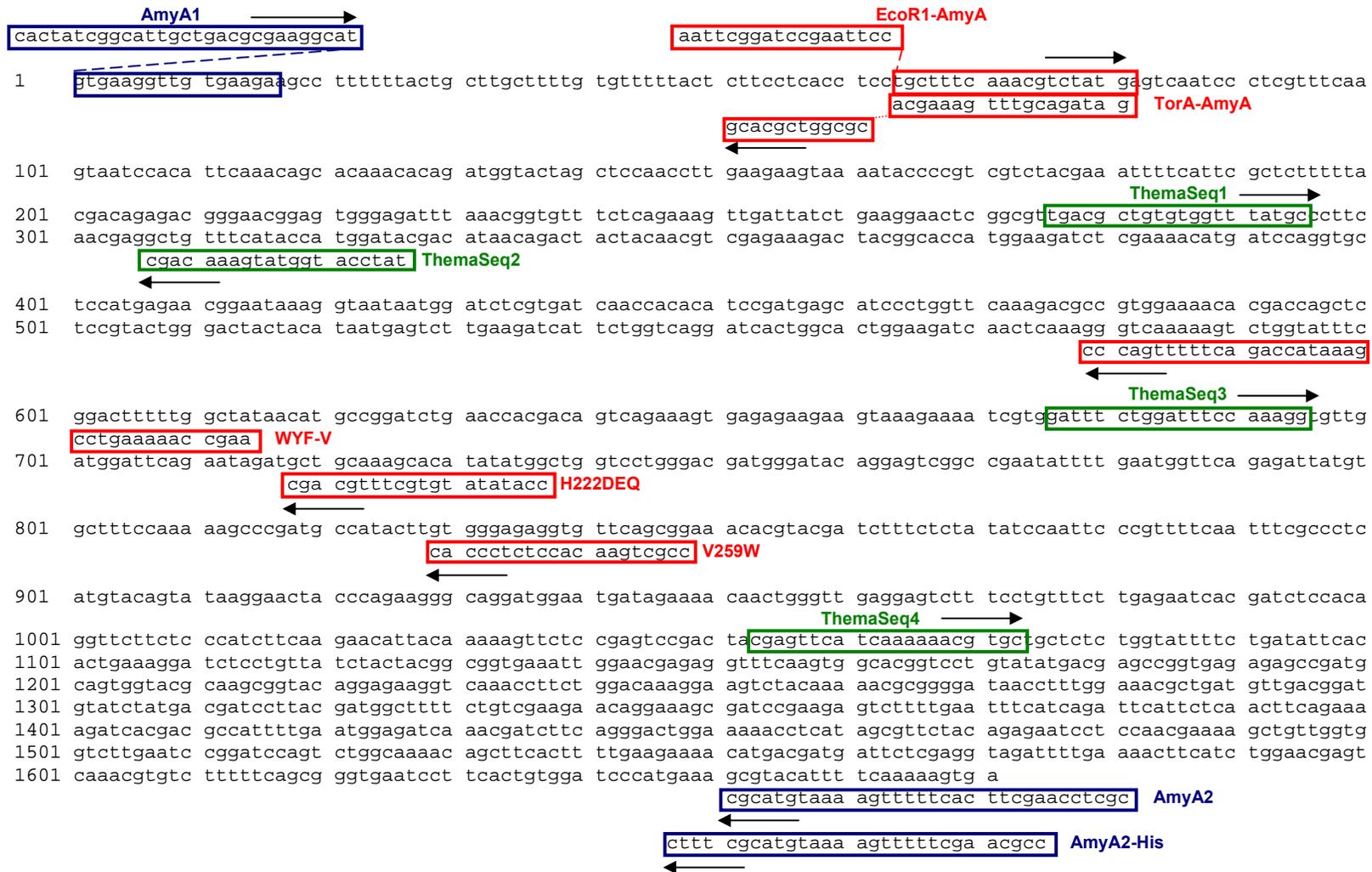
### ***Amplificación del gen***

#### Mezcla de reacción (100 µl)

- 59 µl Agua destilada
- 8 µl dNTP's 2.5 mM (Invitrogen)
- 4 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen)
- 5 µl Taq polimerasa (Invitrogen)
- 10 µl Buffer 10x PCR (Invitrogen)
- 1 µl vector pET3a/AmyA Wt
- 10 µl megaprimer
- 1 µl oligo tapón 40 pmol
- 1 µl oligo tapón-AmyA1 40 pmol
- 1 µl oligo AmyA2 His 40 pmol



**Figura 11.** Amplificación de megaprimers y genes mutantes. Las condiciones de amplificación para ambos casos fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, seguido por 25 ciclos, cada uno con etapas de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos; seguidos por un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos. Todos los reactivos usados en la mezcla de reacción son Invitrogen.



**Figura 12** Secuencia nucleotídica de la enzima AmyA de *Thermotoga maritima* con la localización en recuadros de los oligos diseñados para introducir sitios de restricción para su clonación al vector (azul), secuenciación (verde) así como para realizar mutagénesis sitio dirigida y cambio de péptido señal (rojo). Las flechas indican el extremo 3' de cada oligo.

Los genes amplificados, con un tamaño de 1671 pb, se separaron por electroforesis en geles de agarosa (Bio-Rad) al 1% empleando como amortiguador TAE 1x y se purificaron empleando el Kit para purificación de productos de PCR (ROCHE). Las muestras purificadas se corrieron junto con el marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen) en un gel de agarosa al 1% a 120 voltios para verificar la pureza y el tamaño del gen amplificado

### ***Digestión y ligación de los genes en el vector***

Los genes amplificados, tanto silvestre como mutantes, previamente purificados; así como el vector de clonación pET28a (Novagen) purificado con el Kit para purificación de plásmido (ROCHE), fueron digeridos con las enzimas de restricción NdeI y HindIII (*New England Biolabs, Inc.*) O/N a 37°C. Los fragmentos de restricción se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Bio-Rad) al 1% empleando como amortiguador TAE y se purificaron empleando el Kit para purificación de productos de PCR (ROCHE). Los fragmentos purificados se corrieron junto con el marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen) en geles de agarosa al 1% a 120 voltios para verificar su pureza y cuantificar la concentración del vector e insertos.

Para la ligación de los insertos en el vector se consideró una relación 8:1 respectivamente, además como control también se efectuó la ligación del vector digerido sin inserto. La ligación se efectuó utilizando una DNA ligasa T4 (*New England Biolabs, Inc.*), las muestras se incubaron O/N a 16 °C. Los vectores ligados a las mutantes así como el control se separaron de la solución de ligación mezclándolos vigorosamente con 500 µl de butanol absoluto (Merck) y centrifugándolos 10 minutos a 14 mil revoluciones por minuto (rpm). Las pastillas se dejaron secar 15 minutos a temperatura ambiente y después 5 minutos en un evaporador rotatorio al vacío (Vacufuge, eppendorf), posteriormente se resuspendieron en 5 µl de agua destilada.

### ***Transformación y clonación de los genes***

Se tomaron 2 µl de cada ligación resuspendida en agua y se mezclaron con una alícuota de 50 µl de células electro-competentes XLIBLue previamente descongeladas en hielo. Las electroporaciones se llevaron a cabo con un pulso de 1.8 Volts, recuperando las células en 1 ml de medio compuesto por 980 µl de SOC, 10µl de glucosa 2M, 10 µl de MgCl-MgSO<sub>4</sub> 1M, e incubándolas en agitación a 37 °C por 1 hora. Los cultivos se plaquearon en cajas con medio LB/kanamicina y se dejaron crecer a 37 °C.

Para estimar la eficiencia de mutagénesis se purificaron de 10 ml de medio líquido LB/kanamicina incubado a 37°C, los plásmidos de algunas colonias que crecieron después de la electroporación, éstos se digirieron con las enzimas de restricción NdeI y HindIII (*New England Biolabs, Inc.*) y los

fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 120 voltios con el fin de identificar la cantidad de colonias que poseen el inserto.

De los plásmidos que poseen insertos con el tamaño esperado (aprox. 1671 pb) se seleccionaron 8 para ser completamente en un secuenciador automático Perkin Elmer 377, empleando varios oligos que se diseñaron para empalmar en diferentes puntos del gen (Tabla 7, Fig. 12) con el fin de corroborar la introducción de las mutaciones y de las seis histidinas en el extremo 3' del gen así como la ausencia de mutaciones espurias. Se guardaron muestras en glicerol al 50% estéril de las clonas transformadas con la secuencia deseada a  $-71^{\circ}\text{C}$ .

## **CAMBIO DE PEPTIDO SEÑAL EN LA ENZIMA SILVESTRE Y MUTANTES MAS ALCOHOLITICAS**

En las mutantes que presentaron una actividad alcoholítica incrementada (H222DEQ), así como para la enzima silvestre se realizó un cambio del péptido señal nativo de AmyA de *T. maritima* por los péptidos propios de *E. coli* PelB y TorA con el fin de incrementar la expresión heteróloga de estas variantes.

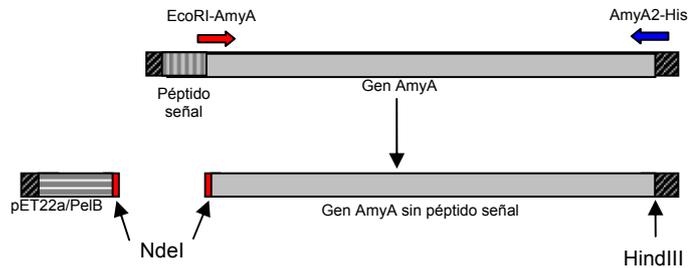
### ***PelB***

Para realizar el cambio del péptido señal nativo de AmyA por PelB se diseñó el oligo EcoRI-AmyA (Tabla 7) el cual inserta un sitio de restricción EcoRI en el sitio de corte del péptido señal nativo de AmyA. La introducción de este sitio de restricción dentro del gen permite reemplazar el péptido señal nativo de AmyA por el péptido PelB expresado en el vector pET22a (Novagen).

Empleando el oligo EcoRI-AmyA junto con el oligo AmyA2-H (Tabla 7) se levantaron los genes silvestre y mutantes de AmyA mediante PCR (Fig. 13). Los genes amplificados con el péptido señal nativo reemplazado (1682 pb), así como el vector pET22b (el cual posee resistencia a ampicilina) se purificaron, ligaron, transformaron y clonaron bajo las condiciones ya descritas. Para la digestión de los genes y el vector se utilizaron las enzimas de restricción EcoRI y HindIII.

Mezcla de reacción (100  $\mu$ l)

- 77  $\mu$ l Agua destilada
- 8  $\mu$ l dNTP's 2.5 mM (Invitrogen)
- 2  $\mu$ l Pfu polimerasa (Altaenzymes)
- 10  $\mu$ l Buffer 10x PCR (Altaenzymes)
- 1  $\mu$ l vector pET28a/AmyA Wt, mutantes
- 1  $\mu$ l oligo EcoRI-AmyA 40 pmol
- 1  $\mu$ l oligo AmyA2-His 40 pmol



**Figura 13.** Cambio del péptido señal nativo de AmyA por PeIB. Condiciones de amplificación usadas: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos, con etapas de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 3 minutos; un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos.

***TorA***

El péptido señal TorA se obtuvo de una construcción de  $\beta$ -lactamasa clonada en el vector de expresión pT4/Bla. Para amplificar el péptido se empleó el oligo NdeI-Bla, el cual introduce un sitio de restricción NdeI en el extremo 5' del gen de  $\beta$ -lactamasa, y el oligo TorA-AmyA (Tabla 7) que empalma con el extremo 3' del péptido señal TorA y además tiene una secuencia complementaria a las primeras bases del inicio de la proteína madura de AmyA (Fig. 14).

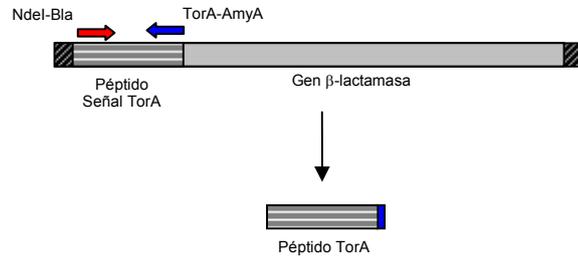
El péptido TorA amplificado (145 pb) y purificado a partir de un gel de agarosa al 2% (siguiendo el protocolo del Kit de purificación de productos de PCR, (Roche) se empleó para levantar un megaprimer del gen de AmyA (Fig. 14). Como el extremo 3' del péptido TorA hibrida con las bases contiguas al sitio de corte del péptido señal de AmyA, la reamplificación del gen empleando el oligo NdeI-Bla y el oligo ThemaSeq2 (Tabla 7) que hibrida en la parte central de AmyA, genera el megaprimer TorA-ThemaSeq2 de 452 pb el cual reemplaza el péptido nativo de AmyA por TorA.

Empleando el megaprimer purificado y el oligo AmyA2-His se reamplifican los genes AmyA, tanto silvestre como mutantes, produciéndose genes con un tamaño de 1770 pb. Los genes reamplificados se purifican de agarosa al 1% como ya se ha descrito y se digieren paralelamente con el vector de expresión pET28a empleando las enzimas de restricción NdeI, HindIII. El proceso de ligación, transformación y clonación es igual al descrito para la construcción de las enzimas mutantes. Las condiciones de reacción empleadas para la amplificación de TorA, el megaprimer TorA-ThemaSeq2 y la reamplificación de los genes se describen en la figura 14.

### **Amplificación de TorA**

#### **Mezcla de reacción (100 µl)**

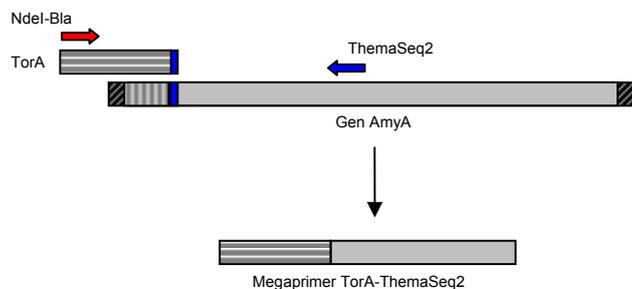
- 76 µl Agua destilada
- 8 µl dNTP's 2.5 mM (Invitrogen)
- 2 µl Pfu polimerasa (Altaenzymes)
- 10 µl Buffer 10x PCR (Altaenzymes)
- 1 µl vector pT4/Bla
- 2 µl Ndel-Bla 17 pmol
- 1 µl oligo TorA-Amy 40 pmol



### **Amplificación megaprimer ThorA-ThemaSeq2**

#### **Mezcla de reacción (150 µl)**

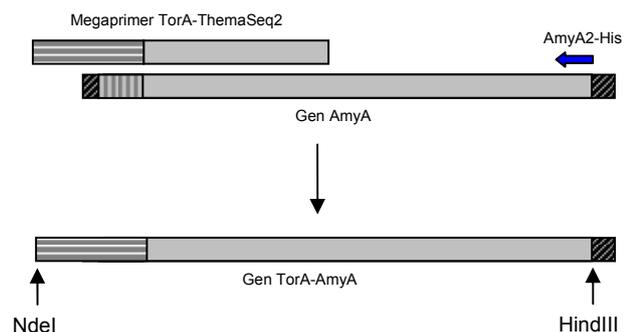
- 106 µl Agua destilada
- 12 µl dNTP's 2.5 mM (Invitrogen)
- 6 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen)
- 3 µl Taq polimerasa (Invitrogen)
- 15 µl Buffer 10x PCR (Invitrogen)
- 2 µl vector pET28a/AmyA Wt y mutantes
- 2 µl péptido TorA purificado
- 1.5 µl oligo Ndel-Bla 17 pmol
- 1.5 µl oligo ThemaSeq2 40 pmol



### **Reamplificación de AmyA**

#### **Mezcla de reacción (150 µl)**

- 109 µl Agua destilada
- 12 µl dNTP's 2.5 mM (Invitrogen)
- 6 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen)
- 2 µl Taq polimerasa (Invitrogen)
- 15 µl Buffer 10x PCR (Invitrogen)
- 1 µl vector pET28a/AmyA Wt y mutantes
- 2 µl megaprimer TorA-ThemaSeq2 purificado
- 1.5 µl oligo AmyA2-His 40 pmol



**Figura 14.** Mezclas de reacción y condiciones de amplificación del péptido TorA, megaprimers y genes.

**Péptido TorA:** un ciclo de desnaturalización inicial de 4 min a 95°C, seguido por 5 ciclos, cada uno compuesto por etapas de 30 seg. a 95°C, 30 seg. a 35°C, 30 seg. a 72°C; después 15 ciclos con etapas de 30 seg. a 95°C, 30 seg. a 55°C, 30 seg. a 72°C; seguidos por un ciclo final de extensión a 72°C durante 5 minutos.

**Megaprimer TorA-ThemaSeq2:** un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos, cada uno con etapas de 1 min a 94°C, por 1 min a 52°C, 3 min a 72°C; seguidos por un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos.

**Reamplificación del gen:** un ciclo de desnaturalización inicial de 4 min a 94°C; seguido por 30 ciclos, cada uno con etapas de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 3 min a 72°C; seguidos por un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos.

## EXPRESION DE LAS PROTEINAS

Todos los plásmidos empleados para la expresión de proteínas se purificaron de un cultivo de 10 ml de medio LB/antibiótico proveniente de células XL1Blue conservadas a  $-71^{\circ}\text{C}$ . Estos plásmidos se transformaron en células calcio competentes obtenidas de la cepa ER de *Escherichia coli* la cual expresa la polimerasa del fago T7. Las células con la construcción pET28a/AmyA se cultivaron en cajas con medio LB/kanamicina, mientras que aquellas con construcción pET3a/AmyA y pET22b/AmyA se cultivaron en cajas con LB/ampicilina. Las placas conteniendo las transformaciones se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta observar crecimiento de colonias aisladas.

Empleando un par de colonias se cultivó un preinóculo con 20 ml de medio LB/antibiótico, el cual se vertió en 3 Lts de medio LB/kanamicina y/o LB/ampicilina (para el caso de las construcciones con los péptidos PelB y TorA solamente se empleó 1 Lt de medio LB), incubándose en agitación constante a  $30^{\circ}\text{C}$  hasta que el cultivo alcanzó una  $\text{DO}_{600} = 0.4-0.5$ , momento en el que se indujo la sobre expresión de las enzimas con 0.25 mM de IPTG por un mínimo de 8 horas manteniéndose con agitación constante a  $21^{\circ}\text{C}$ . Se separó la masa celular centrifugando el cultivo a 7500 rpm, por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El pellet se guardó en congelación a  $-71^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la purificación.

Se observó la inducción de la proteína tomando una alícuota de 1 ml del cultivo antes y después de la inducción con IPTG, la cual se centrifugó 3 minutos a 14 mil rpm. La pastilla se resuspendió en 900  $\mu\text{l}$  de amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, pH 7 y 100  $\mu\text{l}$  de SDS 10%, y se calentó a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. La solución se centrifugó 4 minutos a 14 mil rpm y se cargó una muestra del sobrenadante en un gel de acrilamida 10% (Bio-Rad) - SDS, 180 volts, junto con marcador de peso molecular Precision Plus Protein (Bio-Rad).

## PURIFICACION DE LAS PROTEINAS

### *Enzima silvestre*

La pastilla congelada se resuspendió en 6 ml de amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, pH 7. Las células se lisaron mediante 30 segundos de sonicación en intervalos de 3 minutos, 10 veces empleando un sonicador Branson sonifier 450. Después de clarificar el extracto centrifugándolo a 10,000 rpm por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se calentó por 20 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$  para precipitar proteínas no termo-resistentes, las cuales fueron removidas centrifugando la solución a 10,000 rpm por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las proteínas del extracto fueron precipitadas agregando sulfato de amonio granular al 70% y concentradas mediante centrifugación por 30 minutos a 10 mil rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . La pastilla resuspendida en  $\approx 200 \mu\text{l}$  de amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  2mM, pH 7, se filtró a través de una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  (Millipore) y se purificó mediante cromatografía en fase líquida (FPLC) (AKTA-Pharmacia) utilizando una columna de permeación en

gel Superose HR12 (Amersham biosciences), pasando  $\approx 100 \mu\text{l}$  de muestra por corrida con un flujo de  $0.5 \text{ ml/min}$  y una presión máxima de  $3 \text{ MPa}$ .

La detección cualitativa de la enzima activa dentro de las fracciones colectadas en la purificación se hizo detectando la degradación (pérdida de viscosidad y clarificación) de  $500 \mu\text{l}$  de almidón  $10 \text{ mg/ml}$  incubado a  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  después de la adición de  $10 \mu\text{l}$  de cada fracción colectada. La pureza de estas fracciones se determinó corriendo una muestra de ellas en un gel desnaturizante de acrilamida  $10\%$  - SDS a  $180 \text{ voltios}$ . Las fracciones activas se consolidaron y concentraron con filtros Amicon Ultra-4 o Amicon Ultra-15,  $30000 \text{ NMWL}$  (Millipore) (dependiendo del volumen final obtenido) a un volumen de  $5 \text{ ml}$ , del cual se tomó una parte para realizar los ensayos de caracterización y el resto se precipitó con sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración de  $70\%$  guardándose la solución en refrigeración para posteriores determinaciones.

### ***Enzimas silvestre y mutantes expresadas con 6-His***

Para este caso, el pellet se resuspendió en  $6 \text{ ml}$  de amortiguador  $\text{NaCl } 300\text{mM}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ } 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7.7$  y las células se lisaron como ya se mencionó. El extracto se clarificó centrifugando a  $10,000 \text{ rpm}$  por  $30 \text{ minutos}$  a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  y se filtró a través de acrodiscos de  $0.2 \mu\text{m}$  (Pall Corporation) para después purificarlo mediante cromatografía en fase líquida (FPLC) (AKTA-Pharmacia) utilizando una columna de afinidad con capacidad de  $5 \text{ ml}$  (HiTrap Chelating HP, Amersham biosciences) empleando níquel como ligante. La fase móvil empleada es amortiguador  $\text{NaCl } 300\text{mM}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ } 50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7.7$  a un flujo de  $5 \text{ ml por minuto}$ , presión máxima de  $0.3 \text{ MPa}$ , eluyendo la proteína con un gradiente de  $0$  a  $300 \text{ mM}$  de Imidazol, en un volumen de  $125 \text{ mL}$ . El volumen de muestra inyectado por corrida es de  $5 \text{ ml}$ .

Si las fracciones activas consolidadas están lo suficientemente puras son dializadas por un mínimo de  $4\text{-}6 \text{ horas}$  contra  $\approx 250 \text{ ml}$  de amortiguador  $50 \text{ mM Tris}$ ,  $150 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7$ ; adicionado con  $100 \mu\text{l}$  de DTT  $0.5 \text{ mM}$  y  $400 \mu\text{l}$  de EDTA  $500 \text{ mM}$  para eliminar los remanentes de níquel en la solución y remover el imidazol.

Posteriormente se cambió el amortiguador un par de veces, adicionando a la solución  $\text{CaCl}_2 \text{ } 2\text{mM}$ , además de  $100 \mu\text{l}$  de DTT  $0.5 \text{ mM}$ . Dependiendo del volumen inicial de muestra colectada y dializada, esta se concentró mediante filtros Amicon Ultra-4 o Amicon Ultra-15,  $30000 \text{ NMWL}$  (Millipore) a un volumen de  $5 \text{ ml}$ , del cual se separó  $1 \text{ ml}$  para realizar los ensayos y el resto se precipitó con sulfato de amonio granular hasta alcanzar  $70\%$ , guardándose la solución en refrigeración.

Si las fracciones consolidadas no estaban lo suficientemente puras, la muestra se dializó un par de veces contra amortiguador 20 mM Tris, pH 8, se concentró a  $\approx$  10 ml con filtros Amicon Ultra-4 o Amicon Ultra-15, 30000 NMWL (Millipore) y se filtró empleando una membrana de 0.2  $\mu$ m (Pall Corporation) para pasarla por una columna de intercambio aniónico MonoQ 4.6/100 PE (Amersham biosciences). La muestra inyectada en la columna (máximo 8 ml por corrida) se eluyó empleando un gradiente de amortiguador 20 mM Tris, pH 8, de 0 a 1M de NaCl, a un flujo de 0.3 ml/min y una presión máxima de de 4.0 MPa.

A las fracciones colectadas se les determinó su actividad en presencia de almidón y verificó su pureza corriendo un gel desnaturalizante de acrilamida al 10%- SDS a 180 voltios teñido con azul de coomasie. Después de consolidar las fracciones activas, se dializaron un par de veces contra amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, pH 7 y de ser necesario se concentraron con filtros Amicon Ultra-4 o Amicon Ultra-15, 30000 NMWL (Millipore) antes de realizar los ensayos de actividad con diferentes sustratos.

#### ***Enzimas silvestre y mutantes expresadas con PelB y 6-His***

El pellet obtenido de 1 Lt de medio, se resuspendió en 10 ml de amortiguador NaCl 300mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7.7, las células se lisaron mediante sonicación bajo las mismas condiciones ya descritas. El extracto se clarificó centrifugando a 10,000 rpm por 30 minutos a 4°C, se apartó una fracción del sobrenadante obtenido (5  $\mu$ l) para determinar concentración y actividad de la proteína, y al resto se adicionó gota a gota una solución de sulfato de estreptomicina 10% para precipitar DNA; después de dejar en agitación la solución por 30 min., se calentó por 20 min. a 82°C para precipitar proteínas no termo-resistentes las cuales fueron removidas por centrifugación a 10,000 rpm por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró por acrodiscos de 0.2  $\mu$ m (Pall Corporation), se apartaron 5  $\mu$ l de éste para determinar concentración y actividad de la proteína y el resto ( $\approx$ 7-8 ml) se purificó por cromatografía en fase líquida (FPLC) (AKTA-Pharmacia) empleando la columna afinidad a níquel bajo las condiciones ya descritas.

Las fracciones activas consolidadas se dializaron contra amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, pH 7 y se concentraron a 200  $\mu$ l empleando filtros Amicon Ultra-15, 30000 NMWL (Millipore) mediante centrifugación a 5000 g por 10 min. a 4°C. Cada muestra se filtró empleando una membrana de 0.2  $\mu$ m (Pall Corporation) y se purificaron mediante cromatografía en fase líquida (FPLC) (AKTA-Pharmacia) utilizando una columna de permeación en gel Superose HR12 (Amersham biosciences) bajo las condiciones ya mencionadas. La detección de fracciones activas y su pureza se realizó mediante las condiciones ya descritas.

Para todas las enzimas la cantidad de proteína purificada se cuantificó mediante el método de Bradford (Bio-Rad) (Anexo II).

## **CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTANTES**

Todas las enzimas purificadas (WT sin colas de 6-His, Wt mutantes con colas de 6-His y Wt mutantes con PelB y colas de 6-His) se sometieron a ensayos para determinar su actividad específica en presencia de almidón soluble 10 mg/ml y sus parámetros cinéticos Km y Kcat.

Después de verificar que la adición de colas de 6-His en la parte carboxilo terminal de la enzima silvestre no afectó significativamente estos parámetros con respecto a los observados en la enzima silvestre; las enzimas Wt y mutantes con colas de 6-His se incubaron en presencia de almidón para ver reacciones de hidrólisis, con maltoheptaosa (G7) para observar reacciones de transglicosidación y con almidón-metanol para determinar reacciones de alcoholólisis.

Para aquellas enzimas que presentaron una actividad alcoholítica aparentemente incrementada con respecto a la observada en la enzima silvestre se les realizaron ensayos de estabilidad y se sometieron a reacciones de transglicosidación empleando maltodextrinas (G2-G7) y a reacciones de alcoholólisis con almidón-metanol cuantificando la cantidad de metilglucósido generado empleando la enzima glucoamilasa de *Aspergillus niger* (Sigma).

### ***Determinación de actividad específica***

La actividad específica para cada enzima se determinó midiendo los azúcares reductores liberados por la hidrólisis de almidón después de la adición de la enzima a la muestra en diferentes tiempos de incubación (Anexo III).

Estas reacciones se llevaron a cabo empleando 1 ml de una suspensión con 10 mg/ml de almidón soluble (Sigma) y amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, pH 7 incubada a 85 °C en un Thermomixer (Eppendorf).

A esta suspensión se le adicionaron 5 µl de enzima purificada, dejándose incubar a 85°C durante 12 minutos, lapso en el que se tomaron alícuotas de 100 µl cada 2 ó 3 minutos a partir de la adición de la enzima (el cual se considera como tiempo cero), dependiendo de la velocidad de despolimerización del almidón.

Estas alícuotas se vierten inmediatamente en eppendorf de 1.5 ml con 100 µl de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con el fin de detener la reacción. La mezcla es calentada a 85°C por 10 minutos para desarrollar el color generado por la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-

amino-5nitrosalicílico por el grupo carbonilo libre de los azúcares reductores del almidón hidrolizado. Después de enfriarse las muestras en hielo, se aforaron a 1 ml con agua destilada. El color desarrollado por la solución es medido espectrofotométricamente a 450 nm. Las lecturas tomadas de la muestra se convierten a mg/ml de glucosa después de interpolar estos valores con los observados en la curva de calibración con glucosa con concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mg/ml. Y después de relacionar la velocidad de formación de azúcares reductores con la cantidad de enzima empleada y su concentración obtenemos la actividad específica, la cual puede ser definida de formas diferentes para cada enzima, pero en nuestro caso una unidad de actividad específica la expresamos en términos de micro equivalentes de glucosa ( $\mu$ moles) liberados por minuto por miligramo de  $\alpha$ -amilasa.

### ***Cinética tipo Michaelis-Menten***

Los parámetros cinéticos de las enzimas (kcat y Km), se determinaron obteniendo las actividades específicas con 4 U/ml de las enzimas mutantes y silvestre en diferentes concentraciones de almidón soluble (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 6, 8, 10 mg/ml). La velocidad inicial de cada reacción fue graficada contra las diferentes concentraciones de almidón usadas y los parámetros kcat y Km fueron obtenidos mediante un análisis de regresión no lineal usando el programa Kaleidagraph (Abelbeck software).

### ***Ensayo de estabilidad***

La estabilidad de la enzima silvestre y de las mutantes con mayor actividad alcoholítica se determinó midiendo la actividad residual que presentaban después de incubarlas a 85 °C por diferentes lapsos de tiempo. Para esto, alícuotas de las diferentes enzimas contenidas en tubos eppendorf sellados se incubaron a 85 °C en un Thermomixer compact (eppendorf), el tiempo de colecta de cada alícuota se determinó en función del grado de inactivación de cada enzima. Las alícuotas colectadas se depositaron en hielo por cinco minutos y se tomó una fracción correspondiente a 3 U/ml de enzima a la cual se le midió su actividad residual sobre una suspensión de almidón al 1 % empleando el método de DNS que ya se describió. El valor de estabilidad se reportó como porcentaje de actividad residual, siendo el 100% de actividad la velocidad alcanzada por la enzima sin incubación previa. El valor de la vida media de las enzimas se obtuvo a partir de la pendiente obtenida de las curvas de inactivación térmica, la cual se calculó mediante regresión lineal del logaritmo de la actividad residual contra tiempo.

### ***Perfil de productos con diferentes sustratos***

#### **a) Almidón 10 mg/ml (1%)**

Los productos de hidrólisis de las enzimas se determinaron después de incubar a 85°C en agitación constante empleando un Thermomixer compact (eppendorf), 4 U/ml de cada enzima con

1 ml de almidón soluble (sigma) 10 mg/ml (solubilizado en amortiguador 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2mM CaCl, pH 7) previamente incubado a 85°C. Se tomaron alícuotas de 50 µl después de incubar 0, 4, 8, 24 y 48 horas a partir de la adición de la enzima, conservándose las alícuotas en congelación hasta el momento de cargar una muestra en cromatoplasmas de sílica y revelarlas con  $\alpha$ -naftol.

**b) Maltodextrinas (G1-G7) 2%**

Después de determinar la actividad para cada enzima se incuban a 85 °C en agitación constante 4 U/ml de cada una en 200 µl de una solución preincubada a 85°C con diferentes maltodextrinas, que van de G2 a G7 al 2%. Se toman alícuotas de 50 µl a tiempos 0, 10 minutos, 1 y 12 horas a partir de la adición de la enzima, las cuales se guardaron en congelación hasta el momento de cargar una muestra en cromatoplasmas de sílica y revelarlas con  $\alpha$ -naftol.

La identificación de los productos generados por los ensayos anteriores se realizó mediante Cromatografía en Capa Fina (TLC). Se aplicaron 0.8 µl de cada alícuota tomada y 1 µl de estándar (solución de maltodextrinas G1-G7 (Sigma) cada una a 15 mg/ml disueltas en agua en cromatoplasmas HPTLC de sílica gel 60 de 10x10 cm (Merck),). Las placas se pusieron en contacto con la fase móvil etanol:butanol:agua (50:20:30). Después de haber corrido se secaron por 30 minutos y se revelaron esparciendo sobre ellas una solución alcohólica de  $\alpha$ -naftol y ácido sulfúrico (Fried B., Shelma J., 1986) y calentando a 100 °C.

***Reacciones de alcoholólisis usando almidón 6% - metanol 20%***

Se adicionaron 4 U/ml de cada una de las enzimas en 1 ml de una solución de almidón 6%-metanol 20% pre-incubada a 85°C, las reacciones se siguieron por 48 horas, tomándose alícuotas de 50 ó 200 µl (dependiendo del grado de evaporación de la muestra al final de la incubación) después de 0, 10min, 12, 24 y 48 horas de incubación deteniendo la reacción mediante incubación en un baño de hielo.

**a) Cuantificación de reacciones de alcoholólisis empleando Glucoamilasa**

La enzima silvestre y las mutantes (4 U/ml) que presentan mayor actividad alcoholítica se incubaron a 85°C por 0, 12, 24 y 48 horas en 300 µl de una suspensión de almidón 6%-metanol 20%. Después del período de incubación las muestras se enfriaron en hielo y se separaron 50 µl para llevar a cabo la cuantificación de azúcares reductores formados en cada tiempo de incubación y para correrlos por TLC. Los 250 µl restantes de cada tiempo se emplean para cuantificar el grado de alcoholólisis mediante la conversión de todos los alquil glicósidos formados en metil glucósido a través de la acción de la enzima glucoamilasa (toda vez que no se cuenta con estándares de diferentes alquil glicósidos).

A los 250  $\mu$ l de reacción tratados con  $\alpha$ -amilasa se les adiciona la cantidad necesaria de amortiguador fosfatos 50 mM para llevar la muestra a pH 4, esta solución se deja estabilizar 5 minutos a 40°C y después a esta solución se le adiciona la cantidad necesaria de glucoamilasa de *Aspergillus niger* (Sigma) para obtener una cantidad de 43 U/ml de enzima, la reacción se incubó por tres horas a 40°C. Al término de la incubación, las muestras se refrigeraron hasta que concluyeron todos los tiempos de incubación; se corrió un TLC con las muestras tratadas con  $\alpha$ -amilasa y con glucoamilasa, y se llevó a cabo la cuantificación de metil glucósido por HPLC.

#### **b) Análisis de productos de reacción**

Los productos de reacción de todas las reacciones de alcoholisis se analizaron por TLC, bajo las condiciones ya descritas, aumentando como segundo estándar 1  $\mu$ l de metilglucósido-glucosa (Sigma) 10 mg/ml disuelto en agua por placa.

La identificación de los productos de alcoholisis y la cuantificación de metil glucósido se hizo por Cromatografía líquida de alta presión, HPLC, empleando un cromatógrafo Waters-Millipore 510 con detector de índice de refracción Waters modelo 410 y un inyector automático Waters 717 plus.

Todas las muestras fueron centrifugadas 1 minuto a 14 mil rpm previo al análisis, el cual se llevó a cabo en una columna C18, empleando como fase móvil agua milliQ filtrada y desgasificada a un flujo de 0.7 ml/min; inyectándose 10  $\mu$ l de cada muestra con un tiempo de corrida de 18 minutos, además se inyectaron 3, 6, 9, 12  $\mu$ l de maltodextrinas (G1-G7) y metilglucósido-glucosa (10 g/L) como estándares.

La cuantificación de metilglucósido liberado por la glucoamilasa se hizo calculando el área de metilglucósido observado en los cromatogramas de las muestras inyectadas e interpolándolos con el área obtenida a partir de los cromatogramas de la inyección del estándar de metilglucósido, el valor se reporta como mg/ml de metil glucósido. Los eventos de alcoholisis e hidrólisis se calcularon tomando en cuenta el número de equivalentes de metilglucósido cuantificado por HPLC así como el número de equivalentes de glucosa formados durante la reacción (ANEXO IV).

## **ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DE MUTANTES H222 CON PEPTIDOS PeIB Y TorA**

Para determinar si el reemplazo del péptido nativo de AmyA por PeIB y TorA en las enzimas silvestre y mutantes H222DEQ-6His mejora su procesamiento, se midió la actividad específica presente en las fracciones citoplásmica y periplásmica de la célula, así como en el medio de

cultivo. Para ello se transformaron en células calcio competentes obtenidas de *E. coli* ER los plásmidos con las construcciones Wt-6His y mutantes H222DEQ-6His con péptido señal TorA y PelB, y como control la enzima silvestre con el péptido nativo. Después de la incubación en placas de LB/antibiótico a 37°C, se tomó una colonia aislada de cada transformante y se inoculó en 10 ml de medio LB/kanamicina (enzimas con péptido TorA y nativo) o LB/ampicilina (enzimas con péptido PelB). El cultivo se incubó a 30°C en agitación constante hasta que alcanzó una  $DO_{600} = 0.4$  momento en el que se indujo la sobre expresión de las enzimas con 0.25 mM de IPTG durante 16 horas en agitación constante a 21 °C. Después de la inducción con IPTG se ajustaron todos los medios a una  $DO_{600} = 0.641$  (lectura más baja después de medir la absorbancia de cada medio) con el fin de estandarizar el contenido celular de cada cultivo.

Después de centrifugar el cultivo durante 8 min. a 4°C con 4600 g, se concentró el sobrenadante (medio de cultivo) a 1 ml empleando filtros Amicon Ultra-15, 30000 NMWL (Millipore). Por otra parte se resuspendió el pellet en 200 µl de buffer esferoblastos, una vez resuspendido se le adicionó 80 µl de lisozima (10 mg/ml) e inmediatamente se le adicionó 720 µl de buffer de esferoblastos diluido 1:2 con agua. La solución se incubó en hielo 30 min y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C; el sobrenadante (fracción periplásmica) se separa y refrigera. Las células del pellet se lisaron mediante 7 pulsos de sonicación cada 30 segundos en un sonicador Branson sonifier 450. El extracto (fracción citoplásmica) se clarificó mediante centrifugación a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Una vez separadas las fracciones periplásmica, citoplásmica y el medio de cultivo de cada enzima, se midió actividad en cada una de ellas (Ver adelante), adicionando a 1 ml de almidón 10 mg/ml incubado a 85°C, 100 µl de cada muestra y detectando la formación de azúcares reductores mediante el método de dinitrosalicilato.

## RESULTADOS

Con el fin de aumentar la actividad alcoholística de la  $\alpha$ -amilasa AmyA de *Thermotoga maritima* se diseñaron una serie de mutantes dirigidas hacia residuos localizados alrededor del sitio activo, el cual se tuvo que definir a través de un modelo generado por homología, ya que no se cuenta con información estructural de esta enzima.

### MODELO ESTRUCTURAL DE LA $\alpha$ -AMILASA AmyA DE *Thermotoga maritima*

Con la finalidad de identificar en la AmyA los residuos involucrados en la unión del sustrato, se diseñó un modelo por homología de esta enzima, empleando como molde la estructura de una  $\alpha$ -amilasa unida a un sustrato, en este caso al inhibidor acarbosa; sin embargo la baja similitud que guarda AmyA con otras amilasas de estructura conocida (menos de 30%) (Tabla 8) dificultó la obtención de un modelo bien estructurado.

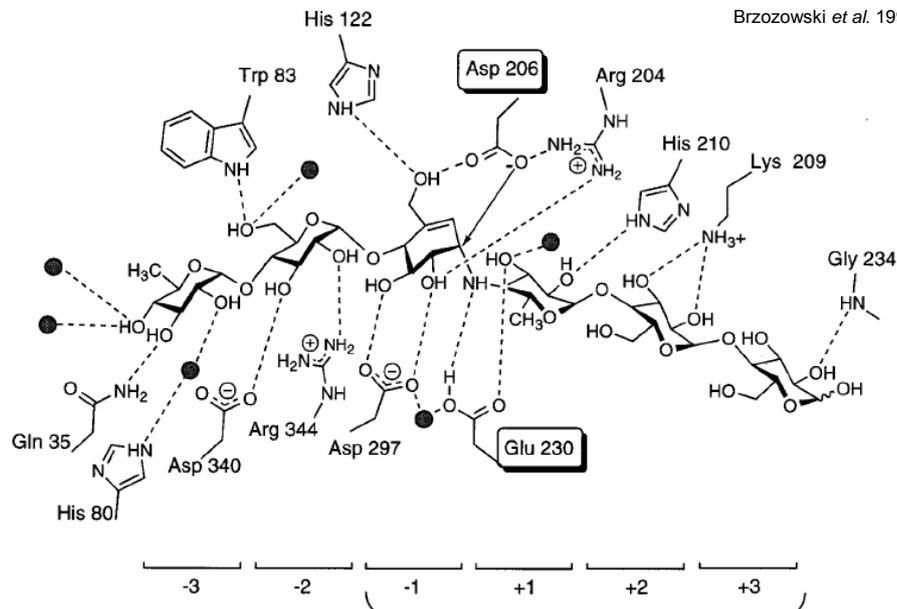
**Tabla 8.-** Porcentaje de similitud observado entre las secuencias de la  $\alpha$ -amilasa de *T. maritima* y otras amilasas de estructura conocida.

% similitud	Código PDB	Organismo	Inhibidor
35	1WZA	<i>H. orenii</i>	
31	1UA7	<i>B. subtilis</i>	Acarbosa
27	1VFK	<i>T. vulgaris R-47</i>	Acarbosa
26	1QHO	<i>B. stearothermophilus</i>	Acarbosa
25	1HVX	<i>B. stearothermophilus</i>	
25	7TAA	<i>A. oryzae</i>	Acarbosa
25	6TAA	<i>A. oryzae</i>	
25	1AQH	<i>H. haloplanctis</i>	
23	1E3X	<i>B. amyloliquefaciens</i> & <i>B. licheniformis</i>	Acarbosa
23	1BLI	<i>B. licheniformis</i>	
22	1VJS	<i>B. licheniformis, precursor</i>	

Aunque se enviaron al servidor Swiss-model (Guex, N., Peitsch, M. C., 1997., Peitsch, M. C. 1995., Schwede, *et al*, 2003) alineamientos con secuencias de amilasas bacilares unidas a acarbosa que guardan entre un 23 y 31% de identidad con AmyA, los modelos obtenidos (en el caso de que se generaran) arrojaban estructuras con una pobre definición de los dominios B y C, los cuales representan los dominios mas variables entre las  $\alpha$ -amilasas, en cambio dentro del dominio A se logran estructurar la mayoría de las láminas  $\beta$  y  $\alpha$  hélices del barril, aunque estas últimas presentan una orientación diferente con respecto al modelo original.

El modelo con mejor definición de los tres dominios fue el generado a partir de la estructura de la  $\alpha$ -amilasa sacarificante de *Aspergillus oryzae* (7TAA) (Brzozowski *et al*. 1997), cuya secuencia presenta un porcentaje de similitud de 25% con respecto a la  $\alpha$ -amilasa AmyA de *T. maritima*. Esta enzima, cristalizada a 1.98 Å de resolución, tiene unido en los subsitios -3 a +3 un hexasacárido (denominado ABC) producto de una modificación del inhibidor acarbosa, el cual es fijado a la

enzima mediante interacciones de “stacking” y puentes de hidrogeno formados por diversos residuos del sitio activo (Fig. 15).



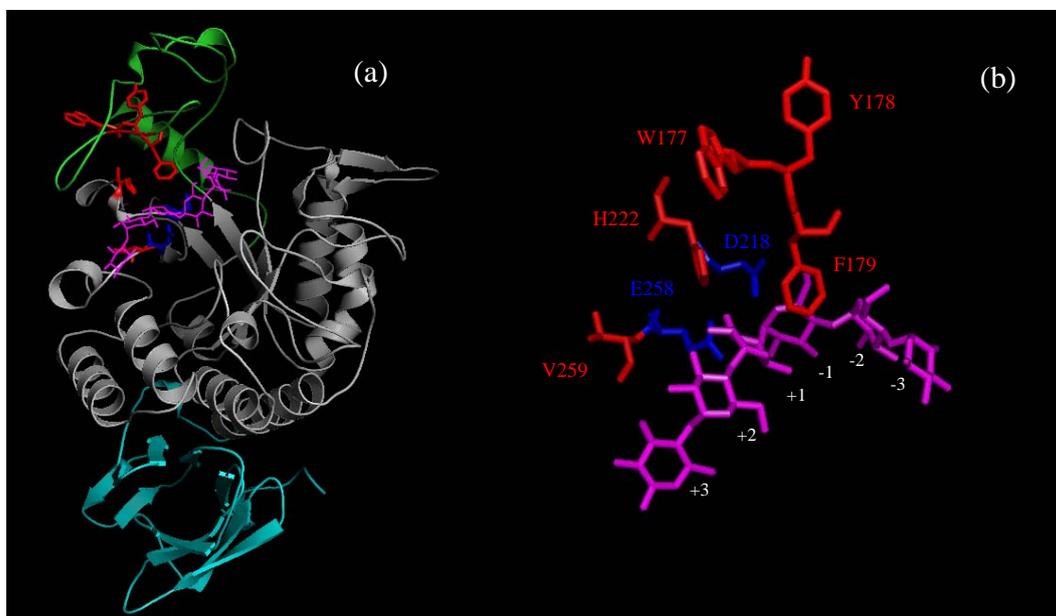
**Figura 15.** Diagrama esquemático de la interacción de la acarbosa con  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae* (7TAA). El inhibidor acarbosa es un tetrasacárido compuesto, a partir de su extremo no reductor, por un derivado aminociclohexano polihidroxilado (valienamina) (rojo) unido por un átomo de nitrógeno a una 6-deoxiglucosa (azul), la cual a su vez se une a maltosa (negro). En la estructura de la  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae* 7TAA este inhibidor se encuentra modificado (ABC), debido a la unión de una molécula de maltosa a la acarbosa. Este inhibidor se encuentra unido a los subsitios -3 a +3 de la enzima interactuando mediante puentes de hidrógeno con varios residuos.

En el modelo obtenido para AmyA (Fig. 16) se encuentran bien definidos los tres dominios característicos de  $\alpha$ -amilasas. En el dominio A, el cual es el más conservado, se modelan las 8 láminas  $\beta$  y 7  $\alpha$  hélices del barril, y aunque en las asas que salen de la primera y cuarta lámina  $\beta$  se forma una prolongación formada por dos láminas que se orientan hacia fuera de la estructura, la localización y orientación de los residuos catalíticos es idéntica con respecto a la estructura molde. Dentro de la estructura el dominio B se forma por pequeños segmentos de  $\alpha$  hélices y grandes asas localizadas entre los residuos Val 125 y Ser 193. Por otra parte el dominio C se constituye por varias láminas  $\beta$  formadas a partir del residuo Asp 409. El sustrato se une en una hendidura en forma de “V” localizada entre los dominios A y B.

Sobre este modelo y haciendo uso del programa DeepView/Swiss-PdbViewer, se identificaron los residuos localizados a una distancia de 4 Å alrededor de la acarbosa modificada, poniendo especial interés en los residuos situados alrededor de los subsitios +1, +2 y +3 (Anexo I), los cuales representan el sitio de unión de la molécula aceptora. Dentro de los residuos identificados se encuentran los aminoácidos a mutagenizar His222 y Val259; el primero se localiza a una distancia de  $\approx 4.4$  Å del subsitio +3. En la amilasa de *A. oryzae*, este residuo interactúa mediante puentes de hidrógeno con el sustrato localizado en el subsitio +1, además es uno de los ocho

ligantes que coordina al calcio unido entre la interfase de los dominios A y B (Boel *et al.*, 1990., Brzozowski *et al.* 1997); mientras que el residuo Val 259 orienta su cadena lateral hacia fuera de la estructura separándolo 7.64 Å del subsitio +1.

Nuestra experiencia previa sugiere que la introducción de residuos aromáticos en posiciones cercanas al sitio de unión del sustrato altera la afinidad de los subsitios involucrados en la unión del aceptor (Nakamura *et al.* 1994., Saab *et al.*, 1999., Rivera *et al.*, 2003) modificando así el perfil de productos a través del aumento en la actividad transglucosídica, por lo que la ubicación y mutagénesis de residuos aromáticos en AmyA que interactúen con el sustrato en los subsitios de unión a la molécula aceptor, podría favorecer un aumento en la actividad alcoholítica presente en la enzima. Dentro de los aromáticos cercanos a este sitio, se encuentra el aminoácido Phe 179, localizado a  $\approx 5.6$  Å sobre el sitio de corte de la acarbosa; la peculiaridad de este residuo radica en la presencia de otros dos aromáticos junto a él, Trp 177 y Tyr 178, residuos que aunque en el modelo se encuentran alejados de la acarbosa podrían formar parte de un mismo subsitio. Debido a que estos residuos se localizan dentro del dominio B, el cual es un dominio muy variable dentro de las amilasas, resulta complejo establecer su correspondencia con residuos que se han identificado como constituyentes de subsitios en otras  $\alpha$ -amilasas, sin embargo, el cambio de residuos no polares voluminosos hacia un residuo de menor tamaño minimizaría la interacción del posible subsitio con aceptores glicosilo lo cual podría favorecer la entrada de solvente.

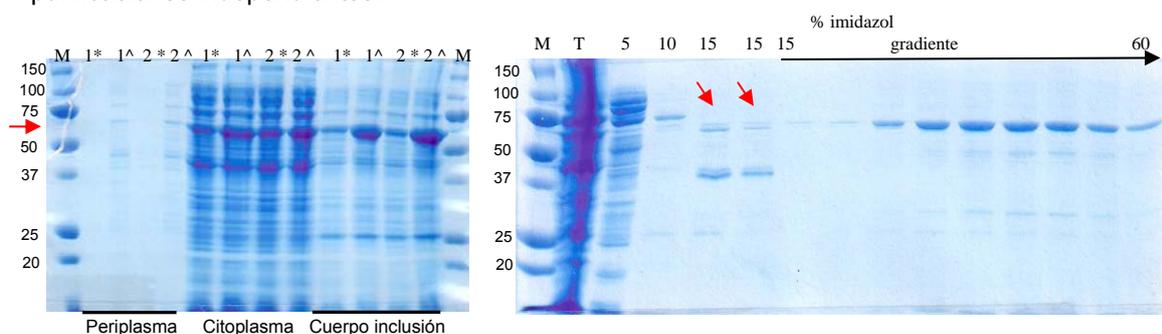


**Figura 16.** (a) Estructura de la  $\alpha$ -amilasa AmyA de *Thermotoga maritima* modelada a partir de la  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae* (7TAA) con el hexasacárido modificado del inhibidor acarbosa (ABC) unido a ella (magenta). Los residuos a mutagenizar Trp177, Tyr178, Phe179, His222 y Val259 se señalan en rojo, mientras que los residuos catalíticos Asp218 y Glu258 se señalan en azul. Los residuos aromáticos se localizan en el dominio B (verde), mientras que los residuos catalíticos, H222 y V259 se localizan en el dominio A (gris); el dominio C se representa en azul. (b) Interacción de residuos a mutagenizar y catalíticos con los diferentes componentes de la acarbosa. Los residuos catalíticos se localizan cerca del enlace localizado entre los subsitios -1 y +1.

## EXPRESION Y PURIFICACION DE LAS ENZIMAS

Aunque el nivel de expresión de enzimas amilolíticas en *Thermotoga maritima* es extremadamente bajo (Schumann *et al.*, 1991), la AmyA se ha logrado clonar y expresar satisfactoriamente en células de *E. coli* obteniendo cantidades de proteína de 6.6 mg cuando se parte de 15 litros de medio de cultivo (Lieb *et al.*, 1997). Nosotros expresamos esta proteína empleando células de *E. coli* ER, las cuales expresan la polimerasa del bacteriófago T7, obteniendo altos niveles de expresión para todas las enzimas que se encuentren clonadas en un vector bajo el control del promotor T7, sin embargo la poca cantidad de proteína en la fracción periplásmica (Fig.16a) nos obligó a realizar la purificación a partir de extracto celular total.

Durante el proceso de purificación empleando una columna de afinidad de  $Ni^{2+}$ , la mayor parte de enzima activa (enzima procesada) se eluye con bajas concentraciones de imidazol (10% y 15%), copurificándose con grandes cantidades de enzima sin procesar así como de productos de degradación, los cuales se trataron de separar sin éxito mediante una segunda columna (intercambio aniónico o permeación en gel). Se intentó obtener una mayor cantidad de enzima procesada al hacer la purificación partiendo de mayores volúmenes de cultivo (6 litros de medio), sin embargo, aunque la cantidad de proteína expresada aumentó considerablemente, la cantidad de proteína activa disminuyó, aparentemente debido a la saturación del sistema de procesamiento de la enzima. De manera que sólo se lograron purificar parcialmente a las diversas variantes de AmyA aunque con un rendimiento muy bajo de proteína activa (Fig. 16b), condición que resultó ser un factor limitante para la realización ensayos posteriores, los cuales se efectuaron a partir de purificaciones independientes.



**Figura 16.** (a) gel desnaturalizante de acrilamida al 10% donde se muestra la expresión de dos colonias independientes (cada colonia esta representada como 1 y 2) de la  $\alpha$ -amilasa AmyA silvestre en citoplasma y periplasma inducidas 4 (\*) y 18 (^) horas con IPTG 0.25 mM. Aunque la expresión de amilasa en el citoplasma es elevada, la mitad se precipita formando parte de cuerpos de inclusión, mientras que una mínima cantidad de la proteína soluble es secretada al espacio periplásmico. (b) Fracciones obtenidas durante el proceso de purificación del extracto total de la AmyA silvestre mediante cromatografía de afinidad. La proteína activa (flecha roja) se eluye junto con una gran cantidad de proteína sin procesar y productos de degradación cuando la concentración de imidazol es del 15%, después de iniciar un gradiente de imidazol hasta un 60% la elución de proteína no procesada (no activa) se incrementa. Los carriles 2, 3 y 4 representan el extracto total (T) así como la fracción colectada después de aplicar 5% y 10% de imidazol a la columna, respectivamente. En ambos gels la proteína se localiza entre los 50 y 75 kD.

Sin duda los resultados anteriores muestran que la elevada expresión de las enzimas hace que se sobrepase la capacidad de la maquinaria de secreción celular de *E. coli* ER, provocando la acumulación de una gran cantidad de enzima sin procesar en cuerpos de inclusión y citoplasma, mientras que sólo una pequeña fracción se transporta hacia el periplasma de la célula. Para favorecer la producción de proteína activa es necesario disminuir los niveles de expresión de las enzimas, ya sea disminuyendo la cantidad de inductor o cambiando el promotor por uno más débil; es deseable también sustituir el péptido señal nativo de *T. maritima* por péptidos optimizados para sistemas de secreción de *E. coli*.

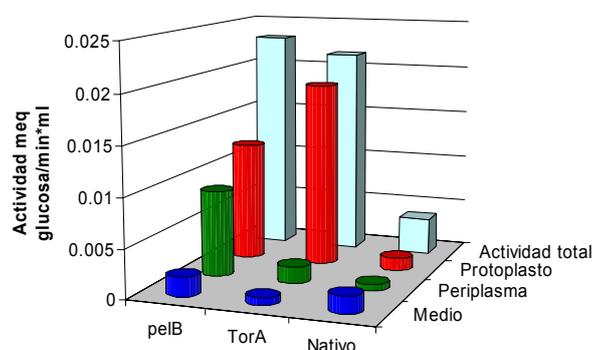
### **EXPRESION DE PROTEINAS CON PeIB Y TorA**

Es sabido que en *E. coli* mas del 90% de las proteínas secretadas se translocan a través de la membrana interna mediante un poro SecYEG; las proteínas que atraviesan este poro son llevadas por dos vías distintas, el sistema Sec o la vía de reconocimiento de partícula señal (SRP). La diferencia entre ambas radica en que en la primera, el transporte de la pre-proteína es post-traducciona, es decir el polipéptido se debe de mantener desplegado o parcialmente plegado antes de insertarse en el poro; mientras que en la vía SRP, al ser un transporte co-traducciona, la síntesis de la proteína es suspendida hasta que el ribosoma se encuentra en contacto con el poro de secreción (Georgiou G., Segatori L., 2005., Schierle *et al.*, 2003). Otra forma de exportar proteínas es por el sistema dependiente de TAT; esta translocación involucra el reconocimiento del sustrato por un complejo TatBC el cual forma un poro con un diámetro de 70 Å o menos dentro de la membrana que transporta proteínas que han completado su plegamiento dentro del citoplasma (Berks *et al.*, 2000).

Con el fin de poder incrementar la cantidad de proteína procesada y facilitar su purificación directamente de la fracción periplásmica evitando su contaminación con productos de degradación o enzima no activa, se investigó el efecto generado sobre la cantidad de proteína activa presente en la célula por el reemplazo del péptido señal nativo de AmyA por los péptidos nativos de *E. coli*, PeIB el cual sigue la vía de secreción Sec y el péptido TorA cuya vía de secreción es a través del complejo TatBC. Debido a que la determinación de proteína total en las fracciones citosólica y periplásmica de la célula no necesariamente revela la cantidad de proteína activa, se decidió identificar la presencia de enzima procesada midiendo la actividad observada (expresada en meq de glucosa/min\*ml) en extractos de estos compartimientos celulares así como de medio de cultivo cuando se colocan en presencia de almidón como sustrato.

Aunque se indujo el mismo nivel de expresión para la enzima silvestre con los tres diferentes péptidos, la actividad total observada en cada caso varía (Fig. 17). Destaca el hecho, que en la enzima con el péptido señal nativo se observa muy poca actividad a diferencia de lo que ocurre con

la proteína expresada con PelB y TorA; seguramente la expresión de esta enzima alcanza los niveles de TorA y PelB, sin embargo la mayor parte de la enzima expresada se precipita formando los grandes cuerpos de inclusión observados durante el proceso de purificación, dejando una mínima fracción soluble, la cual contiene a la enzima activa junto con otras fracciones no activas. Se puede observar que al menos el 50% de la enzima activa se secreta a la fracción periplásmica saliendo en su mayor parte al medio extracelular, dato que coincide con el hecho que se puede acceder al menos al 85% de la actividad de AmyA en la superficie de las células de *T. maritima* intactas (Schumann *et al.*, 1991). En cambio, el reemplazo del péptido señal nativo de AmyA por PelB y TorA aumenta en un orden de magnitud la cantidad de proteína activa, lo cual se refleja en la prácticamente nula formación de cuerpos de inclusión, hecho que motiva a pensar que estos péptidos favorecen el procesamiento del propéptido y por ende reducen su susceptibilidad a proteólisis.



	pelB	TorA	Nativo
■ Medio	0.002013145	0.000768973	0.001787562
■ Periplasma	0.008817579	0.00168311	0.000668858
■ Protoplasto	0.012243459	0.019018242	0.00129807
■ Actividad total	0.023074184	0.021470325	0.00375449

**Figura 17.** Actividad vista para la enzima AmyA nativa cuando su péptido señal es reemplazado por PelB y TorA. Cuando se efectúa el reemplazo del péptido señal nativo de la enzima, la actividad observada se incrementa en un orden de magnitud, aunque la mayor parte de ésta se conserva dentro de la fracción citoplásmica. La actividad se expresa como meq dextrosa/min\*ml.

Cuando el péptido señal de AmyA empleado es TorA, se observa una gran cantidad de enzima activa dentro del citoplasma, incluso mayor a la observada utilizando el péptido PelB; sin embargo, su transporte hacia periplasma es muy bajo, posiblemente debido a que el tiempo requerido para que las proteínas pasen a través del poro Tat es mucho mayor a lo requerido por el sistema Sec o a que durante el plegamiento de la enzima en el citoplasma el péptido señal quedase oculto evitando ser reconocido por el sistema de secreción celular.

Por otra parte, cuando la expresión se realiza con PelB, el 47 % de la enzima activa se dirige hacia periplasma en donde la mayor parte es retenida, y al igual que para la enzima nativa, se observa la

liberación de una pequeña fracción al medio (8%), cantidad que es equivalente a la liberada por la AmyA silvestre. Debido a que esta construcción presentó la mayor actividad total se decidió emplearla para facilitar la purificación de la enzima silvestre así como de las mutantes más alcoholíticas y reforzar los resultados obtenidos con los diferentes ensayos realizados; y aunque la detección de actividad favorece una purificación de enzima a nivel de periplasma, el hecho de que también se observe actividad casi equiparable en citoplasma, nos motivó a realizar las purificaciones a partir de extracto celular total.

Aunque la producción de enzima activa mejoró por un orden de magnitud para la enzima silvestre cuando se reemplazó el péptido nativo por PelB y TorA, el hecho de observar actividad en citoplasma cuando se emplean sistemas de secreción que obligan a tener al polipéptido desplegado, como en el caso de PelB y del péptido nativo de AmyA, habla de la posibilidad de que la enzima pueda plegarse en citoplasma independientemente del péptido señal que exprese; péptido que aunque no afecta el plegamiento, sí favorece el paso de enzima que aun se mantiene desplegada por el sistema de secreción.

## **ACTIVIDAD ESPECIFICA Y PARAMETROS CATALITICOS DE LAS ENZIMAS SILVESTRE Y MUTANTES**

Una vez purificadas la enzima silvestre y las siete mutantes, se determinaron sus parámetros catalíticos al medir la formación de azúcares reductores empleando almidón como sustrato.

A excepción de la mutante V259W en donde no se observó la formación de azúcares reductores, todas las enzimas presentaron un comportamiento tipo Michaelis-Menten, sin embargo la determinación de los parámetros catalíticos  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_m$ , se imposibilitó debido al error que se tiene en la cuantificación de enzima activa, pues la concentración de proteína cuantificada por el método de Bradford no sólo representa a la enzima activa, sino también la proteína no procesada (inactiva) así como algunos productos de degradación minoritarios (Tabla 9). Este error en el cálculo se ve reflejado cuando se compara la actividad específica obtenida para algunas enzimas expresadas con el péptido señal PelB contra las enzimas expresadas con el péptido señal nativo de AmyA, en donde el valor obtenido para estas últimas difiere, aunque no en ordenes de magnitud (con excepción de la mutante H222E-6his), al obtenido para las enzimas expresadas con PelB, las cuales a pesar de co-purificarse con otros productos presentan una fracción activa más enriquecida. Pese a esto, las tendencias observadas reflejan que a excepción de la enzima H222E en donde es difícil precisar con base en estos resultados su comportamiento, el resto de las mutantes disminuyeron su actividad específica con respecto a la enzima silvestre, destacándose el caso de las mutaciones en residuos aromáticos en donde la pérdida de actividad fue casi de la

mitad de la enzima silvestre. Por otro lado, la afinidad hacia el almidón se mantuvo constante para las mutantes del residuo H222, mientras que disminuyó en la mutante F179V, y aumentó para el caso de las mutantes W177V y Y178V. Al igual que para la mayor parte de las mutantes, en la enzima silvestre expresada con 6-His no se observó un efecto significativo en la actividad específica con respecto al valor obtenido para la enzima nativa (sin la etiqueta en el extremo carboxilo) aunque existe una variación en la  $K_m$  que no es significativa.

**Tabla 9.-** Actividad específica y  $K_m$  observados en la enzima Wt y mutantes expresadas con 6-His y PelB empleando almidón como sustrato.

	<b>Act. Especifica</b> <b>(<math>\mu</math>ED/mg*min)</b>	<b><math>K_m</math></b> <b>(mg almidón/ml)</b>
<b>Wt</b>	1705.5 $\pm$ 95.41	1.63 $\pm$ 0.28
<b>Wt-6His</b>	1747.7 $\pm$ 142.33	2.90 $\pm$ 0.17
	1358.5* $\pm$ 48.80	1.49* $\pm$ 0.62
<b>W177V-6His</b>	981.59 $\pm$ 86.5	0.633 $\pm$ 0.08
<b>Y178V-6His</b>	730.68 $\pm$ 44.32	0.75 $\pm$ 0.16
<b>F179V-6His</b>	778.64 $\pm$ 288	9.04 $\pm$ 5.84
<b>H222D-6His</b>	512.08 $\pm$ 13.59	1.75 $\pm$ 0.14
	247.96* $\pm$ 14.15	1.17* $\pm$ 0.22
<b>H222E-6His</b>	71.655 $\pm$ 5.35	2.37 $\pm$ 0.50
	11423.1* $\pm$ 63.36	1.51* $\pm$ 0.21
<b>H222Q-6His</b>	1120.9 $\pm$ 78	1.10 $\pm$ 0.26
	2835.8* $\pm$ 105.75	1.67* $\pm$ 0.19
<b>V259W-6His</b>	=====	=====

\* Enzimas expresadas con el péptido señal PelB.

## PERFIL DE PRODUCTOS CON DIFERENTES SUSTRATOS

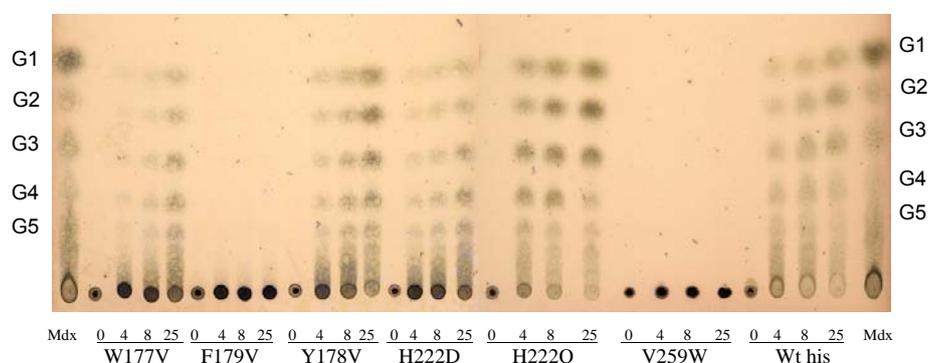
### a) Hidrólisis de almidón 10 mg/ml

Con el fin de determinar si las mutaciones introducidas en la AmyA de *T. maritima* afectaron el perfil de hidrólisis de la enzima, se incubó a 85°C una suspensión de almidón soluble (1%) con las distintas enzimas durante varios lapsos de tiempo, determinando los productos de hidrólisis mediante cromatografía en capa fina (TLC).

Como ya se había reportado, para la enzima silvestre (Lieb *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, inv. en proceso) los productos principales de hidrólisis de almidón durante tiempos largos de incubación (48 horas) son glucosa, maltosa, aunque también se generan en menor proporción maltotriosa, maltotetraosa así como diversos productos de mayor tamaño (Fig. 18). Salvo las mutantes F179V y V259W, este perfil de productos se conserva en el resto de las enzimas, y aunque la capacidad hidrolítica de estas enzimas no se perdió, si se puede apreciar que existe una diferencia en la velocidad de hidrólisis de almidón para cada una de ellas, sin embargo determinar si en verdad

existe un aumento real en esta propiedad implicaría realizar una cuantificación de estos productos una vez que se haya alcanzado el equilibrio de la reacción.

Es destacable la drástica disminución de la capacidad hidrolítica de la mutante F179V (Fig. 18), hecho que se manifiesta físicamente por la pérdida de viscosidad en la suspensión de almidón sin una disminución en su turbidez. Esta disminución de actividad hidrolítica genera una baja y muy lenta producción de grandes productos de hidrólisis de almidón, comportamiento que podría ser explicado debido a la pérdida de afinidad que presenta la enzima por su sustrato, reflejado (aunque con un valor impreciso) por un aumento en su  $K_m$  con respecto al resto de las mutantes y a la enzima silvestre (Tabla 9).



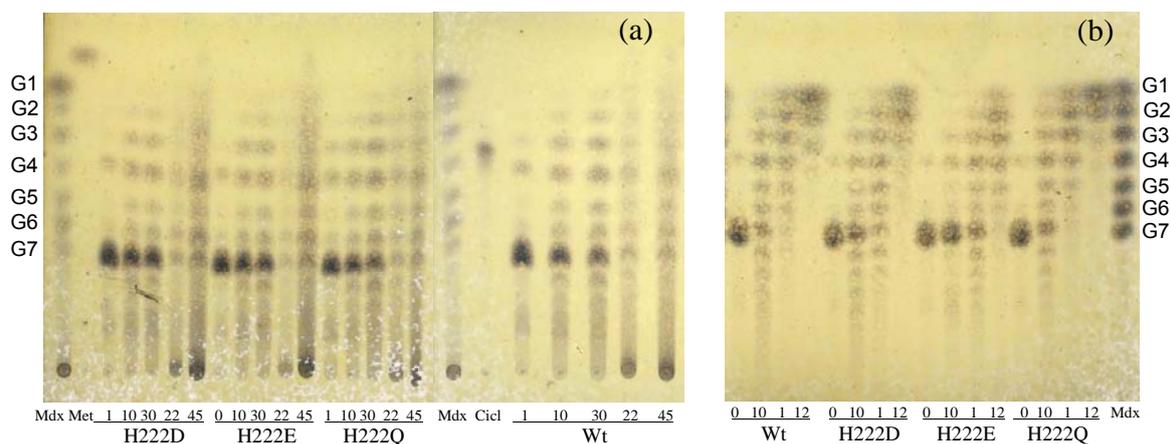
**Figura 18.** Cromatografía en capa fina (TLC) donde se muestran los diversos productos de hidrólisis de almidón 1% con 4 U/ml de las diferentes variantes: La enzima silvestre (Wt) y mutantes (W177V, Y178V, F179V, H222D, H222E, V259W) incubadas 0, 4, 8 y 25 horas a 85°C. Como marcador molecular se empleó 1  $\mu$ l de una mezcla de maltodextrinas (mdx) constituidas por unidades de glucosa que van de G1 a G7 a una concentración de 10 g/l cada una.

Debido a que la mutante V259W se logró expresar y purificar obteniéndose en cantidades similares al resto de las enzimas la pérdida total de la actividad hidrolítica y transglicosídica con todos los sustratos ensayados observada en esta mutante no se puede atribuir a un problema de plegamiento, posiblemente la introducción de un residuo tan voluminoso en una posición contigua al E258 catalítico podría alterar su posición dentro del sitio de corte del sustrato dificultando su hidrólisis o dependiendo de la posición real del residuo, éste podría propiciar choques estéricos que impidan que el sustrato se acomode correctamente en el sitio activo.

#### **b) Transglicosidación empleando G7 al 2%**

Uno de los experimentos orientados a determinar si existe un cambio en la capacidad transglicosídica de las mutantes se basa en emplear maltoheptaosa (G7) como sustrato, ya que si en las enzimas se favorece la capacidad transglicosídica se debe de observar un aumento en la formación de oligosacáridos mayores a G7 en tiempos muy cortos de incubación comparado con la enzima silvestre.

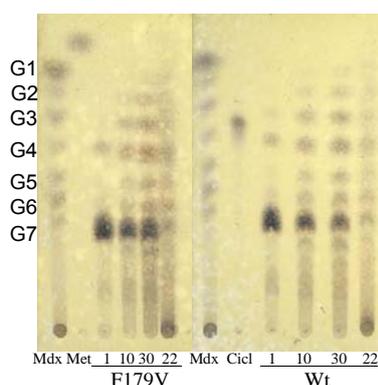
Después de incubar a las diferentes enzimas con G7 se observa que, para todos los casos (exceptuando la mutante V259W), durante tiempos de incubación cortos (Fig. 19a) se forman diversos productos resultado de la transglicosidación de G7, como G8 y otros de mayor peso, así mismo aunque en menor proporción se observa la formación de productos de hidrólisis que van de G2 a G5. Conforme el tiempo de incubación aumenta (Fig. 19b) la cantidad de G7 de las muestras disminuye y los productos transferidos se hidrolizan obteniéndose una mezcla de maltodextrinas que van desde G1 a G8 y mayores, las cuales se transforman de forma mayoritaria a G1 y G2 conforme el equilibrio de la reacción se va alcanzando. Sin embargo la cantidad de glucosa generada por las mutantes H222D y H222E después de 12 horas de incubación se ve disminuida con respecto a lo observado para la enzima silvestre y la mutante H222Q; aunque para el caso de la mutante H222E se tendría que esperar a que la reacción produzca de forma mayoritaria G1 y G2 para determinar si realmente se generó una disminución en la cantidad de glucosa y maltosa formada (Fig. 19b).



**Figura 19.** Productos de transglicosidación e hidrólisis de maltoheptaosa al 2% (G7) con las diferentes enzimas. Para observar las primeras etapas de la reacción se efectuaron los ensayos con 2 U/ml de todas las mutantes generadas, en la figura (a) se muestran los productos de hidrólisis/transglicosidación observado por las mutantes H222D, H222E y H222Q junto con la enzima silvestre después de incubar la mezcla a 85°C durante 1, 10, 30 minutos y 22, 45 horas. (b) Los productos obtenidos en tiempos largos y al equilibrio se ejemplifican con las reacciones efectuadas con 4 U/ml de las mutantes H222D, H222E y H222Q y enzima silvestre después de un periodo de incubación de 0, 10 minutos, 1 y 12 horas a 85°C. Para ambos casos los marcadores utilizados fueron 1 µl de una mezcla de maltodextrinas (mdx) constituidas por unidades de glucosa que van de G1 a G7 a una concentración de 15 mg/ml cada una; 0.5 µl de ciclodextrinas 10mg/ml (Cicl), y metilglucósido 10 mg/ml (Met).

Aunque la capacidad transglicosídica y el perfil de productos de todas las enzimas se mantiene, en el caso de la mutante H222E existe un alentamiento en la velocidad de hidrólisis por lo que se observan varias maltodextrinas que van de G1 a G5 después de 12 horas de incubación, tiempo en el que la reacción efectuada por la enzima silvestre y las mutantes H222D y H222Q ya ha alcanzado el equilibrio. (Fig. 19b).

Es de llamar la atención que a diferencia de lo ocurrido con almidón, la mutante F179V si presentó actividad en presencia de G7 como sustrato, generando el mismo perfil de productos que el resto de las enzimas (Fig. 20). Es evidente que el cambio de este residuo afecta la afinidad de la enzima hacia sustratos de mayor tamaño como lo es el almidón, sin que exista una pérdida aparente de la capacidad hidrolítica y transglucosídica de la enzima en presencia de sustratos pequeños.



**Figura 20.** Productos de transglucosidación e hidrólisis generados después de incubar durante 1, 10, 30 minutos y 22 horas a 85°C, 2 U/ml de la mutante F179V y la enzima silvestre con maltoheptaosa al 2% (G7). Para ambos casos los marcadores utilizados fueron 1  $\mu$ l de una mezcla de maltodextrinas (mdx) constituidas por unidades de glucosa que van de G1 a G7 a una concentración de 15 mg/ml cada una; 0.5  $\mu$ l de ciclodextrinas 10mg/ml (Cicl), y metilglucósido 10 mg/ml (Met).

### c) Transglucosidación (Alcoholólisis) empleando Almidón 6%-metanol 20%

Después de comprobar que la mayor parte de las enzimas siguen siendo activas con almidón como sustrato, se procedió a investigar si las mutaciones efectuadas en la enzima propician un cambio en el perfil de productos obtenidos durante las reacciones de alcoholólisis con respecto a lo observado para la enzima silvestre (Moreno *et al.*, comunicación personal). Para ello todas las enzimas activas con almidón se incubaron en una suspensión de almidón 6% - metanol 20% durante 0, 12 y 24 horas a 85°C. Los productos generados en las diferentes alícuotas se visualizaron mediante TLC y HPLC.

Los resultados muestran la formación de varios productos resultado del proceso de hidrólisis y transglucosidación del almidón, como G1, G2, G3 en todas las enzimas, y de forma minoritaria, productos que van de G4-G8 y mayores (Fig. 21). Como ya se había observado, después de 24 horas de incubación la enzima silvestre genera principalmente maltosa, glucosa y maltotriosa, perfil que es repetido por todas las mutantes, aunque en las enzimas W177V, la cantidad de G1, G2 y G3 producido es menor, mientras que para la mutante Y178V existe un aumento la producción de glucosa y maltosa.

Además de estos productos propios de la hidrólisis del almidón también se generaron productos de la transferencia de fragmentos hidrolizados al metanol presente en la reacción (Fig. 21). La enzima silvestre, como ya se ha observado genera diversos alquil glicósidos entre ellos metilglucósido y

metil maltósido (Moreno *et al.*, comunicación personal), nosotros observamos la generación de otros alquil glicósidos cuyo tiempo de retención en el HPLC los ubica entre los estándares G4, G5, y G6, además de otras fracciones que podrían corresponder a G8, G9, las cuales no podemos identificar debido a la carencia de estándares.

Aunque todas las mutantes presentan el mismo patrón de productos vistos para la enzima silvestre, estas también generan un alquil glicósido cuyo tiempo de retención en HPLC lo ubica entre los estándares G2 y G3.

Mientras que la producción de alquil glicósidos observado en la mutante Y178V es prácticamente igual a lo generado por la enzima silvestre después de 24 horas de incubación, en la mutante W177V se observa un decremento en la cantidad de productos de alcoholisis; y aunque la pérdida de la muestra W177V después de 48 horas de incubación impide determinar el comportamiento de la reacción, se podría esperar que para esta mutante, al igual que para la enzima Y178V, exista un aumento en la cantidad de alquil glicósidos conforme se incrementa el tiempo de incubación. Contrario al incremento visto por estas mutantes, en las enzimas con mutación en el residuo H222 (particularmente en la mutante H222Q) se observa un aumento considerable en la formación de algunos alquil glicósidos con respecto a la enzima silvestre. Basándonos en estos resultados decidimos llevar a cabo la cuantificación de la cantidad de alquil glicósidos generados por estas enzimas, además de investigar si la termoestabilidad de estas enzimas no se vio alterada con la mutación.

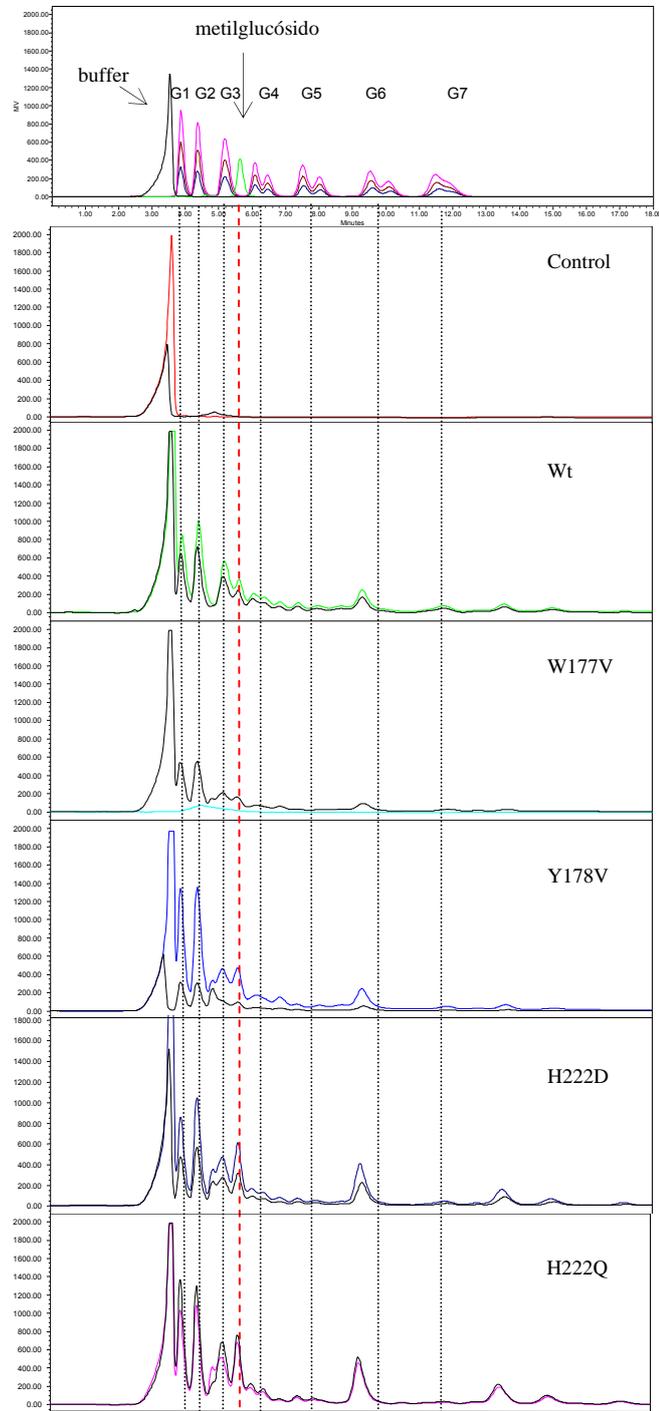
### **CUANTIFICACION DE METILGLUCOSIDO GENERADO POR LA ENZIMA SILVESTRE Y LAS MUTANTES H222D, H222E Y H222Q**

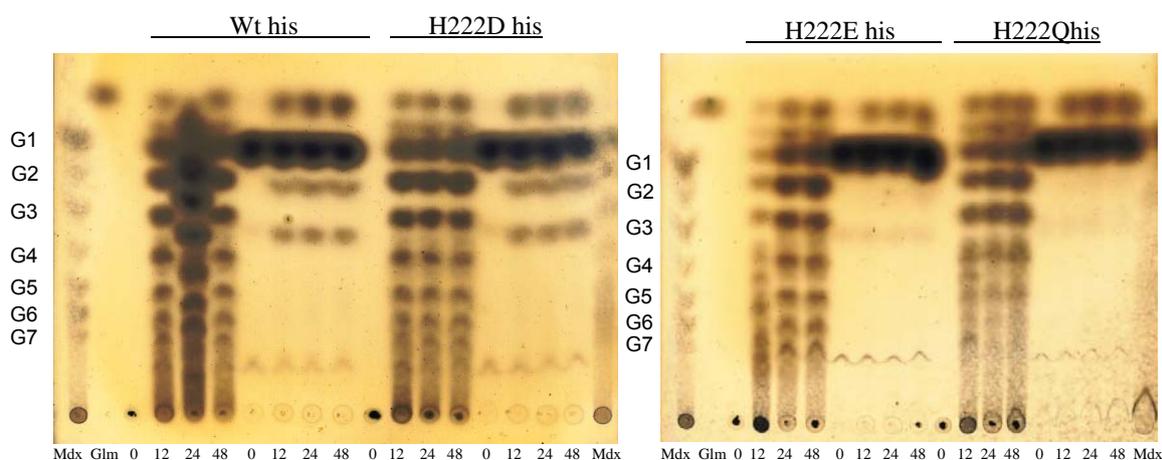
Debido a la carencia de estándares para los diferentes alquil glicósidos, su cuantificación se realizó de manera indirecta, después de reducir todos los alquil glicósidos generados en la reacción a metil glucósido y glucosa empleando una glucoamilasa de *A. niger*. De esta forma se cuantificó la cantidad total de metil glucósido en la muestra y se comparó con la obtenida entre las diferentes mutantes.

Los productos generados después de incubar la solución de almidón 6%-metanol 20% con las mutantes H222D, H222E y H222Q durante diferentes lapsos de tiempo (0, 12, 24 y 48 horas) se muestran en la figura 22. Como ya se había descrito, las mutantes conservan el perfil de productos generado por la hidrólisis de almidón observado en la enzima silvestre, generando varias maltodextrinas que van de G1 a G7, pero principalmente G1, G2 y G3 así como productos de mayor tamaño; en las placas también se aprecia para todas las enzimas la formación de metilglucósido así como de otros productos, posiblemente alquil glicósidos que migran entre las

diferentes maltodextrinas, dos de los cuales no son susceptibles de ser hidrolizados por glucoamilasa.

**Figura 21.** Perfil de productos determinados mediante HPLC de las reacciones de alcoholisis efectuadas por las diferentes mutantes y por la enzima silvestre después de 24 y 48 horas de incubación a 85°C con una suspensión de almidón 6%-metanol 20%. Además de las muestras tratadas con las mutantes, se inyectó una alícuota de la suspensión de almidón 6%-metanol 20% como control. En la parte superior se muestra el perfil de elución de los diferentes estándares utilizados; además del metilglucósido 10 mg/ml (verde), también se inyectó una mezcla de maltodextrinas constituidas por unidades de glucosa que van de G1 a G7 a una concentración de 15 mg/ml cada una (rosa) así como una muestra del solvente en el que se preparó la suspensión (negro). Para todos los casos las muestras incubadas 24 horas se muestran en negro, mientras que las incubadas 48 horas se muestran con diferentes colores para cada enzima.





**Figura 22.** Cromatografía en capa fina (TLC) donde se muestra el perfil de productos obtenidos después de incubar una suspensión de almidón 6%-metanol 20% con las enzima silvestre y las mutantes H222D, H222E y H222Q durante 0, 12, 24 y 48 horas de incubación (cuatro primeros carriles de cada muestra) y su posterior tratamiento con la glucoamilasa de *A. niger* (cuatro siguientes carriles de cada enzima).

Los marcadores utilizados fueron 1  $\mu$ l de una mezcla de maltodextrinas (mdx) constituidas por unidades de glucosa que van de G1 a G7 a una concentración de 10 mg/ml cada una, así como 1  $\mu$ l de metilglucósido 10 mg/ml (Met).

Al tratar estos productos con glucoamilasa se generó la reducción de los sacáridos producidos principalmente a glucosa y metilglucósido, aunque también se observa en la enzima silvestre y la mutante H222D la presencia de dos compuestos cuya migración cae entre los estándares G2 y G3, G3 y G4, los cuales no se observan como parte de los productos generados por la amilasa en presencia de almidón solamente.

La única mutante en la que existió un aumento en la actividad alcoholítica fue la enzima H222Q, la cual después de 24 horas de incubación supera en un 20% la cantidad de alquil glucósidos formados por la enzima silvestre (Tabla 10), de hecho, estos valores superan a los ya reportados para las enzimas sacarificantes fungales *A. niger* (2.32 mg/ml) y *A. oryzae* (0.76 mg/ml). Este comportamiento se explica por el cambio en la relación alcoholísis/hidrólisis generado en la mutante H222Q, es decir, a diferencia de la enzima silvestre en donde la relación alcoholísis/hidrólisis es de 0.8, en la mutante se favorecieron las reacciones de alcoholísis mientras que los eventos de hidrólisis disminuyeron. Además de incrementarse la cantidad de alquil glucósidos, también hubo un aumento en la velocidad de su formación, pues mientras que la enzima silvestre produce una cantidad de alquil glicósidos de 7.56 mg/ml en 24 horas, la mutante H222Q genera 9.07 mg/ml en el mismo lapso sin que exista ningún cambio en su estabilidad a 85°C.

Por otra parte, la mutante H222D produce prácticamente la misma cantidad de alquil glucósido que la enzima silvestre, mientras que en la enzima H222E la baja cantidad de eventos de hidrólisis comparado con lo observado para el resto de las enzimas aunado a la baja velocidad con la que se

lleva a cabo la reacción provocan que la cantidad de metil glucósidos generados disminuya a 4.95 mg/ml a pesar de que presenta una relación alcoholólisis/hidrólisis de 1.49. Puesto que esta mutante mostró un comportamiento similar a la enzima silvestre cuando se estudió la digestión de almidón, estos resultados sugieren que esta enzima es menos estable a la presencia de alcohol.

**Tabla 10.** Cantidad de metil glucósido (mg/ml) generado después incubar con glucoamilasa los productos de las enzimas incubadas 24 hrs. con almidón 6% - metanol 20%.

	<b>AmyA <i>Thermotoga marítima</i></b>			
	<b>Wt</b>	<b>H243D</b>	<b>H243E</b>	<b>H243Q</b>
<b>Metil glucósido (mg/ml)</b>	7.56	7.00	4.93	9.07
<b>Eventos de Alcoholólisis</b>	43.27	40	23.85	57
<b>Eventos de Hidrólisis</b>	54.09	50.61	16.01	26.74
<b>Relación Alcoholólisis/Hidrólisis</b>	0.80	0.79	1.49	2.29

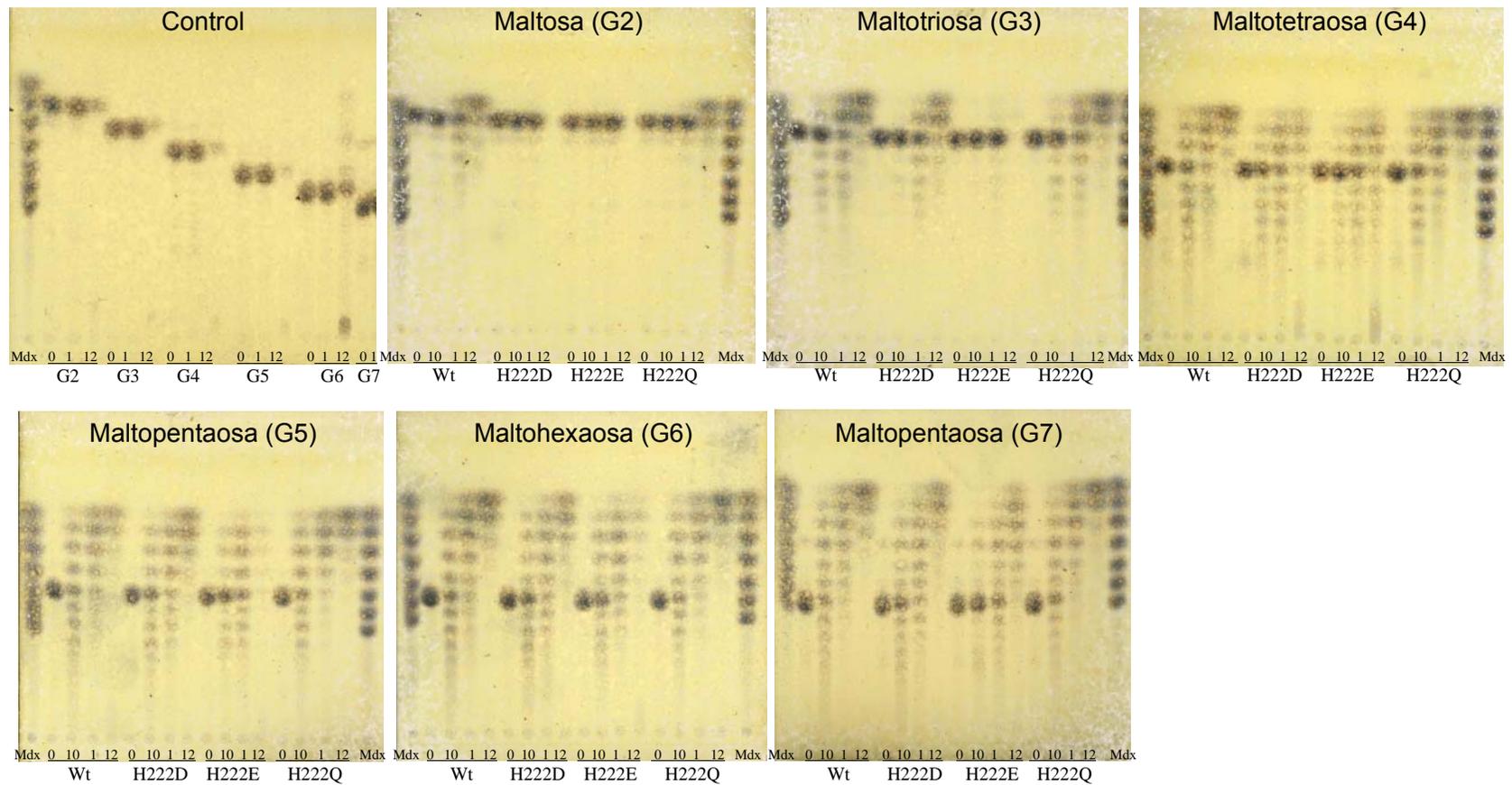
Empleando estas condiciones de reacción se obtuvo un aumento en la cantidad de alquil glucósidos generados por al menos una enzima mutante, sin embargo en resultados preliminares (Moreno *et al.*, comunicación personal) se ha observado en la enzima silvestre que un aumento en la concentración de solvente presente en la suspensión también genera un aumento en la cantidad de metil glucósido producido, Tratando de reproducir estos resultados con nuestras enzimas mutantes, repetimos las reacciones de alcoholólisis pero ahora empleando una suspensión de almidón 6% - metanol 30%, contrario a lo que esperábamos en todas las enzimas existió una disminución en la cantidad de alquil glucósidos generados, inclusive en la enzima silvestre donde se generaron 5.04 mg/ml de metil glucósido. Bajo estas condiciones la mutante H222Q disminuyó su producción a 4.53 mg/ml, mientras que la enzima H222D generó solamente 2.77 mg/ml, y por su parte la mutante H222E se inactivó, mostrando nuevamente la mayor susceptibilidad de esta mutante a la inactivación por la presencia del alcohol. Sin duda el aumento en la concentración de solvente lejos de favorecer el rendimiento de las reacciones de alcoholólisis, lo disminuyó al afectar la estabilidad de las diferentes variantes.

## **PERFIL DE PRODUCTOS EMPLEANDO MALTODEXTRINAS G2 A G7 2%**

Como experimento adicional se determinó el perfil de productos generados por estas enzimas en presencia de maltodextrinas constituidas de dos a siete unidades de glucosa (Fig. 23) con el fin de identificar cambios en afinidad de los diferentes subsitios debidos a los reemplazos de aminoácidos.

Aunque la enzima silvestre no es tan hábil al emplear sustratos pequeños (Lieb *et al.*, 1997), después de 1 hora de estar incubada con maltosa se empiezan a generar productos de transglucosilación los cuales son hidrolizados a glucosa después de 12 horas. Este comportamiento se acelera al incubar a la enzima con sustratos de longitud mayor, formándose cada vez más

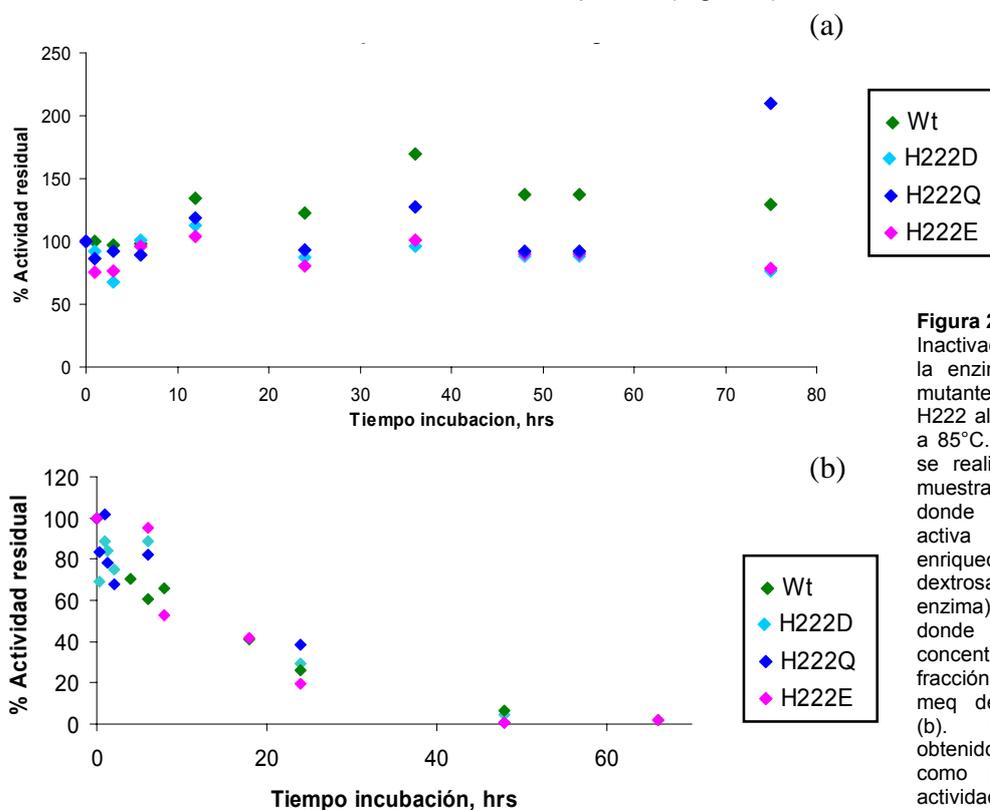
productos de transglicosidación que son hidrolizados hasta convertirse en glucosa y maltosa como productos mayoritarios, así como pequeñas cantidades de maltotriosa. Este perfil de productos también es compartido por las mutantes H222D, H222E y H222Q, sin embargo, aunque no se observa un cambio real en el perfil de productos generados por las mutantes H243D y H243E, si se evidencia la pérdida de afinidad de estas enzimas, particularmente la mutante H243E, por sustratos pequeños (G2, G3).



**Figura 23.** Perfil de productos generados por la enzima silvestre y mutantes H222D, H222E y H222Q al incubarlas por 0, 10 minutos, 1 y 12 horas a 85°C con diversas maltodextrinas (G2 a G7). Como control también se incubaron las mismas maltodextrinas sin enzima. En cada placa se aplicó como estándar 1  $\mu$ l de una mezcla de maltodextrinas (Mdx) constituidas por unidades de glucosa que van de G1 a G7 a una concentración de 10 mg/ml cada una, las cuales migran de G1 a G7 en forma descendente.

## TERMOESTABILIDAD

Si se piensa en la utilización industrial de estas enzimas, es importante que la termoestabilidad observada en la enzima silvestre no se pierda debido a las mutaciones introducidas, sobretudo en la enzima más alcoholífica. Para investigar esto se midió la actividad residual de la enzima silvestre y las mutantes H222D, H222E, y H222Q, después de incubarlas por diferentes lapsos de tiempo a 85°C. Los resultados muestran que no existe pérdida de actividad después de incubar a las mutantes y la enzima silvestre durante más de 70 horas a 85°C (actividad promedio de las enzimas 0.17 meq dextrosa/min\*ml), aunque es difícil hacer una evaluación a tiempos de incubación mayores de 30 horas, ya que se observa una variación en los datos, resultado de una aumento en la concentración de las enzimas debido a la evaporación del medio (Fig. 24a). En cambio, cuando se incuban muestras en donde la fracción activa no está tan enriquecida (0.01-0.02 meq dextrosa/min\*ml) (Fig. 24b) se produce una lenta inactivación de las enzimas, observándose un tiempo de vida media de 12 horas para la enzima silvestre, valor que es superado por las mutantes H222D y H222Q las cuales aumentaron este valor a 16 horas, mientras que la mutante H222E presentó una vida media de 11 horas. Estos resultados no reflejan un efecto de estabilización de las proteínas co-purificadas hacia la enzima activa (Fig. 24b) posiblemente en tiempos cortos de incubación existe una desnaturalización de los fragmentos de proteína co-purificada en la mezcla que facilitan la inactivación de la enzima, efecto que no es observado cuando se incuba una solución en donde la fracción activa esta mas enriquecida (Fig. 24a).



**Figura 24.** Inactivación térmica de la enzima silvestre y mutantes en el residuo H222 al ser incubadas a 85°C. La incubación se realizó empleando muestras de proteína donde la fracción activa esta más enriquecida (0.17 meq dextrosa/min\*ml de enzima) (a) y muestras donde hay una baja concentración de esta fracción (0.01-0.02 meq dextrosa/min\*ml) (b). Los valores obtenidos se expresan como porcentaje de actividad residual.

## DISCUSION

La  $\alpha$ -amilasa de AmyA conserva las cuatro regiones características de las  $\alpha$ -amilasas donde se localizan residuos importantes para la catálisis. La conservación de estas firmas nos permitieron hacer un alineamiento y un modelo a pesar de la baja similitud que guarda con otras enzimas de esta familia, incluso con  $\alpha$ -amilasas del mismo organismo. Aunque esta enzima proviene de una bacteria, los modelos generados por homología con amilasas bacterianas como *B. licheniformis* (1Bli) o *B. stearothermophilus* (1QHO) generaron estructuras con una baja definición de los tres dominios estructurales de las amilasas, contrario a los modelos generados a partir de la  $\alpha$ -amilasa fungal de *A. oryzae* (7TAA) y de la bacteria hipertermofila y halofita *Halothermothix orenii* (1WZA) (estructura no mostrada); posiblemente el carácter sacarificante de AmyA la haga poseer regiones mas cercanas a las amilasas sacarificantes fungales que a amilasas licuefactantes bacterianas.

Esta pobre similitud con otras enzimas podría verse reflejada indirectamente durante el procesamiento de la enzima, pues aunque la secuencia de AmyA posee la firma característica del sitio de corte de lipoproteínas bacterianas (Leu-Thr-Ser-Cys) (Lieb *et al.*, 1997) el reconocimiento y procesamiento del péptido es poco eficiente en sistemas de expresión heterólogos como *E. coli* ER generando la acumulación de una gran cantidad de enzima sin procesar que es digerida o precipitada formando cuerpos de inclusión en la bacteria. El cambio de péptido señal nativo de AmyA hacia los péptidos propios de *E. coli*, PelB y TorA, generó el aumento de un orden de magnitud en la cantidad de enzima activa a pesar de su pobre secreción al periplasma, sin embargo el hecho de observar actividad en citoplasma cuando se emplean sistemas de secreción que obligan a tener al polipéptido desplegado, como es el caso de PelB y del péptido nativo de AmyA, habla de la posibilidad de que la enzima pueda plegarse en citoplasma independientemente del péptido señal que exprese sin la necesidad de estar bajo las condiciones reductoras del periplasma; y aunque aparentemente el péptido señal no afecta el plegamiento de la proteína, este favorece el reconocimiento de la enzima que aun se mantiene desplegada por el sistema de secreción.

Después de investigar la capacidad hidrolítica y alcoholítica de las diferentes mutantes generadas, se encontró que la mutación del residuo V259 hacia Trp generó la pérdida de actividad hidrolítica y transglicosídica de la enzima en presencia de almidón y de maltoheptaosa como sustratos. Aunque en el modelo generado para la AmyA este residuo apunta hacia la parte externa de la estructura su cambio hacia un residuo tan voluminoso como Trp podría generar una modificación en la orientación del asa donde se encuentra este residuo, propiciando que otros residuos dejen de interactuar con el sustrato.

El resto de las mutantes presentan un comportamiento tipo Michaelis-Menten y a pesar de la imprecisión en la determinación del valor de actividad específica y parámetros catalíticos como *k<sub>cat</sub>*, se puede observar en todas las mutantes una tendencia hacia la disminución de actividad específica con respecto a la enzima silvestre, mientras que la afinidad hacia almidón como sustrato se mantiene igual para el caso de las mutantes en el residuo H222 y aumenta en las mutantes de residuos aromáticos.

El reemplazo de residuos aromáticos en el dominio B hacia Val alteró de distinta forma la unión del sustrato a la enzima; mientras que el reemplazo de los residuos W177 y Y178 favoreció la afinidad de la enzima hacia almidón con una ligera pérdida de actividad; en el caso de la mutante F179 la disminución de la actividad específica fue comparable con las otras mutantes en residuos aromáticos, sin embargo, el valor de la *K<sub>m</sub>* aumentó considerablemente con respecto a la enzima silvestre. Aunque en los tres casos el reemplazo de aromáticos hacia Val pudo generar la desestabilización de las interacciones de “stacking” formadas por los anillos de los residuos aromáticos con el sustrato, la posición F179 podría tener una interacción más directa con el sustrato, aunque la actividad hidrolítica y transglicosídica en presencia de maltoheptaosa no se vio afectada si se observa una pérdida de afinidad hacia almidón por parte de la enzima.

Por otra parte, la pérdida de la carga del residuo His222 cuando es mutado por Gln generó una pequeña disminución de los valores de afinidad y actividad de la enzima, mientras que el cambio hacia residuos hidrofílicos cargados negativamente (Asp, Glu) aunque no afecta los valores de *K<sub>m</sub>*, si genera una pérdida de actividad de casi la mitad en ambas enzimas, efecto que ya se había observado en la mutante H238D de *B. stearothermophilus* (residuo equivalente a H222 en AmyA de *T. maritima*), en la cual la actividad cae un 42% con respecto a la enzima nativa sin alterar el valor de *K<sub>m</sub>* (Vihinen *et al.*, 1990). Con base en la estructura de la  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae* 7TAA, en AmyA la unidad de glucosa localizada en el subsitio +1 interaccionaría mediante puentes de hidrógeno con el residuo His222 (H210 en *A. oryzae*) así como con moléculas de agua de la solución, por lo que el cambio en la actividad hidrolítica junto con la disminución de actividad en las mutantes cargadas negativamente, podría atribuirse a una alteración en el potencial electrostático del sitio activo sin que se altere la afinidad por el sustrato.

Aunque hubo una disminución en la actividad de estas mutantes existe una consistencia en el patrón de productos generado en presencia de almidón al 6% como sustrato con respecto a lo ya observado para la enzima silvestre (Moreno *et al.*, comunicación personal), generándose de forma mayoritaria glucosa, maltosa y en menor proporción maltotriosa, maltotetraosa así como diversos productos de tamaño mayor. En cambio para la mutante F179V sólo se observa en tiempos largos de reacción una ligera cantidad de productos de hidrólisis, resultado que puede explicarse por el

aumento en el valor de su  $K_m$  en presencia de almidón como sustrato. Cuando el sustrato ensayado es maltoheptaosa todas las enzimas incluyendo la mutante F179V, llevan a cabo reacciones de transglucosidación en tiempos cortos de incubación generando productos de mayor tamaño los cuales son hidrolizados para generar glucosa y maltosa como formas mayoritarias cuando la reacción ha alcanzado el equilibrio. Aunque estos resultados indican que aparentemente no hay alteración en el carácter sacarificante de las enzimas, la determinación cuantitativa del aumento o disminución en la actividad transglucosídica en cada una de ellas implicaría la cuantificación y comparación de cada producto.

Por otra parte, como ya se ha observado (Moreno *et al.*, comunicación personal), las reacciones de alcoholísis efectuadas por la enzima silvestre con almidón 6%-metanol 20%, generan metilglucósido y metil maltosido, además de los productos ya mencionados debido a la hidrólisis de almidón, los cuales también son formados, aunque en menor proporción, en reacciones de alcoholísis efectuadas por  $\alpha$ -amilasas sacarificantes fungales de *A. niger* (Santamaría *et al.*, 1990) y *A. oryzae* (Larsson *et al.*, 2005). Nuestras observaciones muestran la formación de otros alquil glicósidos cuyo tiempo de retención en el HPLC los ubica entre los estándares G4, G5, y G6, además de otras fracciones que podrían corresponder a G8, G9, las cuales no podemos identificar debido a la carencia de estándares. Además, en la enzima silvestre y en la mutante H222D, así como en H222E y H222Q aunque de forma minoritaria, también se genera un alquil glicósido cuyo tiempo de retención en HPLC lo ubica entre los estándares G2 y G3 el cual no es susceptible a hidrólisis por glucoamilasa.

Si bien el perfil de formación de alquil glicósidos en las mutantes se mantiene igual a lo observado con la enzima silvestre, la cantidad de alquil glicósidos generado en casi todas las mutantes disminuye o se mantiene constante en el mejor de los casos, con excepción de la mutante H222Q. Las mutantes W177V y Y178V siguen manteniendo el perfil de productos de alcoholísis vistos para la enzima silvestre sin que exista un aumento en su producción, hecho que podría reflejar la poca interacción de estos residuos con el sustrato. Por otro lado, la cuantificación de alquil glucósido en la mutantes del residuo H222 reflejan diversos rendimientos de producción; la mutante H222D presenta un comportamiento similar a la enzima silvestre tanto en eventos de hidrólisis como en alcoholísis, generando casi la misma cantidad de alquil glucósido. Por el contrario, la mutante H222Q supera en un 20% la cantidad de alquil glucósido generado con respecto a la enzima silvestre, resultado de una disminución de las reacciones de hidrólisis de casi el 50%. Y aunque podría esperarse que la reducción en los eventos de hidrólisis de la mutante H222E también generara un aumento en la cantidad de alquil glicósidos producidos, la pérdida de actividad en esta enzima propicia la generación de una baja cantidad de reacciones de alcoholísis, produciendo solo el 65% de alquil glucósido obtenido para la enzima silvestre.

En un intento de incrementar aún más la relación de alcoholólisis/hidrólisis se aumentó el contenido de alcohol en la mezcla de reacción a 30 %, sin embargo, el incremento en la concentración del solvente generó una disminución en la producción de alquil glucósidos en todas las mutantes incluso en la enzima silvestre, resultado de la posible inactivación de las enzimas bajo estas condiciones.

Como experimento final se determinó la estabilidad térmica de las mutantes en el residuo H222. En base a alineamientos de secuencias se sugiere que en AmyA el residuo H222 además de interactuar directamente con el sustrato también podría formar parte, junto con los residuos Asn 127 y Asp188, del sitio de unión a calcio (Lieb *et al.*, 1997). Debido a que en amilasas de *Aspergillus* este ligando se encuentra unido en la interfase de los dominios A y B, la modificación de algún residuo que lo coordine podría comprometer la estabilidad de la enzima, como ocurrió con la mutante H238D de *B. stearrowthermophilus*, en donde a diferencia de la enzima nativa la cual retiene el 80% de actividad después de 2 horas de incubación, la mutante se inactiva después de 20 minutos de incubación a 80 C (Vihinen *et al.*, 1990). Contrario a estos antecedentes, el cambio de la cadena lateral del residuo equivalente en AmyA no sólo no afectó la estabilidad térmica de las mutantes, las cuales permanecieron activas por mas de 60 horas, incluso después de reducir el efecto protector ejercido por otras proteínas en la mezcla de reacción, sino que las mutantes H222D y H222Q aparentemente presentaron un aumento en la vida media de cuatro horas con respecto a la enzima silvestre. Sin embargo es de destacar también que existe una diferencia en la dependencia de calcio entre estas dos enzimas. En el caso de *B. stearrowthermophilus*, la presencia de 10 mM  $Ca^{2+}$  ayuda a estabilizar a la proteína, mientras que en AmyA de *T. maritima*, una concentración mayor a 2 mM de iones  $Ca^{2+}$  parece tener un efecto inhibitorio de su actividad.

## CONCLUSIONES

El reconocimiento de las cuatro firmas de secuencias conservadas entre los miembros de la familia de las  $\alpha$ -amilasas nos permitió hacer un modelamiento estructural por homología de la  $\alpha$ -amilasa A de *Thermotoga maritima*. A través del modelo generado pudimos identificar residuos hacia los cuales dirigir la mutagénesis para estudiar su efecto en la hidrólisis de almidón, así como en reacciones de alcoholólisis.

Los resultados obtenidos muestran la inactivación de la enzima al mutagenizar el residuo V259 hacia Trp, mientras que el cambio de un residuo aromático hacia Val (F179V) lejos de favorecer las reacciones de transglicosilación generó una disminución en la afinidad de la enzima hacia almidón como sustrato, aunque esta actividad se conserva en presencia de sustratos de menor tamaño como maltoheptaosa.

Por otra parte, al igual que en la enzima silvestre, el perfil de productos obtenido por el resto de las mutantes (excepto F179V y V259W) en presencia de almidón genera glucosa y maltosa como productos mayoritarios una vez que la reacción ha alcanzado el equilibrio. Este patrón de productos no cambia cuando la reacción se lleva a cabo en presencia de metanol en donde además de generarse productos de hidrólisis se forman diversos alquil glicósidos, aunque para la mayor parte de las enzimas la cantidad generada es igual o menor al observado en la enzima silvestre.

Mientras que en la enzima silvestre los eventos hidrolíticos y alcoholíticos se mantienen casi a la par, en las mutantes H222E y H222Q existió un aumento en la afinidad de las enzimas hacia metanol en lugar de agua propiciando que los eventos de hidrólisis en estas mutantes disminuyeran un 50% o más con respecto al valor visto para la enzima silvestre mientras que los eventos de alcoholólisis prácticamente se duplicaran.

Aunque en estas dos mutantes existe un aumento en el número de eventos de hidrólisis, la mutante H222Q fue la única en donde este aumento se reflejó con una mayor producción de alquil glicósido superando en un 20% a la cantidad obtenida por la enzima silvestre sin que exista una aparente pérdida de actividad o estabilidad de la enzima por la mutación. En contraste, en el caso de la mutante H222E, aunque se logró invertir la relación de alcoholólisis/hidrólisis, su baja estabilidad ante alcoholes da como resultado una baja producción de alquil glicósidos.

## REFERENCIAS

1. Ballschmiter M., Fütterer O., Liebl W. 2006. Identification and characterization of a novel intracellular alkaline  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. Appl. Environm. Microbiol. 72(3):2206-2211.
2. Baltzer D. 1991. Alkylpolyglucosides, their physico-chemical properties and their uses. Tenside Surf. Det. 8:419-27.
3. Berks B. C., Sargent F., Palmer T. 2000. The Tat protein export pathway. Mol. Microbiol., 35:260-274.
4. Boel E., Brady L., Brzozowski A. M., Derewenda Z., Dodson G. G., Jensen V. J., Petersen S. B., Swift H., Thim L., Woldike H. F. 1990. Calcium binding in  $\alpha$ -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. Biochemistry 29:6244-6249.
5. Bragger J. M., Daniel R. M., Coolbear T., Morgan H. W. 1989. Very stable enzymes from extremely thermophilic archaeobacteria and eubacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:556-561.
6. Brown S., Kelly R. M. 1993. Characterization of amylolytic enzymes, having both  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. Appl. Environ. Microbiol. 59:2614-2621.
7. Brzozowski, A.M., Davies, G.J. 1997. Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. Biochemistry v36 pp.10837-10845 ,
8. Brzozowski A. M., Lawson D. M., Turkenburg J. P., Bisgaard-Frantzen H., Svendsen A., Borchert T. V., Dauter Z., Wilson K. S., Davies G. J. 2000. Structural analysis of a chimeric bacterial  $\alpha$ -amylase. High resolution analysis of native and ligand complexes. Biochemistry, 271: 23836-23841.
9. Chahid Z., Montet D., Pina M., Graille J. 1992. Effect of water activity on enzymatic synthesis of alkylglycosides. Biotechnol. Lett. 14:281-284.
10. Chung Y. C., Kobayashi T., Kanai H., Akiba T., Kudo T. 1995. Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archeon *Thermococcus profundus* DT5432. Appl. Environ. Microbiol. 61:1502-1506.
11. Constantino H. R., Brown S. H., Kelly R. M. 1990. Purification and characterization of an  $\alpha$ -glucosidase from the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115 °C. J. Bacteriol. 172:3654-3660.
12. Coutinho P. M., Henrissat B. 1999. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach, in Gilbert, H. J., Davies G., Henrissat B., Svensson B (Eds.). Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 3-12.
13. Davies G. J., Henrissat B. 1995. Structure and mechanisms of glycosyl hidrolase. Structure. 3:853-859.
14. Davies G. J., Wilson K. S., Henrissat B. 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosylhydrolases. Biochem. J., 321: 557-559.
15. Dickmanns A., Ballschmiter M., Liebl W., Ficner R. 2006. Structure of the novel  $\alpha$ -amylase AmyC from *Thermotoga maritima*. Acta Cryst. D62:262-270.
16. Drouet P., Zhang M., Legoy M. D. 1994. Enzymatic synthesis of alkyl  $\beta$ -D-xylosides by transxylosylation and reverse hydrolysis. Biotechnol. Bioeng. 43:1075-1080.

17. Fischer L., Bromann R., Kengen S. W. M., de Vos W. M., Wagner F. 1996. Catalytic potency of  $\beta$ -glucosidase from the extremophile *Pyrococcus furiosus* in glucoconjugate synthesis. *Biotechnol.* 14:88-91.
18. Fried B., Shelma J. 1986. Thin layer chromatography techniques and applications. 2a ed. Cap 17. Dekker Inc. N.Y. 287.
19. Georgiou G., Segatori L. 2005. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:538-545.
20. Guex, N. and Peitsch, M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723.
21. Hansson T., Andersson M., Wehtje E., Adlercreutz P. 2001. Influence of water activity on the competition between  $\beta$ -glycosidase-catalysed transglycosylation and hydrolysis in aqueous hexanol. *Enz. Microb. Technol.* 29:527-534.
22. Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280:309-316.
23. Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., 1994 CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
24. Holazo A., Shinoyama H., Kamiyama Y., Yasui T. 1992. Screening for  $\beta$ -mannosidases with transmannosidation capacity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 56:822-824.
25. Ismail A., Soultani S., Ghoul M. 1999a. Enzymatic-catalyzed synthesis of alkylglycosides in monophasic and biphasic systems: I. The transglycosylation reaction. *J. Biotech.*, 69:135-143.
26. Ismail A., Soultani S., Ghoul M. 1999b. Enzymatic-catalyzed synthesis of alkylglycosides in monophasic and biphasic systems: II. The reverse hydrolysis reaction. *J. Biotech.*, 69:145-149.
27. Janecek S. 1997.  $\alpha$  - Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog Biophys. Biol.*, 67(1):67-97.
28. Koch R., Spreinat A., Lemke K., Antranikian G. 1991. Purification and properties of a hyperthermoactive  $\alpha$ -amylase from the archaeobacterium *Pyrococcus woesei*. *Arch. Microbiol.* 155:572-578.
29. Kuriki, T., Kaneko H., Yanase M., Takata H., Shimada J., Handa S., Takada T., Uneyama H., Okada S. 1996. Controlling substrate preference and transglycosylation activity of neopollulanase by manipulating steric constraint and hydrophobicity in active center. *J. Biol. Chem.* 271:17321-17329.
30. Laderman K. A., Davis B. R., Krutzsch H. C. 1993. The purification and characterization of an extremely thermostable  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Chem.* 268:24394-24401.
31. Laroute V., Willemont R. 1992. Glucoside synthesis by glucoamylase or  $\beta$ -glucosidase in organic solvents. *Biotechnol. Lett.*, 14(3):169-174.
32. Larsson J., Svensson D., Adlercreutz P. 2005.  $\alpha$ -amylase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.* 37:84-87.
33. Liebl, W., Semplinger I., Ruile O. 1997. Properties and Gene Structure of the *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -amylase AmyA, a Putative Lipoprotein of a Hyperthermophilic Bacterium. *J. Bacteriol.* 179(3): 941-948.
34. Lim W. J., Park S. Y., An C. H., Lee J. Y., Hong S. Y., Shin E. C., Kim E. J., Kim J. O., Kim H., Yun H. D. 2003. Cloning and characterization of a thermostable intracellular  $\alpha$ -amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Research Microbiol.* 154:681-687.

35. Ljunger G., Adlercreutz P., Mattiasson B. 1994. Enzymatic synthesis of octil- $\beta$ -glucoside in octanol at controlled water activity. *Enzyme Microb, Technol.* 16:751-755.
36. Nakamura A., Haga K., Yamane K. 1994. Four aromatic residues in the active-center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus sp-1011*- Effects of the replacement on substrate-binding and cyclization characteristics. *Biochemistry.* 33:9929-9936.
37. Nielsen J. E., Borchet T. V. 2000. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Bioch. Bioph. Acta* 1543:253-274.
38. Mac Gregor E. A. 1988.  $\alpha$  - Amylase Structure and Activity, *J. Prot. Chemi.* 7(4): 399-415.
39. McCarter J. D., Withers S. G. 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4:885-892.
40. Matsubara S., 1961. Studies on taka-amylase A. VII. Transmaltosidation by taka-amylase A. *J. Biochem.* 49:226-231.
41. Matsumura S., Imai K., Yoshikawa S., Kawada K., Uchibori T. 1990. Surface activities, biodegradability and antimicrobial properties of n-alkyl glucosides, mannosides and galactosides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67:996-1001.
42. Mutua L. N., Akoh C. C. 1993. Synthesis of alkyl glycoside fatty acid esters in non-aqueous media by *Candida sp.* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70:43-46.
43. Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.Y., Singh, D., Mohan, R., 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31:135-152.
44. Park J. Y., Lee S. O., Lee T. H. 1999. Syntheses of 1-O-benzyl- $\alpha$ -glucoside and 1-O-benzyl- $\alpha$ -maltoside by transglycosylation of  $\alpha$ -amylase from soluble starch in aqueous solution. *Biotechnol. Letters.* 21:81-86.
45. Panintrarux C., Adachi S., Araki Y., Kimura Y., Matsuno R. 1995. Equilibrium yield of n-alkyl- $\beta$ -D-glucoside through condensation of glucose and n-alcohol by  $\beta$ -glucosidase in a biphasic system. *Enzyme Microb. Technol.* 17:32-40.
46. Papanikolaou S. 2001. Enzyme-Catalyzed synthesis of alkyl-B-glucosides in a water-alcohol two-phase system. *Bioresource Technol.* 77:157-161.
47. Peitsch, M. C. 1995. Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology* 13:658-660.
48. Saab G., del-Río G., Santamaría R. I., López-Munguía A. 1999. Introducing transglycosylation activity in a liquefying  $\alpha$ -amylase. *FEBS Letters*, 453:100-106.
49. Santamaría R. I., Del Río G., Saab G., Rodríguez M. E., Soberón X., López-Munguía A. 1999. Alcoholysis reactions from starch with  $\alpha$ -amylases. *FEBS Letters.* 452: 346-350.
50. Sarkar G., Sommer S. S. 1990. The "Megaprimer" Method of Site-Directed Mutagenesis. *BioTechniques.* 8(4):404-407.
51. Schierle C. F., Berkmen M., Huber D., Kumamoto C., Boyd D., Beckwith J. 2003. The DsbA signal sequence directs efficient cotranslational export of passenger proteins to the Escherichia coli periplasm via the signal recognition particle pathway. *J. Bacteriol.* 185:5706-5713.
52. Schmid R., Klötz V. 1990 Glycoside bond formation via anomeric O-alkylation; how many protective steps are required. *SYNLETT.* 168-170.
53. Schumann J., Wrba A., Jaenicke R., Stetter K. O. 1991. Topographical and enzymatic characterization of amylases from the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *FEBS Letters*, 282(1):122-126.

54. Schwede T., Kopp J, Guex N., Peitsch M. C. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*. 31:3381-3385.
55. Selisko B., Ulbrich R., Schellenberger A. 1990. Invertase-catalyzed reactions in alcoholic solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 35:1006-1010.
56. Shinoyama H., Kamiyama Y., Yasui T. 1988. Enzymatic synthesis of alkyl  $\beta$ -xylosides from xylobiose by application of the transxylosyl reaction of *Aspergillus niger*  $\beta$ -xylosidase. *Agric. Biol. Chem.* 52(9):2197-2202.
57. Stevenson D. E., Stanley R. A., Furneaux R. H. 1993. Optimization of alkyl  $\beta$ -D-galactopyranoside synthesis from lactose using commercially available  $\beta$ -galactosidases. *Biotechnol. Bioeng.* 42:657-666.
58. Stevenson D. E., Furneaux R. H. 1996. High-yield syntheses of ethyl and 2-fluoroethyl  $\beta$ -D-galactopyranosides using *Streptococcus thermophilus*  $\beta$ -galactosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 18 :513-518.
59. Stevenson D. E., Stanley R. A., Furneaux R. H. 1996. Oligosaccharide and alkyl- $\beta$ -D-galactopyranoside synthesis from lactose with *Caldocellum saccharolyticum*  $\beta$ -glycosidase. *Enzyme Microb. Technol.* 18:544-549.
60. Svasti J., Phongsak T., Sarnthima R. 2003. Transglucosylation of tertiary alcohols using cassava  $\beta$ -glucosidase. *Biochem. Biophys. Research Comm.* 305:470-475.
61. Svenson B. 1994. Protein engineering in the  $\alpha$  - Amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity and stability. *Plant. Mol. Biol.*, 25:141-157.
62. Rivera M. H., López-Munguía A., Soberón X., Saab G. 2003.  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. *Prot. Eng.* 16:505-514.
63. Rodríguez M., Gómez A., González F., Bárzana E., López-Murguía A. 1996. Selectivity of methyl-fructoside synthesis with  $\beta$ -fructofuranosidase. *App. Biochem. Biotechnol.* 59:167-175.
64. Rodríguez M., Gómez A., González F., Bárzana E., López-Murguía A. 1997. Stability of invertase in alcoholysis reactions with methanol. *J. Mol Catalysis B: Enzymatic*, 2:299-306.
65. Rüdiger A., Jorgensen P. L., Antranikian G. 1995. Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:567-575.
66. van der Maarel M., van der Veen B., Uitdehaag J. C. M., Leemhuis H., Dijkhuizen L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J Biotechnol.* 94:137-155.
67. Vic G., Hastings J.J., Crout D.H.G. 1996. Glycosidase catalysed synthesis of glycosides by an improved procedure for reverse hydrolysis: application to the chemioenzymatic synthesis of galactopyranosyl-(1-4)-O- $\alpha$ -galactopyranoside derivatives. *Tetrahedron*, 7:1973-1984.
68. Vulfson V. N., Pattel R., Beecher J.E., Andrews A. T., Law B. A. 1990. Glycosidases in organic solvents: I Alkyl  $\beta$ -glucosidase synthesis in water-organic two-phase system. *Enzyme Microb. Technol.* 12:950-954.
69. Vihinen M., Ollikka P., Niskanen J., Meyer P., Suominen I., Karp M., Holm L., Knowles J., Mäntsälä P. 1990. Site-directed mutagenesis of a thermostable  $\alpha$ -amilase from *Bacillus stearothermophilus*: putative role of three conserved residues. *J. Biochem.* 107: 267-272.
70. Zechel D. L., Withers S. G. 2000. Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.*, 33(1):11-18.

## ANEXO I

**Residuos del modelo generado para la  $\alpha$ -amilasa de *Thermotoga maritima* localizados a 4 -5 Å alrededor de la molécula de acarbosa**

Distancia calculada entre residuos separados por 4-5 Å de alguna subunidad del inhibidor acarbosa (resaltado), así como la distancia que guardan con respecto al resto de los componentes del inhibidor. Cada subunidad de la acarbosa se denomina como +3 a -3 de acuerdo al posible subsitio que ocupan dentro del modelo. La numeración de los residuos corresponde a la secuencia de la proteína madura (sin péptido señal).

Residuo	Número	Subsitios					
		+3	+2	+1	-1	-2	-3
<b>His</b>	86	17.81	14	10.2	7.29	<b>3.99</b>	2.63
<b>Tyr</b>	88	18.11	13.83	8.98	<b>4.8</b>	<b>4.75</b>	11.09
<b>His</b>	128	16.26	11.91	7.811	<b>5.18</b>	8.83	11.11
<b>Ile</b>	169	<b>5.28</b>	<b>5.73</b>	8.07	13.01	13.59	13.64
<b>Phe</b>	179	11.17	6.61	<b>5.6</b>	<b>5.37</b>	<b>4.84</b>	7.72
<b>Tyr</b>	184	16.19	12.08	11.33	8.15	<b>4.53</b>	2.93
<b>Asp</b>	218	14.63	12.58	6.26	<b>4.23</b>	8.53	12.91
<b>Ala</b>	219	12.58	9.15	<b>5.58</b>	<b>5.02</b>	9.73	13.29
<b>Lys</b>	221	<b>5.18</b>	<b>4.66</b>	<b>4.94</b>	9.09	17.04	15.09
<b>His</b>	222	<b>4.4</b>	5.93	<b>5.60</b>	7.67	14.64	13.07
<b>Glu</b>	258	9.66	7.37	<b>5</b>	<b>4.90</b>	11	13.7
<b>Phe</b>	260	<b>4.35</b>	<b>4.06</b>	6.05	9.71	12.87	12.83
<b>Ser</b>	261	<b>5.44</b>	8.53	10.59	11.47	17.73	20.18
<b>Gly</b>	262	<b>4.53</b>	9.1	11.59	14.22	18.46	20.63
<b>Tyr</b>	281	<b>5.17</b>	8.65	9.13	11.42	15.28	16.62
<b>His</b>	321	13.64	11.17	8.04	<b>4.32</b>	6.76	11.25
<b>Tyr</b>	322	12.24	8.29	<b>5.05</b>	<b>2.73</b>	6.36	8.61
<b>Lys</b>	323	14.93	12.04	9.21	8.6	<b>4.69</b>	<b>2.84</b>

## ANEXO II

### Determinación de la concentración de proteína mediante Bio-Rad

Este ensayo se basa en el método de Bradford el cual involucra la reacción de un colorante ácido, Azul Brillante de Coomassie G-250, con una solución de proteína (donde reacciona principalmente con residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina.) y la subsecuente medición del incremento en la absorción a 595 nm en un espectrofotómetro.

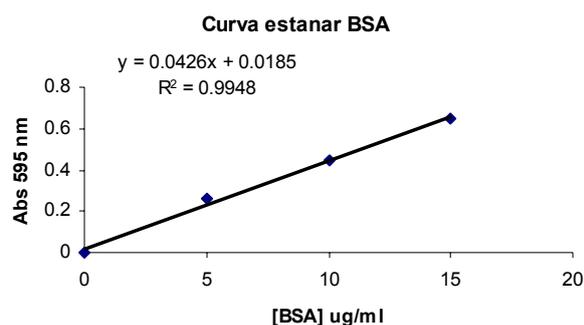
El método se basa en la observación de que el colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 presenta dos formas coloreadas, azul y rojo. El color rojo pasa a azul cuando el colorante se une a la proteína, por lo que el cambio diferencial de color es una respuesta a varias concentraciones de proteína. La formación del complejo colorante-proteína toma aproximadamente 2 minutos y permanece estable por 1 hora.

#### Curva estándar de BSA

Partiendo de una solución stock de albúmina sérica bovina (BSA) 10 mg/ml, se prepara una solución de BSA 1 µg/µl la cual servirá para preparar las diferentes concentraciones de BSA a emplearse en la curva estándar (el rango lineal de BSA es 1.2 a 10 µg/ml). Una vez preparadas las muestras se aforan a 800 µl con agua destilada y se lee su absorbancia a 595 nm (Tabla 1).

**Tabla 1.** Preparación de curva estándar de BSA

[BSA], ug/ml	Agua, µl	Bradford, µl
0	800	200
5	795	200
10	790	200
15	785	200
20	780	200



#### Muestras

Se toman dos alícuotas de las muestras purificadas, 50 y 100 µl, y se llevan a 800 µl con agua destilada. Es importante que la cantidad de proteína en la muestra purificada este dentro del rango de la curva estándar, de no ser así la muestra puede diluirse o variar las cantidades a emplear para caer dentro de los valores de la curva, ajustándose siempre el volumen final de la muestra a 800 µl con agua. Las soluciones de proteína son normalmente ensayadas por duplicado o triplicado.

Una vez preparadas los estándares para la curva estándar y las muestras, se les adiciona a cada una 200 µl de reactivo Protein Assay Dye Reagent Concntrate (Bio-Rad), se agitan en vortex y se dejan incubar a temperatura ambiente por un mínimo de 5 minutos para que se desarrolle el color, leyéndose la absorbancia a 595 mn. Como la absorbancia incrementa con el tiempo las muestras deben incubarse por no mas de 1 hora y se debe cuidar que el tiempo transcurrido entre la toma de lectura de cada muestra se consistente con el tiempo de adición del reactivo.

#### Cuantificación de proteína en muestras

Una vez hechas las lecturas, se relaciona la absorbancia obtenida a la concentración de BSA mediante la ecuación de la recta obtenida de la curva estándar, generando una concentración calculada de proteína (µl/ml). Para obtener la concentración real de proteína (µl/ml), este valor se

relaciona con el volumen final del ensayo (1 ml) y la cantidad de enzima empleada (50 ó 100  $\mu$ l), así como del factor de dilución de la muestra (Tabla 2).

**Tabla 2.** Preparación de muestras de proteína y cálculo de concentración

Muestra diluida 1:100 ( $\mu$ l)	Agua ( $\mu$ l)	Reactivo Bradford ( $\mu$ l)	Abs 595 nm	[calculada]* $\mu$ g/ml	[real]** $\mu$ g/ml	Concentración Promedio $\mu$ g/ml
50	750	200	0.06	0.9741784	19.4835681	19.5422535
100	700	200	0.102	1.9600939	19.600939	

\* Cálculo realizado con la ecuación de la recta obtenida de la curva estándar de BSA:

$$x = \frac{\text{Abs}595\text{nm} - b}{a}$$

\* La concentración real de proteína se calcula empleando la fórmula:

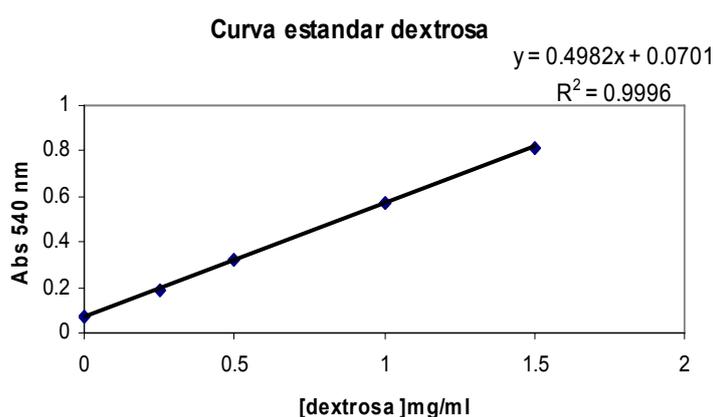
$$\frac{(\text{calculada } \mu\text{g} / \text{ml})(1000\mu\text{l})(\text{factor } \text{dilución})}{50 \text{ ó } 100\mu\text{l}}$$

## ANEXO III

### Determinación de actividad específica mediante la formación de azúcares reductores

Las alícuotas de 100  $\mu$ l de la mezcla de reacción (almidón 0.1 mg/ml) incubadas a 85°C durante diferentes periodos de tiempo se vierten en eppendorf con 100  $\mu$ l de DNS con el fin de detener la reacción.

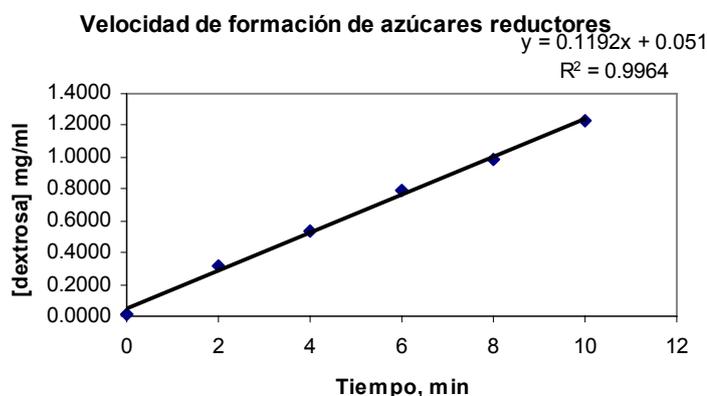
La mezcla es calentada a 85°C por 10 minutos para desarrollar el color generado por la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5nitrosalicílico por el grupo carbonilo libre de los azúcares reductores del almidón hidrolizado. Después de enfriarse las muestras en hielo, se aforan a 1 ml con agua destilada. El color desarrollado por la solución es medido espectrofotométricamente a 540 nm. Las lecturas de absorbancia de las muestras se convierten a mg/ml de glucosa después de interpolar estos valores con los observados en la curva de calibración hecha con glucosa a concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 mg/ml (Fig. 1, Tabla 1). Aunque hay que enfatizar que realmente se puede estar obteniendo una infinidad de posibles productos, maltosa, maltotetraosa, pentaosa, etc, cada uno de los cuales reaccionaría un poco diferente con el dinitrosalicilato, pero como no conocemos la composición exacta de los productos, lo que siempre se hace es compararlo con una curva estándar de glucosa y reportarlo como equivalentes de dextrosa.



**Figura 1.** Curva estándar de dextrosa. Se grafican las lecturas de absorbancia a 540 nm de cuatro muestras de dextrosa a diferente concentración.

Al graficar estos valores contra el tiempo de incubación (Fig. 2) obtenemos una recta cuya pendiente nos indica la velocidad de formación de azúcares reductores, la cual se expresa como mg de glucosa/ml\*min (Tabla 1). Es importante que la cantidad de enzima adicionada a cada ensayo permita tomar las alícuotas cuando la velocidad inicial tiene una respuesta lineal, de no ser así la cantidad de enzima adicionada al ensayo o el tiempo de toma de alícuotas debe ser menor; además la cantidad de azúcares reductores formados para el tiempo máximo de incubación no debe de sobrepasar la cantidad de azúcares reductores vistos en la curva estándar.

Después de relacionar la velocidad de formación de azúcares reductores con la cantidad de enzima empleada y su concentración obtenemos la actividad específica, la cual puede ser definida de formas diferentes para cada enzima, pero en nuestro caso una unidad de actividad específica (1U) la expresamos en términos de micro equivalentes de dextrosa ( $\mu$ moles) liberados por minuto por miligramo de  $\alpha$ -amilasa ( $\mu$ Eq. Dex/mg de proteína\*min) (Tabla 1).



**Figura 2.** Velocidad de formación de azúcares reductores determinados a partir de los equivalentes de dextrosa de las muestras incubadas por diferentes periodos de tiempo.

**Tabla 2.** Conversión de absorbancia de muestras a mg de glucosa y a actividad específica.

Tiempo de incubación, min	Abs 540 nm	mg glucosa/ml	*Pendiente (mg glucosa/ml*min)	**Actividad específica μMol dex/mg enzima*min ó μEq Dex/mg enzima*min
0	0.0762	0.0122	0.0086	92.9992
2	0.0918	0.0436		
4	0.0934	0.0468		
6	0.0921	0.0442		
8	0.0855	0.0309		
10	0.0868	0.0335		

\*Podemos expresar la pendiente (mg glucosa/ml\*min) en términos de mmoles de glucosa si ésta se divide por el peso molecular de la glucosa (pm= 180 mg/mmol):

$$\frac{\text{pendiente}_{\text{mg\_glucosa}}}{\text{ml} * \text{min}} = \frac{\text{pendiente}_{\text{mg\_glucosa}}}{\text{ml} * \text{min} * 180 \text{ mg/ml}} = \frac{\text{pendiente}_{\text{mmol\_glucosa}}}{\text{ml} * \text{min} * 180} \times \frac{1000 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ mmol}} = \frac{1000 * \text{pendiente}_{\text{ } \mu\text{mol\_glucosa}}}{\text{ml} * \text{min} * 180}$$

\*\*Para calcular la actividad específica se relaciona la pendiente con el volumen de ensayo, la cantidad de enzima adicionada al ensayo y su concentración:

$$\frac{1000 * \text{pendiente}_{\text{ } \mu\text{mol\_glucosa}}}{\text{ml} * \text{min} * 180} \times \frac{1000 \text{ } \mu\text{l}}{1 \text{ ml}} \times \frac{1 \text{ ml\_de\_ensayo}}{\mu\text{l\_enzima\_adicionados} * [\text{enzima}]_{\text{mg/ml}}} = \frac{\mu\text{mol\_glucosa}}{\text{mg\_enzima} * \text{min}}$$

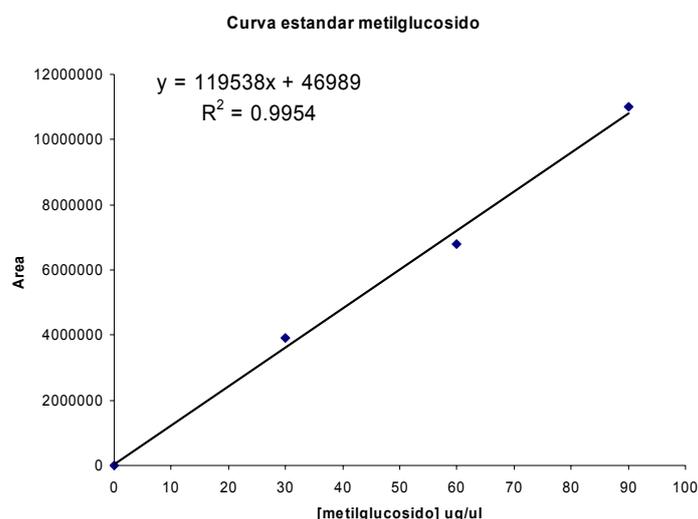
## ANEXO V

### Cuantificación de metilglucósido y determinación de actividad hidrolítica y alcoholítica de la enzima silvestre y mutantes H222DEQ

#### Cuantificación de metilglucósido

Debido a que no se cuenta con estándares de los diferentes alquil glicósidos su cuantificación se llevó a cabo midiendo la cantidad de metilglucósido (mg/ml) obtenido después de digerir todos los alquil glicósidos generados en la mezcla de reacción, incluyendo los productos de hidrólisis de almidón con una glucoamilasa.

Para llevar a cabo esta cuantificación se generó una curva estándar de metilglucósido a partir del área obtenida en los cromatogramas de la inyección de 3, 6, 9  $\mu$ l de estándar (10 mg/ml) en HPLC (Fig. 1). Empleando la ecuación de la recta obtenida de esta curva se realiza una interpolación de las áreas de metilglucósido obtenidas de la inyección en HPLC de muestra tratada con glucoamilasa con la cantidad de metilglucósido ( $\mu$ g) del estándar, obteniéndose la cantidad de metilglucósido contenido en 10  $\mu$ l de muestra inyectada al equipo ( $\mu$ g metilglucósido/10  $\mu$ l), los cuales también pueden expresarse como mg metilglucósido/ml (Tabla 1).



**Figura 1.** Curva estándar de metilglucósido empleada para interpolar las áreas obtenidas de las muestras tratadas con glucoamilasa.

Sin embargo hay que tomar en cuenta que este valor no representa la cantidad de metilglucósido contenida en los 250  $\mu$ l de volumen inicial de muestra de tratada con  $\alpha$  amilasa (en el ejemplo la muestra inicial fue de 550  $\mu$ l), sino que expresa la cantidad de metilglucósido contenido en 10  $\mu$ l de una muestra que se encuentra diluida por el buffer de glucoamilasa y por la glucoamilasa. Por lo que para obtener el valor real de metilglucósido contenido en la mezcla de reacción incubada con  $\alpha$  amilasa se debe de restar el factor de dilución ejercido por la adición del buffer de glucoamilasa y la glucoamilasa a la muestra inicial. Este valor ya representa la cantidad real de metilglucósido producido por las diferentes enzimas el cual es expresado como mg metilglucósido por ml, el cual puede ser expresado como equivalentes de metil glucósido si es dividido por el peso molecular del metil glucósido (194 g/mol) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Determinación de metilglucósido (Metglu) durante la reacción de alcoholísis y su conversión a equivalentes de metilglucósido.

Tiempo incubación con $\alpha$ -amilasa (hrs)	Área de metilglucósido obtenida en HPLC	Metilglucósido ( $\mu$ l /10 $\mu$ l)	Metilglucósido (mg/ml)**	Metilglucósido real (mg/ml)*	mMol metglu/ml ó (mEq. metglu/ml)	$\mu$ Mol metglu/ml ó ( $\mu$ Eq. Metglu/ml)
0	0	0	0	0	0	0
24	20158030	168.239731	16.8239731	19.7758157	0.10193719	101.9371943
42	18640380	155.543769	15.5543769	18.283463	0.09424465	94.24465449

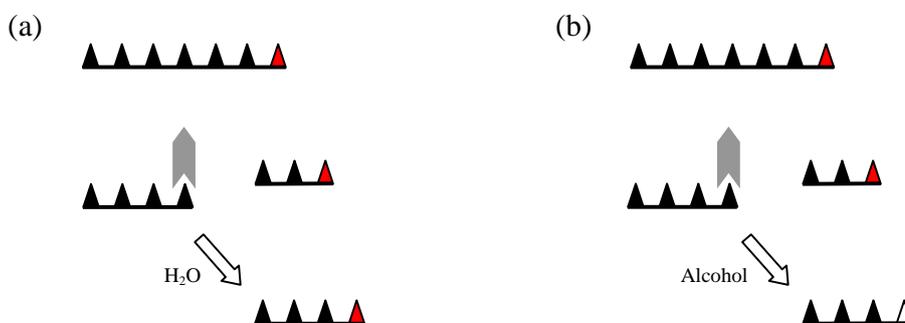
\* El valor real de metilglucósido de la muestra se obtiene de la siguiente forma:

$$\text{Metilglucósido} = (\text{Metilglucósido, mg/ml **}) \times \frac{(\text{Vol. Inicial} + \text{buffer glucoamilasa,} + \text{glucoamilasa}) \text{ ml}}{\text{Vol. Inicial, ml}}$$

### Determinación de actividad hidrolítica y alcoholítica

La cuantificación de la actividad hidrolítica en la enzima silvestre y mutantes H222 se determinó midiendo mediante DNS la cantidad de extremos reductores generados en la suspensión de almidón-metanol tratada con la  $\alpha$  amilasa, los cuales provienen de procesos de hidrólisis de almidón así como por reacciones de transglucosidación y alcoholísis.

Aunque las reacciones de hidrólisis y alcoholísis generen extremos reductores, la cantidad de azúcares reductores formados en cada reacción (expresados como equivalentes de dextrosa) es diferente. Cada vez que se realiza un evento de hidrólisis el número de azúcares reductores es duplicado (Fig. 2a), mientras que en la reacción de alcoholísis el número de azúcares reductores no varía con respecto a la cantidad original pero se da la formación de un alquil glicósido el cual tiene un extremo no reductor (Fig. 2b).



**Figura 2.** Variación en el número de extremos reductores formados en reacciones de hidrólisis y alcoholísis.

Cuando un sacárido, el cual posee un extremo reductor (triángulo rojo), unido a un residuo catalítico de la enzima se lleva a cabo la formación del complejo acil-enzima y la subsiguiente ruptura de una parte de la molécula, la cual sigue conservando su extremo reductor. Si en el segundo paso de la reacción la molécula entrante es agua se efectúa una reacción de hidrólisis (a) provocando la liberación del sacárido el cual también posee un extremo reductor; en cambio si se efectúa una reacción de alcoholísis debido a la entrada de un alcohol (b) se produce una molécula de alquil glicósido carente de extremos reductores. Por lo que la cantidad de azúcares reductores formados durante reacciones de hidrólisis es el doble de los generados por reacciones de alcoholísis, aunque en estas últimas se produce una molécula de alquil glicósido.

Por lo que el número de azúcares reductores totales determinados mediante DNS integra la suma del número de azúcares reductores generados por un evento de alcoholísis más dos veces el número de azúcares reductores generados por un evento de hidrólisis

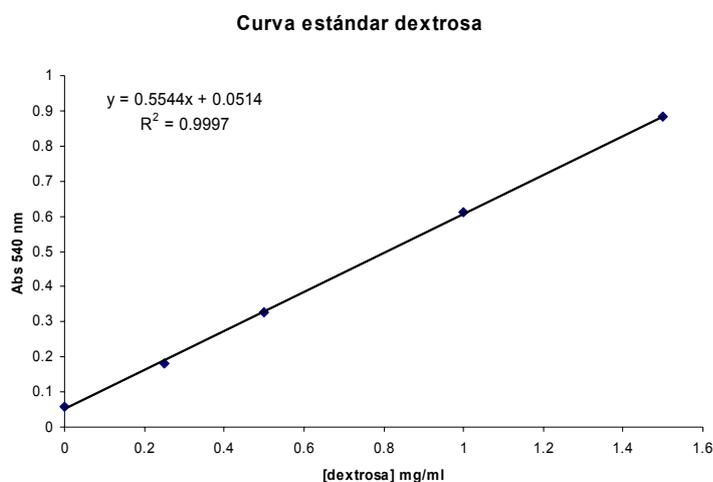
Como ya conocemos la cantidad de azúcares reductores totales de la muestra ( $\mu$  Equivalentes de dextrosa/ml) y el número de equivalentes de metilglucósido ( $\mu$  Equivalentes de metilglucósido/ml) podemos conocer el número eventos de hidrólisis efectuados, valor que permite calcular la relación de eventos de alcoholólisis/hidrólisis así como la eficiencia de la reacción de alcoholólisis (Tabla 2).

**Tabla 2.** Análisis de eventos alcoholíticos e hidrolíticos en las enzimas

Tiempo incubación con $\alpha$ -amilasa (hrs)	Azúcares Reductores Totales ( $\mu$ Eq. Dextrosa/ml)	$\mu$ Eq. Metilglucósido/ml	Eventos de hidrólisis	Relación alcoholólisis/hidrólisis	Eficiencia de alcoholólisis (%)
0	0.3196649	0	0.159	0	0
24	217.552509	101.9371943	57.807	1.763	63
42	188.592272	94.24465449	47.173	1.997	66

### Determinación de Equivalentes de dextrosa a partir de azúcares reductores

Las muestras incubadas con la enzima son diluidas (generalmente 1:100) antes de adicionarle DNS para evitar que los valores caigan fuera de la curva estándar de dextrosa. Las lecturas obtenidas a 540 nm son interpoladas a una concentración de dextrosa (mg/ml) empleando la ecuación de la recta obtenida de la curva estándar (Fig. 2), ajustando el valor con la dilución hecha. Este valor se divide entre el peso molecular de la dextrosa (180 mg/mmol) para convertirlo en molimoles de dextrosa o miliequivalentes de dextrosa (Tabla 3).



**Figura 2.** Curva estándar de dextrosa empleada para interpolar los valores de absorbancia de las muestras con DNS a mg/ml de dextrosa.

**Tabla 3.** Determinación de azúcares reductores mediante DNS y su conversión a Eq. de dextrosa.

Tiempo incubación con $\alpha$ -amilasa (hrs)	Abs 540 nm de la solución incubada con DNS	Azúcares Reductores (mg dextrosa /ml) Sin ajuste de dilución	Azúcares Reductores (mg dextrosa/ml)	mMolDextrosa/ml ó mEq. Dextrosa/ml	$\mu$ MolDextrosa/ml ó $\mu$ Eq. Dextrosa/ml
0	0.0833	0.057539683	0.057539683	0.00031966	0.3196649
24	0.2685	0.391594517	39.15945166	0.21755251	217.552509
42	0.2396	0.339466089	33.94660895	0.18859227	188.592272