



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

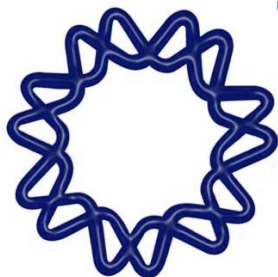
*INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA*

## “REACCIONES DE TRANSGLICOSILACIÓN CON ENZIMAS AMIOLÍTICAS”

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**  
**ALINA MORENO MENÉNDEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. AGUSTÍN LÓPEZ-MUNGUÍA CANALES





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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Tecnología Enzimática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

Los estudios de doctorado fueron posibles gracias a los apoyos económicos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Dirección General de Estudios de Posgrado, DGEP, UNAM.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Agustín López-Munguía Canales**, por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, el asesoramiento, el apoyo incondicional, la paciencia y las muchas porras.

A los integrantes del comité tutorial: Dra. Gloria Saab-Rincón, Dr. Eduardo Bárzana y Dr. Agustín López-Munguía, por la guía académica en la realización de este proyecto.

Al jurado revisor, por los comentarios valiosos que contribuyeron al mejoramiento del presente trabajo:

Dra. Amelia Farres González Sarabia

Dra. Marcela Ayala Aceves

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Dr. Leobardo Serrano Carreón

Dr. Agustín López-Munguía Canales

Al T.L. Fernando González Muñoz, por el invaluable apoyo en la parte técnica y experimental del presente proyecto.

Al Dr. Alfonso Miranda, por el apoyo en el rubro de Resonancia Magnética Nuclear.

A la Mtra. Juanita Yazmin Damián, cuyo trabajo con Amy A complementa el aquí presentado.

A la Dra. Gloria Saab-Rincón, por el asesoramiento en el rubro de biología molecular y el interés constante en el desarrollo del trabajo.

Al Dr. Edmundo Castillo, por el interés hacia el proyecto, el asesoramiento y las valiosas discusiones.

Al Dr. Enrique Morett, por la librería de DNA de *T. maritima*.

A mis compañeros de laboratorio: María Elena Ortiz, Georgina Estrada, Fernando González, Marcela Paredes, Arlette Mena, Edmundo Castillo, María Elena Rodríguez, Clarita Olvera, Vanesa Olivares, Alejandro Torres, Sandra del Moral, Consuelo Vázquez, Xóchitl Rendón, Sandra Morales y Dolores Reyes. A los que forman hoy el grupo de trabajo del laboratorio.  
A la Universidad Nacional Autónoma de México.

## DEDICATORIAS

A Jorge,  
presente y cerca.

A mi Libertad amada,  
siempre hablándome al oído.

A Enrique Moreno, mi padre,  
con su medida de gigante.

A Enrique,  
otra vez Quico.

A mi familia: tía Marisol, tío Manuel, Mari, Sergio y tío Rodolfo, siempre con amor, al pie del cañón.

A Chichí y a la abuela Adela.

A Héctor, brujo también.

A Salvador, lo que es.

A Agustín, gracias, gracias por todo.

A Almiux, Mireya, Marisol, Ginita, María, Fercito, Marce, Ara chula, Maga, Alexito, Adrián, Manuel, Ramón, Paola, Silvia, Cei, Alejandro, Betún, Lu, Lety, Swan, Darío, Haru, Pilar, Carliux, Nahumcito, Omar, Ernesto, Conchis y todos los amigos que han pasado por aquí.

A los heraldos y los futuros.

# ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Glicosidasas.....	4
2.1.1 Familias de las glicosidasas .....	5
2.1.2 Reacciones de transferencia con glicosidasas.....	6
2.1.3 La familia 13 de glicosidasas: Familia de la $\alpha$ -amilasa.....	8
2.2 $\alpha$ -Amilasas.....	10
2.2.1 Estructura de las $\alpha$ -amilasas.....	10
2.2.2 Mecanismo catalítico de las $\alpha$ -amilasas.....	15
2.2.3 $\alpha$ -Amilasas licuefactantes y sacarificantes.....	16
2.2.4 Sacarificación como resultado de la combinación de las actividades hidrolítica y transglicosídica de algunas $\alpha$ -amilasas.....	16
2.2.5 Usos industriales de las $\alpha$ -amilasas.....	17
2.2.6 $\alpha$ -Amilasas en reacciones de transferencia.....	18
2.2.7 $\alpha$ -Amilasas termofílicas.....	19
2.3 <i>Thermotoga maritima</i> MSB8.....	21
2.3.1 Enzimas amilolíticas de <i>Thermotoga maritima</i> .....	21
2.3.2 $\alpha$ -Amilasa de <i>T. maritima</i> (Amy A).....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo general.....	24
3.2 Objetivos particulares.....	24
4. HIPÓTESIS.....	25
5. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	26
5.1 Enzimas y reactivos.....	26
5.2 Actividad enzimática.....	26



5.3 Determinación de proteína.....	27
5.4 Combinación de las actividades hidrolítica y transglucosídica de la $\alpha$ -amilasa de <i>B. licheniformis</i> y la CGTasa de <i>B. macerans</i> .....	27
5.5 Caracterización de reacciones de transferencia con la $\alpha$ -amilasa de <i>A. niger</i> a partir de almidón y maltodextrinas.....	27
5.5.1 Perfil de productos de hidrólisis a partir de maltodextrinas.....	27
5.5.2 Reacciones de alcoholisis a partir de metanol y almidón /maltodextrinas.....	28
5.6 Caracterización de las reacciones de transferencia con la $\alpha$ -amilasa de <i>Thermotoga maritima</i> (Amy A).....	28
5.6.1 Amplificación del gen.....	28
5.6.2 Clonación en un vector de expresión.....	28
5.6.3 Transformación en <i>E. coli</i> .....	29
5.6.4 Expresión de la proteína y ensayo de actividad.....	29
5.6.5 Purificación de la enzima.....	30
5.6.6 Perfil de productos a partir de almidón y maltodextrinas.....	31
5.6.7 Reacciones de transglucosilación a partir de maltosa.....	31
5.6.8 Reacciones de transglucosilación a partir de malto-oligosacáridos.....	31
5.6.9 Determinación de la presencia de neotrehalosa como producto en las reacciones de transferencia.....	32
5.6.10 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para la identificación de neotrehalosa.....	32
5.6.11 Reacciones de alcoholisis con Amy A a partir de metanol y almidón.....	33
5.6.12 Reacciones de alcoholisis con Amy A a partir de metanol y maltodextrinas.....	33
5.6.13 Reacciones de alcoholisis con Amy A a partir de almidón y butanol.....	33
5.6.14 Reacciones con glucoamilasa para la cuantificación total de los productos.....	33
5.7 Análisis de las reacciones por Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	34

5.8	Análisis de las reacciones por HPLC.....	34
6.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	35
6.1	Combinación de las actividades hidrolítica y transglicosídica de la $\alpha$ -amilasa de <i>B. licheniformis</i> y la CGTasa de <i>B. macerans</i> .....	35
6.2	Caracterización de reacciones de transferencia con la $\alpha$ -amilasa de <i>A. niger</i> a partir de almidón y maltodextrinas.....	39
6.3	Caracterización de las reacciones de transferencia con AmyA de <i>Thermotoga maritima</i> .....	42
6.3.1	Amplificación del gen.....	42
6.3.2	Clonación en un vector de expresión.....	42
6.3.3	Transformación en <i>E. coli</i> .....	43
6.3.4	Expresión del gen <i>amy A</i> y ensayo de actividad.....	44
6.3.5	Purificación de la enzima Amy A.....	45
6.3.6	Determinación de proteína.....	46
6.3.7	Determinación de actividad enzimática.....	46
6.3.8	Perfil de productos de Amy A a partir de almidón y maltodextrinas.....	47
6.3.9	Reacciones de transglicosilación con Amy A a partir de maltosa.....	49
6.3.10	Reacciones de transferencia de Amy A empleando como sustratos G2-G7.....	53
6.3.11	Determinación de la presencia de neotrehalosa como producto en las reacciones de transferencia.....	57
6.3.12	Reacciones de alcoholólisis de Amy A con metanol y almidón.....	66
6.3.13	Reacciones de alcoholólisis de Amy A con metanol y maltodextrinas.....	69
6.3.14	Reacciones de alcoholólisis con Amy A a partir de butanol y almidón.....	71
7.	CONCLUSIONES.....	73
8.	PERSPECTIVAS.....	74
9.	REFERENCIAS.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 2.1.</b> Representación esquemática del mecanismo de a) inversión de la configuración del carbono anomérico y b) retención de la configuración del carbono anomérico de las glicosidasas R= H o aglicón.....	4
<b>Fig. 2.2.</b> Representación esquemática de las reacciones que pueden llevar a cabo las glicosidasas que retienen la configuración del carbono anomérico: a) hidrólisis, b) hidrólisis inversa, c) transglicosilación.....	6
<b>Fig 2.3.</b> a) Vista desde arriba del TIM barrel de la triosa fosfato isomerasa, b) Vista de lado del TIM barrel de la triosa fosfato isomerasa.....	11
<b>Figura 2.4.</b> a) Esquema de la estructura de las $\alpha$ -amilasas (Nielsen <i>et al.</i> , 2000), b) Modelo de la estructura tridimensional de la $\alpha$ -amilasa de <i>A. oryzae</i> .....	12
<b>Figura 2.5.</b> Regiones invariables en enzimas pertenecientes a la familia de la $\alpha$ -amilasa. Los tres residuos catalíticos invariables se muestran con un círculo abierto.....	13
<b>Figura 2.6.</b> Nomenclatura de los subsitios en el sitio activo de las $\alpha$ -amilasas.....	15
<b>Figura 6.1.</b> Distribución de los productos obtenidos de las reacciones con la $\alpha$ -amilasa y la acción conjunta de la $\alpha$ -amilasa y la CGTasa a partir de almidón.....	36
<b>Figura 6.2.</b> Cromatograma obtenido por HPLC de la reacción de CGTasa sobre la molécula de almidón.....	37
<b>Figura 6.3</b> a) Composición inicial de maltodextrinas 20 DE (mg/ml). b) Incremento o decremento de los oligosacáridos componentes de Maltodextrinas (DE 20) generado a partir de la acción de la CGTasa y la $\alpha$ -amilasa + CGTasa en conjunto.....	38
<b>Figura 6.4.</b> Cromatografía en capa fina de las reacciones de alcoholólisis a partir de almidón al 6% y metanol al 20% con la $\alpha$ -amilasa de <i>A. niger</i> .....	40
<b>Figura 6.5.</b> Cromatografía en capa fina de las reacciones de hidrólisis a partir de maltodextrinas 20 DE al 15% con la $\alpha$ -amilasa de <i>A. niger</i> 40	
<b>Figura 6.6.</b> Cromatografía en capa fina de las reacciones de alcoholólisis a partir de maltodextrinas al 15% con la $\alpha$ -amilasa de <i>A. niger</i> .....	41
<b>Figura 6.7.</b> Fotografía del gel de agarosa en donde se muestra el producto de PCR obtenido a partir de los oligos sintetizados y la librería de DNA de <i>Thermotoga maritima</i> .....	42
<b>Figura 6.8.</b> Fotografía del gel de agarosa en donde se muestra la digestión con Nde I y HIND III del vector con un inserto distinto al de interés.....	43
<b>Figura 6.9.</b> A. Fotografía del gel de agarosa en donde se muestran los productos de PCR de colonia de las cinco colonias seleccionadas. B. Fotografía del gel de agarosa en donde se muestran los plásmidos purificados de las cuatro colonias de donde se obtuvo el producto de PCR esperado.....	44

<b>Figura 6.10.</b> Fotografía del gel de electroforesis SDS-PAGE de la fracción soluble e insoluble del extracto.....	44
<b>Figura 6.11.</b> Cromatografía en capa fina de las reacciones con los productos de <i>amyA</i> en almidón al 4%, pH 7, 80°C, 3 h.....	45
<b>Figura 6.12.</b> Gel de electroforesis SDS-PAGE.....	46
<b>Figura 6.13.</b> Productos de reacción obtenidos a partir de diferentes concentraciones de almidón con la $\alpha$ -amilasa de <i>T. maritima</i> .....	47
<b>Fig. 6.14.</b> Productos de reacción obtenidos a partir de la hidrólisis de maltodextrinas (2, 6 y 15%) con 0.5 U/ml de la $\alpha$ -amilasa de <i>T. maritima</i> después de 24 h de reacción.....	48
<b>Figura 6.15.</b> Perfil de productos de Amy A obtenidos a partir de la hidrólisis de almidón (6% w/v) con la enzima pura y la enzima parcialmente purificada (antes del proceso de purificación por filtración en gel).....	49
<b>Figura 6.16.</b> Cromatografía en capa fina de las reacciones de transglicosilación de Amy A a partir de maltosa al 6%.....	50
<b>Figura 6.17.</b> Cromatograma de HPLC de los productos de reacción obtenidos con Amy A y maltosa al 6%, después de 24 h de reacción.....	50
<b>Figura 6.18.</b> Esquematzación de las reacciones iniciales de transglicosilación propuestas de AmyA sobre la molécula de maltosa.....	51
<b>Figura 6.19.</b> Esquematzación de las reacciones de la enzima BSA <sub>m</sub> sobre la molécula de maltosa y las reacciones de la $\beta$ -amilasa de soya sobre los productos reacción iniciales.....	52
<b>Figura 6.20.</b> Cromatografía por HPLC de los productos de reacción de Amy A con maltotriosa al 2% después de 24 h.....	53
<b>Figura 6.21</b> Evolución de los productos obtenidos de la reacción de Amy A con maltotriosa al 2%.....	54
<b>Figura 6.22.</b> Ejemplo de algunas de las reacciones iniciales propuestas para la acción de Amy A sobre la molécula de maltotriosa.....	54
<b>Figura 6.23.</b> Cromatografía en capa fina de las reacciones de Amy A con G3, G4, G5, G6 y G7 al 2%, a tiempo 0 y después de 10 min de reacción.....	55
<b>Figura 6.24.</b> Cromatografía en capa fina de las reacciones de Amy A con 6% de G2 y 2% de G7 a diferentes tiempos de reacción.....	56
<b>Figura 6.25.</b> Productos obtenidos por Amy A y G2 (6%) o G3-G7 (2%) después de 24 ó 48 h de reacción.....	56
<b>Figura 6.26.</b> Cromatografía en capa fina de los productos observados antes (a) y después (b) de la acción de la enzima glucoamilasa de <i>A. niger</i> sobre los productos de alcoholisis de Amy A a partir de almidón y methanol 20%.....	58

<b>Figura 6.27.</b> Cromatografía por HPLC, en columna preparativa de la reacción con Amy A y G2 al 15% y G7 al 2%, seguida de la reacción con glucoamilasa.....	59
<b>Figura 6.28.</b> Cromatografía por HPLC, en columna analítica de la muestra con el disacárido de identidad desconocida purificado.....	59
<b>Figura 6.29.</b> Cromatografía por HPLC, en columna analítica de la muestra con el disacárido de identidad desconocida purificado.....	60
<b>Figura 6.30.</b> Estructura de la neotrehalosa ( $\alpha$ -D-Glucopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosido).....	61
<b>Figura 6.31.</b> a) Cromatografía en capa fina de las reacciones de alcoholólisis a partir de almidón al 6% y metanol con Amy A. b) Cromatograma por HPLC de la reacción de alcoholólisis de Amy A con almidón al 6% y metanol al 30%.....	67
<b>Figura 6.32</b> Cromatografía en capa fina de las reacciones de alcoholólisis a partir de maltodextrinas al 15% y metanol con Amy A.....	69
<b>Figura 6.33.</b> Efecto de la concentración de methanol en los productos de alcoholólisis con Amy A, a partir de maltodextrinas al 15% y 24 h de reacción.....	70
<b>Figura 6.34.</b> Cromatografía en capa fina de las reacciones de Amy A y metil-glucósido.....	71
<b>Figura 6.35.</b> Cromatografía en capa fina de las reacciones de Amy A y almidón al 6% y butanol al 8%.....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1</b> Principales glicosidasas utilizadas en reacciones de transglicosilación.....	7
<b>Tabla 2.2</b> Ejemplos de $\alpha$ -glicosidasas utilizadas en reacciones de transglicosilación.....	8
<b>Tabla 2.3</b> Enzimas de la familia de la $\alpha$ -amilasa, su correspondiente número EC, su organización en dominios y su sustrato principal.....	9
<b>Tabla 2.4</b> $\alpha$ -Amilasas termofilicas de diferentes microorganismos, su temperatura y pH óptimos.....	20
<b>Tabla 2.5</b> Glicosil hidrolasas de la bacteria hipertermofílica <i>Thermotoga maritima</i> .....	21
<b>Tabla 6.1</b> Principales productos obtenidos de la acción de la $\alpha$ -amilasa de <i>B. licheniformis</i> y la CGTasa de <i>B. macerans</i> por separado y en acción conjunta en una solución de almidón...	36
<b>Tabla 6.2</b> Productos obtenidos después de 30 min de la reacción de CGTasa de <i>B. macerans</i> en una solución de almidón.....	37
<b>Tabla 6.3</b> Datos de desplazamiento químico por $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ para la Neotrehalosa ( $\alpha$ -D-Glucopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosido).....	61
<b>Tabla 6.4</b> Metil-glucósido obtenido después de 24 h de reacción de la Amy A con almidón al 6% y diferentes concentraciones de methanol.....	68
<b>Tabla 6.5</b> Metil-glucósido obtenido de la reacción a partir de almidón (6%) y metanol con Amy A y otras $\alpha$ -amilasas sacarificantes.....	68

# 1. RESUMEN

La síntesis enzimática de carbohidratos ha sido sujeto de una gran cantidad de estudios y representa hoy en día una alternativa interesante ante la síntesis química, permitiendo el control de las regio- y estereo- especificidades y, en muchos casos la prevalencia de condiciones moderadas de reacción sin la generación de desechos tóxicos.

La aproximación enzimática para la síntesis de carbohidratos involucra principalmente dos tipos de enzimas: las glicosiltransferasas (ya sea del tipo Leloir o no Leloir) y las glicosil hidrolasas (endo- y exo- glicosidasas). Las glicosiltransferasas del tipo Leloir utilizan glicosil-ésteres de nucleósidos mono- o di-fosfato como donadores; por otro lado, las del tipo no Leloir aceptan donadores glicosil- fosfato. Estas enzimas han sido utilizadas para la síntesis de oligosacáridos en gran escala, sin embargo, su uso está limitado por su baja estabilidad y selectividad (no Leloir) y el alto costo de sus sustratos (Leloir).

Las glicosilhidrolasas, por otro lado, se encuentran presentes en todos los organismos vivos y permiten el uso de sustratos relativamente baratos y de alta biodisponibilidad. La mayor parte de las glicosidasas utilizadas con fines de síntesis son exo-enzimas y existen muy pocos estudios que utilizan endo-glicosidasas para llevar a cabo este tipo de reacciones.

La síntesis de carbohidratos con glicosidasas puede llevarse a cabo por medio de un mecanismo de hidrólisis inversa o por medio de un proceso de transglicosilación o transferencia de residuos glicosilo de un donador a un aceptor. Dicho aceptor puede ser de diversa índole (oligosacáridos, alcoholes, glicósidos, alquil-glicósidos, etc.).

En el grupo de trabajo del Dr. Agustín López-Munguía, nos hemos interesado en estudiar el potencial de algunas glicosidasas para llevar a cabo reacciones de transglicosilación; dicho interés se ha enfocado particularmente a las  $\alpha$ -amilasas, endo-enzimas de gran disponibilidad comercial y ampliamente utilizadas industrialmente en procesos de hidrólisis de almidón, de alimentos y textiles. Esto incluye los trabajos de Del Río *et al.* sobre la relación evolutiva entre las  $\alpha$ -amilasas y las CGTasas (1997) y la introducción de actividad transglicosídica en la  $\alpha$ -amilasa licuefactante de *B. stearothermophilus* (1999), así como el trabajo de Santamaría *et al.* (1999) sobre el análisis de la habilidad de las  $\alpha$ -amilasas licuefactantes de *B. licheniformis* y *B. stearothermophilus* y las sacarificantes provenientes de *A. niger* y *A. oryzae* para llevar reacciones de alcoholisis, del cual se concluyó que son las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes, las enzimas capaces de llevar a cabo estas reacciones.

Con estos antecedentes y añadiendo el hecho de que el sustrato por excelencia de las  $\alpha$ -amilasas es el almidón (carbohidrato de gran distribución en la naturaleza), se puede concluir

acerca del gran atractivo que posee la utilización de estas enzimas para obtener varios productos de transferencia como oligosacáridos y alquil-glicósidos, entre otros.

Con el objetivo de analizar la hipótesis previamente propuesta en el grupo de trabajo acerca de que la capacidad de las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes de generar productos de bajo peso molecular a partir de la hidrólisis exhaustiva del almidón es el resultado de su actividad transglicosídica, se estudiaron, en una primera etapa del proyecto, las diferencias en el poder reductor y el perfil de productos obtenidos a partir de la combinación de una  $\alpha$ -amilasa no transglicosídica y una transferasa natural, con los obtenidos de las enzimas por separado, sobre la molécula de almidón.

Durante esta primera etapa resultó evidente que uno de los grandes inconvenientes de utilizar almidón como sustrato, radica en la necesidad de gelatinizarlo a altas temperaturas antes del ataque enzimático y la alta viscosidad que genera además de que, por otro lado, a partir del almidón se obtiene una gama amplia de productos de hidrólisis y transglicosilación, difícil de cuantificar. De todo esto, en una segunda etapa del proyecto y dentro de la búsqueda por la obtención de una  $\alpha$ -amilasa con buena capacidad de transglicosilación, nos enfocamos a analizar la capacidad de las  $\alpha$ -amilasas para utilizar maltodextrinas, productos de la licuefacción del almidón, como sustratos donadores de residuos glicosilo en reacciones de hidrólisis y alcoholólisis con metanol. Así, se realizaron reacciones con la  $\alpha$ -amilasa de *A. niger*, enzima sacarificante que previamente había sido utilizada exitosamente en el laboratorio para llevar a cabo reacciones de alcoholólisis a partir de almidón.

Finalmente, las ventajas que representa la utilización de enzimas termofílicas nos llevó a enfocar el objetivo de este trabajo a la caracterización de la  $\alpha$ -amilasa de *Thermotoga maritima* (AmyA) en reacciones de transferencia a partir de almidón, maltodextrinas y oligosacáridos de menor peso molecular. Con este fin, se aisló el gen *amyA* y se clonó en *E. coli* para disponer de una cantidad adecuada de la enzima para realizar este estudio.

Se demostró que Amy A es capaz de transformar la maltosa en oligosacáridos de mayor peso molecular (como maltoheptaosa), por medio de una combinación de reacciones de hidrólisis y transferencia. El hecho de que Amy A sea capaz de utilizar la maltosa para generar productos de mayor peso molecular, es una propiedad casi única entre las  $\alpha$ -amilasas.

Uno de los productos de la actividad transglicosídica de Amy A, es la neotrehalosa, un disacárido con poder edulcorante y un enlace  $\alpha 1, \beta 1$ .

Amy A puede también llevar a cabo reacciones de alcoholólisis, transfiriendo residuos glicosilo del almidón y maltodextrinas, a metanol y butanol, con la generación de alquil-glicósidos.

Cabe mencionar que los resultados de caracterización de Amy A obtenidos del presente proyecto, sirvieron como base para la generación de mutantes con mayor capacidad



transglicosídica que la enzima nativa, en reacciones de alcoholisis con almidón, trabajo realizado por el grupo del Dr. Xavier Soberón.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Glicosidasas

Las glicosidasas son enzimas clave en el metabolismo de carbohidratos y catalizan la hidrólisis de enlaces O-glicosídicos. Debido a la extensa variedad de carbohidratos con estereoquímica diferente presentes en la naturaleza, existe una amplia diversidad de glicosidasas involucradas en su metabolismo (Henrissat, 1991)

En general, la hidrólisis catalizada por las glicosidasas se lleva a cabo vía una catálisis ácida general, que requiere dos residuos críticos: un donador de protón y un nucleófilo base. Dicha reacción se puede llevar a cabo por medio de un mecanismo que da lugar a una retención o bien a una inversión global de la configuración del carbono anomérico. Las glicosidasas que invierten la configuración del carbono anomérico operan a través de un desplazamiento directo del grupo saliente por el agua, mientras que las que retienen la configuración, utilizan un mecanismo de doble desplazamiento en el que se forma un intermediario glicosilo-enzima antes del ataque nucleofílico de la molécula de agua (Davies *et al.*, 1995). En la Figura 2.1 se muestra una representación esquemática de ambos tipos de mecanismos.

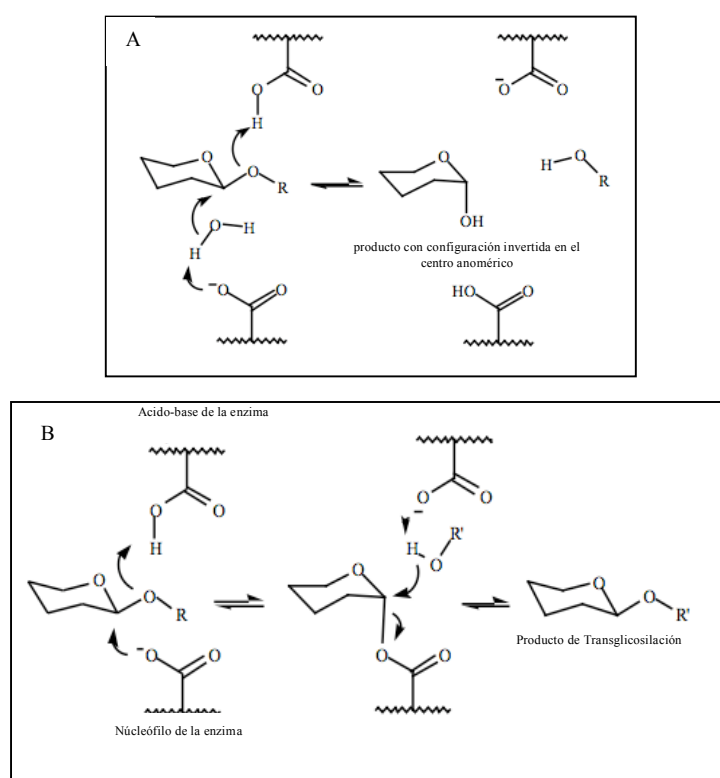


Fig. 2.1. Representación esquemática del mecanismo de a) inversión de la configuración del carbono anomérico y b) retención de la configuración del carbono anomérico de las glicosidasas  $R=H$  o aglicón (Trincone *et al.*, 2006).

A pesar de estas diferencias, es notorio que ambas clases de glicosidasas utilizan un par de ácidos carboxílicos en el sitio activo; en las glicosidasas que invierten la configuración del carbono anomérico, un residuo actúa como un ácido general y el otro actúa como una base general; por otro lado, en las enzimas que retienen la configuración, un residuo funciona como ácido y base mientras que el otro actúa como nucleófilo y grupo saliente. Además, ambos tipos de enzimas operan por medio de estados de transición de carácter de oxocarbenium. La principal diferencia entre ambas clases de enzimas es la distancia entre los dos grupos carboxilo. En las glicosidasas que retienen la configuración, dichos residuos se encuentran muy próximos (4.5-5.5 °Å), resultando en la formación de un intermediario covalente glicosil-enzima; por otro lado, en las glicosidasas que invierten la configuración, la separación entre los residuos es mayor (9-9.5 °Å), lo cual permite la inserción de una molécula de agua, que lleva a cabo un ataque directo (McCarter *et al.*, 1994, Vasella *et al.*, 2002, Zechel *et al.*, 2000).

Además de su división bajo los términos discutidos anteriormente, las glicosidasas se dividen también en función de la forma en que atacan la molécula de sustrato, en exo-glicosidasas, que cortan los enlaces glicosídicos externos de cadenas de polisacáridos, liberando mono, di u oligosacáridos del extremo no reductor del sustrato y, por otro lado, en endo-glicosidasas que cortan los enlaces glicosídicos internos de manera azarosa (Van der Maarel *et al.*, 2002).

### **2.1.1 Familias de las glicosidasas**

Una contribución invaluable en el estudio de las glicosidasas ha sido su clasificación en familias con base en la similitud de sus secuencias. La primera clasificación en este sentido fue publicada por Henrissat en 1991 (Henrissat, 1991) y se ha actualizado constantemente (Henrissat *et al.*, 1993, Henrissat *et al.* 1996). Para el año de 1997, dicha clasificación contenía más de 60 familias con representantes estructurales de al menos 27 de ellas; la clasificación y el número de familias de glicosidasas en función de esta clasificación puede consultarse en la página WEB CAZy (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~pedro/CAZY/db.html>). Algunas de las similitudes entre las enzimas dentro de una familia pueden ser remotas y tal vez limitadas a las regiones del sitio activo. Sin embargo, en conjunción con las estructuras tridimensionales que poco a poco han estado disponibles, este acercamiento ha permitido obtener valiosa información acerca de los residuos responsables de la catálisis y la especificidad de estas enzimas (Svensson, B., 1994). Dado que la secuencia de una enzima dicta su estructura y función, sería de esperarse que todas las enzimas dentro de una familia llevaran a cabo su reacción con el mismo resultado

estereoquímico y que adoptaran el mismo plegamiento; sin embargo, ninguna de las dos suposiciones es cierta y las diferentes enzimas dentro de una misma familia pueden retener o invertir la configuración del carbono anomérico (Ly *et al.*, 1999).

Por otro lado, debido a que las estructuras proteicas están mejor conservadas que sus secuencias, se ha introducido una clasificación que agrupa a varias familias en “clanes” o superfamilias (Henrissat, *et al.*, 1997) y, a medida que se ha incrementado el número de estructuras tridimensionales resueltas de distintas glicosil-hidrolasas, se ha llegado a la conclusión de que estas enzimas exhiben una extraordinaria variedad de plegamientos distintos (Bourne *et al.*, 2001).

### 2.1.2 Reacciones de transferencia con glicosidasas

A pesar de que la reacción principal de las glicosidasas es la hidrólisis, aquellas que funcionan con un mecanismo de retención de la configuración del carbono anomérico, son capaces de transferir residuos glicosilo a aceptores distintos al agua (como otros oligosacáridos, alcoholes de bajo peso molecular, glicósidos, entre otros) bajo condiciones particulares de reacción (Ly *et al.*, 1999; Sinnot, 1990). A lo largo del presente documento, nos referiremos a este tipo de reacciones como “reacciones de transferencia” o “reacciones de transglicosilación”. En la figura 2.2 se esquematizan las diferentes reacciones que son capaces de llevar a cabo estas glicosidasas, tomando también en cuenta la reacción de síntesis por hidrólisis inversa, la cual, a diferencia de la reacción de transglicosilación (controlada cinéticamente), se encuentra bajo control termodinámico e involucra la formación directa de un enlace glicosídico.

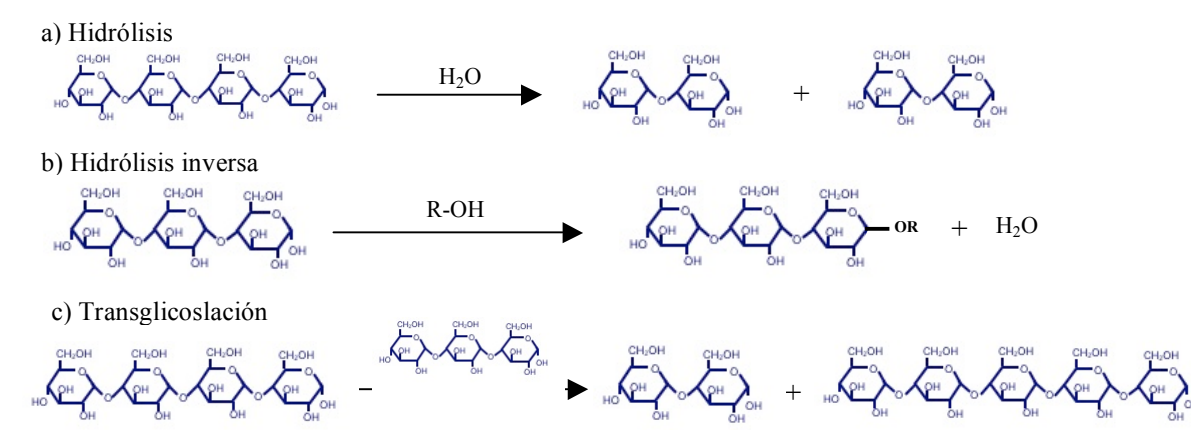


Fig. 2.2 Representación esquemática de las reacciones que pueden llevar a cabo las glicosidasas que retienen la configuración del carbono anomérico: a) hidrólisis, b) hidrólisis inversa, c) transglicosilación.

En la literatura se encuentra una gran cantidad de información concerniente a reacciones de transglicosilación catalizadas por glicosidasas nativas o modificadas por ingeniería de proteínas (generalmente con el objetivo de incrementar su capacidad transglicosídica). En la Tabla 2.1 se resumen algunos ejemplos de las glicosidasas encontradas con mayor frecuencia en la literatura en términos de su capacidad para llevar a cabo reacciones de transferencia.

Curiosamente, la información más abundante de aplicación de glicosidasas en reacciones de transferencia, se refiere principalmente al uso de  $\beta$ -glicosidasas y los ejemplos de utilización de  $\alpha$ -glicosidasas en transglicosilación son notoriamente menores en número.

Tabla 2.1 Principales glicosidasas utilizadas en reacciones de transglicosilación.

<i>Enzima</i>	<i>Fuente</i>	<i>Sustrato</i>	<i>Referencia</i>
$\beta$ -galactosidasa	<i>A.oryzae</i>	Gitoxigenina	Ooi <i>et al.</i> , 1984
	<i>E. coli</i>	GalONP	López <i>et al.</i> , 1994
	<i>E. coli</i>	Lactosa	Okahata <i>et al.</i> , 1998
	<i>E. coli</i>	Lactosa, Butanol	Moreno-Beltrán <i>et al.</i> , 1999
	<i>E. coli</i>	Lactosa, Heptanol	García-Garibay <i>et al.</i> , 2000
	Higado de cerdo	GalONP	Zeng <i>et al.</i> , 2000
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Lactosa	Rabiu <i>et al.</i> , 2001
	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	Lactosa	Hart <i>et al.</i> , 2004
$\beta$ -glucosidasa		GalONP	
	Almendras	Glucosa, Butanol	Ismail <i>et al.</i> , 1999
	<i>T. viride</i>	Celobiosa, Heptanol	Shinoyama <i>et al.</i> , 1991
	<i>T. thermophilus</i>	$\beta$ -galactósidos, $\beta$ -glucósidos	Fourage <i>et al.</i> , 2000
	<i>P. furiosus</i>	Lactosa	Hansson <i>et al.</i> , 2001
$\beta$ -xilosidasa	Cassava	2FDNPG	Hommalai <i>et al.</i> , 2005
	<i>Aspergillus</i> sp.	PNP-X	Eneyskaya <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. awamori</i>	PNP-X	Eneyskaya <i>et al.</i> , 2007
	<i>T. reesei</i>	Xilosa, Etanol, Propanol	Drouet <i>et al.</i> , 1994
Invertasa	<i>S. cerevisiae</i>	Sacarosa, Metanol	Rodríguez <i>et al.</i> , 1997
Neopululanasa	<i>B. stearothermophilus</i>	Maltotriosa	Kuriki <i>et al.</i> 1996

En la Tabla 2.2 se resumen algunos ejemplos de  $\alpha$ -glicosidasas con capacidad transglicosídica.

Tabla 2.2 Ejemplos de  $\alpha$ -glicosidasas utilizadas en reacciones de transglicosilación.

<i>Enzimas</i>	<i>Fuente</i>	<i>Sustrato</i>	<i>Referencia</i>
$\alpha$ -galactosidasa	<i>B. stearothermophilus</i>	NPG	Spangenberg <i>et al.</i> ,2000
	Café verde	NPG	Spangenberg <i>et al.</i> ,2002
	<i>L. reuteri</i>	Melibiosa	Tzortzis <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. fumigatus</i>	rafinosa	
$\alpha$ -glucosidasa		NPGal	Puchart <i>et al.</i> , 2005
	<i>A.nidulans</i>	Maltosa	Kato <i>et al.</i> , 2002
	Levadura	Maltosa, hidroquinona	Prodanovic <i>et al.</i> ,2005
	<i>A. fasciata</i>	Maltosa, pNPG,	Andreotti <i>et al.</i> , 2006
		Celobiosa sacarosa	

### 2.1.3 La familia 13 de glicosidasas: Familia de la $\alpha$ -amilasa.

El concepto de la familia de la  $\alpha$ -amilasa, fue propuesto por Kuriki e Imanaka en 1999. Estos autores decidieron tomar en cuenta, además de la homología en estructura primaria considerada en la clasificación de Henrissat (y que en ocasiones agrupaba enzimas con diferente especificidad de sustrato dentro de la misma familia), otras similitudes estructurales y el mecanismo catalítico. Así, la familia de la  $\alpha$ -amilasa comprende aquellas enzimas que tienen las siguientes características: a) actúan en enlaces  $\alpha$ -glicosídicos y los hidrolizan para producir mono- u oligosacáridos  $\alpha$ -anoméricos (hidrólisis) o bien forman enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4 o 1,6 (transglicosilación), o una combinación de ambas actividades; b) poseen una estructura de barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> o barril TIM, que contiene los residuos catalíticos; c) tienen cuatro regiones altamente conservadas en su estructura primaria, las cuales contienen los aminoácidos que forman el sitio catalítico, así como algunos aminoácidos esenciales para la estabilidad de la topología conservada del barril TIM (Kuriki *et al.*, 1999).

La tabla 2.3 resume algunas de las enzimas que pertenecen a la familia de la  $\alpha$ -amilasa, así como algunas de sus características estructurales.

Tabla 2.3. Enzimas de la familia de la  $\alpha$ -amilasa, su correspondiente número EC, su organización en dominios y su sustrato principal (Van der Maarel *et al.*, 2002)

<i>Enzima</i>	<i>Número EC</i>	<i>Dominios</i>	<i>Sustrato principal</i>
Amilosacarasa	2.4.1.4		Sacarosa
Sacarosa Fosforilasa	2.4.1.7		Sacarosa
Enzima ramificante de glucano	2.4.1.18	A, B, F	Almidón, glicógeno
Cicodextrin glicosil transferasa	2.4.1.19	A, B, C, D, E	Almidón
Amilomaltasa	2.4.1.25	A, B1, B2	Almidón, glicógeno
Amilasa formadora de maltopentaosa	3.2.1-	A, B, I	Almidón
$\alpha$ -Amilasa	3.2.1.1	A, B, C	Almidón
Oligo-1,6-glucosidasa	3.2.1.10	A, B	Amilopectina
$\alpha$ -Glucosidasa	3.2.1.20		Almidón
Amilopululanasa	3.2.1.41 o 3.2.1.1	A, B, H, G, 1	Pululano
Ciclomaltodextrinasa	3.2.1.54	A, B	Ciclodextrinas
Isopululanasa	3.2.1.57		Pululano
Isoamilasa	3.2.1.68	A, B, F, 7	Amilopectina
Amilosa formadora de maltotetraosa	3.2.1.60	A, B, C, E	Almidón
Glucodextranasa	3.2.1.70		Almidón
Trehalosa-6-fosfato hidrolasa	3.2.1.93		Trehalosa
Amilosa formadora de maltohexaosa	3.2.1.98		Almidón
Amilasa maltogénica	3.2.1.13	A, B, C, D, E	Almidón
Neopululanasa	3.2.1.135	A, B, G	Pululano
Malto-oligosil trehalasa hidrolasa	3.2.1.141		Trehalosa
Malto-oligosil trehalasa sintasa	5.4.99.15		Maltosa

Como puede concluirse a partir de un análisis de los datos de la tabla 2.3, al utilizar los criterios señalados anteriormente, dentro de la familia se encuentran enzimas que llevan a cabo principalmente reacciones de hidrólisis ( $\alpha$ -amilasa) así como también enzimas cuya reacción principal es la de transglicosilación (CGTasa) y, por otro lado, dentro de la familia también hay enzimas que presentan una especificidad preferente hacia enlaces  $\alpha$ -1,4 ( $\alpha$ -amilasa y CGTasa) y otras que la presentan preferentemente hacia enlaces  $\alpha$ -1,6 (pululanasa e isoamilasa). De hecho, es necesario subrayar que el límite entre “glicosidasas” y “glicosiltransferasas” no se encuentra necesariamente claro ya que, como se detallará más adelante, algunas  $\alpha$ -amilasas pueden llevar a cabo reacciones de transglicosilación, formando enlaces  $\alpha$ -1,4 y, por otro lado, algunas CGTasas pueden llevar a cabo, aunque pobremente, reacciones de hidrólisis de enlaces  $\alpha$ -1-4.

Sin embargo, estas enzimas comparten varias características. El mecanismo catalítico generalmente aceptado para las enzimas de esta familia es el de doble desplazamiento con retención de la configuración  $\alpha$ - del carbono anomérico. El mecanismo involucra dos residuos catalíticos en el sitio activo: un ácido glutámico que funciona como catalizador ácido/base y un aspartato que funciona como nucleófilo. Hay un segundo aspartato altamente conservado que, si bien no tiene un papel directo en la catálisis, sí desempeña una función importante en la distorsión del sustrato. En el sitio catalítico están presentes otros

aminoácidos conservados que juegan un papel importante en el posicionamiento del sustrato en la orientación adecuada, la orientación adecuada del nucleófilo, la estabilización del estado de transición y la polarización de la estructura electrónica del sustrato.

Todas las enzimas de esta familia conservan el dominio catalítico A (barril TIM), sin embargo, a este dominio catalítico pueden estar unidos diferentes dominios o sitios adicionales de unión a sustrato, lo que explica la variabilidad de especificidades de reacción que despliegan las distintas enzimas de la familia. Si bien todas las enzimas tienen los dominios A y B, se han identificado otros 9 dominios en la familia de la  $\alpha$ -amilasa (Reddy *et al.*, 2003; McGregor *et al.*, 2001).

En 1995, Janecek reportó la identificación de una quinta región conservada en la familia, evidenciada inicialmente en la secuencia de  $\alpha$ -amilasas. Dicha región se encuentra localizada afuera del dominio catalítico, específicamente en el dominio B y contiene un ácido aspártico altamente conservado, principalmente involucrado en la unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (Janecek, 1995). De hecho, varias enzimas pertenecientes a la familia requieren de la presencia de iones de calcio para desempeñar su función, ejemplo de ello son las  $\alpha$ -amilasas; algunas de ellas también requieren iones cloruro (Janecek, 1997).

El conjunto de las enzimas que forman parte de esta familia son ampliamente utilizadas en diversas aplicaciones industriales, un ejemplo de ello es la industria del procesamiento de almidón para la producción de dextrinas, glucosa, jarabes altos en fructosa, ciclodextrinas, cicloamilosa y varios otros productos de diferente peso molecular.

## 2.2 $\alpha$ -Amilasas

Las  $\alpha$ -amilasas (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucahidrolasa, E.C. 3.2.1.1) son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza y catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos internos  $\alpha$ - 1,4 en polímeros de glucosa. La especificidad de una  $\alpha$ -amilasa, sin embargo, depende de su fuente y cada  $\alpha$ -amilasa produce una distribución característica de oligosacáridos a partir de la hidrólisis de almidón (MacGegor, E, 1988).

### 2.2.1 Estructura de las $\alpha$ -amilasas

Los estudios enfocados a la resolución de la estructura de las  $\alpha$ -amilasas bacterianas y de mamíferos, muestran que todas las  $\alpha$ -amilasas consisten de tres dominios, A, B y C. El dominio A tiene un plegamiento de barril TIM o barril  $(\beta/\alpha)_8$ ; que forma el centro de la molécula y contiene el sitio catalítico. Este plegamiento es común en una gran cantidad de



enzimas con muy distintas especificidades y actividades y consta típicamente de 250 residuos de aminoácidos, formando ocho hebras  $\beta$  paralelas cubiertas por ocho  $\alpha$ -hélices encontradas en el exterior del barril; esto es, ocho repeticiones de unidades ( $\beta\alpha$ ). En la figura 2.3 se muestra un modelo de la estructura tridimensional del TIM barrel de la triosa fosfato isomerasa.

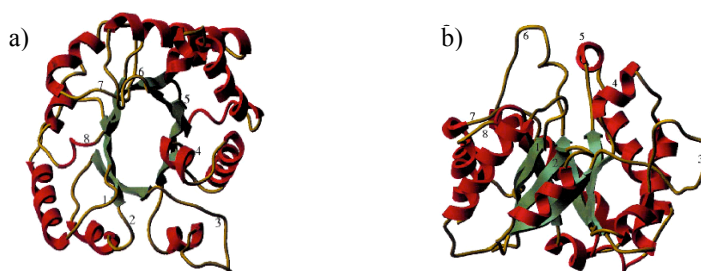


Fig 2.3. a) Vista desde arriba del TIM barrel de la triosa fosfato isomerasa, b) Vista de lado del TIM barrel de la triosa fosfato isomerasa (Wierenga, R, 2001).

Este dominio catalítico contiene los tres residuos catalíticos del sitio activo: Asp231, Glu261 y Asp328 (numeración de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* –BLA-) (Nielsen *et al.*, 2000).

Los dominios B y C se encuentran localizados en extremos opuestos del barril TIM.

El dominio B forma una protuberancia o “loop” entre la tercera hebra  $\beta$  y la tercera  $\alpha$ -hélice del barril TIM y varía sustancialmente en tamaño, secuencia y estructura entre las diferentes  $\alpha$ -amilasas. Consta de 40-250 residuos de aminoácidos y algunos tipos de dominio B contienen varias hebras  $\beta$  y una o dos  $\alpha$ -hélices. Este dominio se ha relacionado con las diferencias en especificidad de sustrato entre distintas  $\alpha$ -amilasas (Janecek *et al.*, 1997).

Por último, el dominio C constituye el extremo carboxilo terminal de la secuencia, consiste de hebras  $\beta$  antiparalelas y se ha relacionado con la capacidad de unión a sustrato (van der Veen *et al.*, 2000).

En la figura 2.4 se esquematiza la estructura de las  $\alpha$ -amilasas y se ejemplifica con el modelo tridimensional de la  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae*, una de las enzimas utilizadas en el presente proyecto, con estructura terciaria determinada.

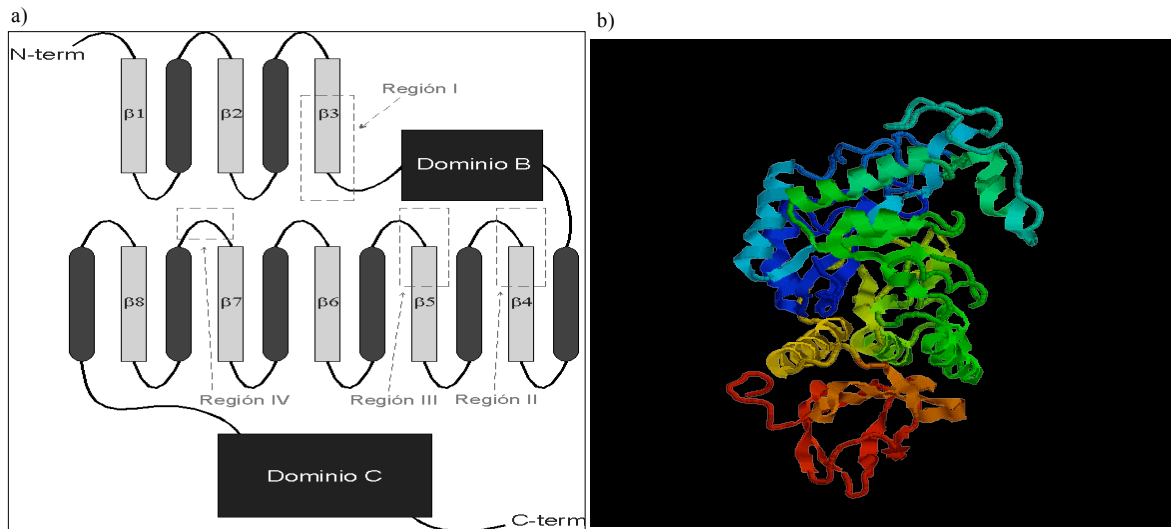


Figura 2.4. a) Esquema de la estructura de las  $\alpha$ -amilasas (Nielsen *et al.*, 2000), b) Modelo de la estructura tridimensional de la  $\alpha$ -amilasa de *A. oryzae*.

Como ya se mencionó anteriormente, las  $\alpha$ -amilasas, al igual que el resto de las enzimas de la familia de la  $\alpha$ -amilasa, contienen cinco regiones altamente conservadas con los residuos directamente involucrados en la catálisis, ya sea por medio de unión a sustrato, ruptura de enlace, estabilización del estado de transición o como ligandos de iones calcio; dichas regiones se encuentran en los loops que unen a las hebras  $\beta$  con las  $\alpha$ -hélices. Se ha encontrado que un ácido glutámico y dos aspárticos son esenciales para la actividad catalítica de las  $\alpha$ -amilasas (Kuriki *et al.*, 1999; van der Veen, *et al.*, 2000).

En la figura 2.5 se muestran cuatro de estas regiones altamente conservadas en distintas enzimas pertenecientes a la familia de la  $\alpha$ -amilasa.

Enzima	Origen	Región 1					Región 2					Región 3					Región 4												
$\alpha$ -Amilasa	<i>A. oryzae</i>	117	D	V	A	N	H	202	G	L	R	I	D	T	V	K	H	230	E	V	L	D	292	F	V	E	N	H	D
CGTasa	<i>B. macerans</i>	135	D	F	P	N	H	225	G	I	R	F	D	A	V	K	H	259	E	W	F	L	324	F	I	D	N	H	D
Pululanasa	<i>K. aerogenes</i>	600	D	V	Y	N	H	671	G	F	R	F	D	L	M	G	Y	704	E	G	W	D	827	Y	V	S	K	H	D
Isoamilasa	<i>P. Amylodecamosa</i>	292	D	V	Y	N	H	371	G	F	R	F	D	L	A	S	V	435	E	P	W	A	505	F	I	D	V	H	D
Enzima ramificante	<i>E. coli</i>	335	D	W	P	G	H	401	A	L	R	V	D	A	V	A	S	458	E	E	S	T	521	L	P	L	S	H	D
Neopululanasa	<i>B. stearothermophilus</i>	242	D	A	F	N	H	324	G	W	R	L	D	V	A	N	E	357	E	I	W	H	419	L	L	G	S	H	D
$\alpha$ -Amilasa-pululanasa	<i>C. thermohydroaulfulcum</i>	488	D	G	F	N	H	594	G	W	R	L	D	V	A	N	E	627	E	N	W	N	699	L	L	G	S	H	D
$\alpha$ -Glucosidasa	<i>S. carlsbergensis</i>	106	D	L	I	N	H	210	G	F	R	I	D	T	A	G	L	276	E	V	A	H	344	Y	I	E	N	H	D
Ciclodextrinasa	<i>T. ethanolicus</i>	238	D	A	F	N	H	321	G	W	R	L	D	V	A	N	E	354	E	V	W	H	416	L	I	G	S	H	D
Oligo-1,6-glucosidasa	<i>B. cereus</i>	98	D	L	V	N	H	195	G	F	R	M	D	V	I	N	F	255	E	M	P	G	324	Y	W	N	N	H	D
Dextran glucosidasa	<i>S. mutans</i>	98	D	L	V	N	H	190	G	F	R	M	D	V	I	D	M	236	E	T	W	G	308	F	W	N	N	H	D
Amilomaltasa	<i>S. pneumoniae</i>	224	D	M	A	N	D	291	I	V	R	I	D	H	F	R	G	332	E	E	L	G	391	Y	T	G	T	H	D
Enzima desramificante de glicógeno	<i>Humano</i>	298	D	V	Y	N	H	504	G	V	R	L	D	N	C	H	S	534	E	L	F	T	603	M	D	I	T	H	D

Figura 2.5. Regiones invariables en enzimas pertenecientes a la familia de la  $\alpha$ -amilasa. Los tres residuos catalíticos invariables se muestran con un círculo abierto (Kuriki et al., 1999).

Las  $\alpha$ -amilasas contienen un ion calcio conservado localizado en la interfase entre los dominios A y B. Se sabe que este ion es esencial para la estabilidad y actividad de la enzima. Se ha sugerido que el ion calcio es meramente estructural ya que se encuentra demasiado alejado del sitio activo para participar directamente en la catálisis. Uno o más iones adicionales de calcio se han encontrado en varias estructuras. Por otro lado, varias  $\alpha$ -amilasas contienen un ion cloruro en el sitio activo y se ha demostrado que dicho ion aumenta la eficiencia catalítica de la enzima, probablemente elevando el pKa del residuo donador de hidrógeno en el sitio activo.

La hendidura del sitio activo de las  $\alpha$ -amilasas se encuentra localizado en la interfase entre el dominio A y el dominio B y se encuentra en el extremo carboxilo terminal del barril TIM. Por medio de estructuras de rayos X de  $\alpha$ -amilasas en complejo con el inhibidor pseudo-tetrasacárido acarbosa, se ha demostrado que esta hendidura de unión puede acomodar de 4 a 10 unidades de glucosa aproximadamente (dependiendo de la especie). Cada unidad de glucosa es unida por ciertos residuos de aminoácidos; estos aminoácidos constituyen así el subsitio de unión para esa unidad de glucosa (Nielsen *et al.*, 2000). Davies *et al.* (1997) definieron a un subsitio como aquél que une una unidad de glucosa. Los subsitios en el sitio activo se encuentran numerados de acuerdo a la localización del punto de corte, de este modo, los subsitios con número negativo se encuentran del lado no reductor del enlace de corte, mientras que los subsitios con número positivo se encuentran del lado reductor de dicho sitio, tal y como se muestra en la figura 2.6.

Por lo general, en las  $\alpha$ -amilasas existen dos o tres subsitios presentes en el extremo reductor del sitio de corte (subsitios +1, +2 y +3), mientras que el número de subsitios en el extremo no reductor del corte varía entre 2 y 7 (Davies *et al.*, 1997).

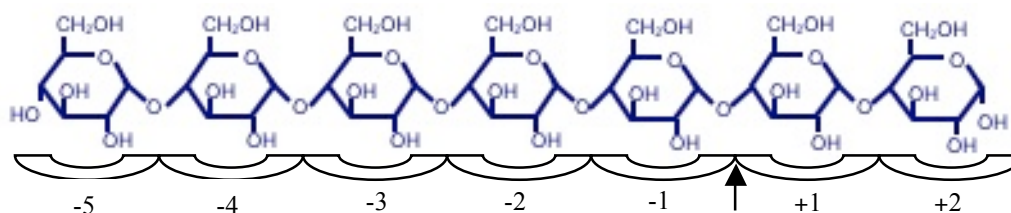


Figura 2.6. Nomenclatura de los subsitios en el sitio activo de las  $\alpha$ -amilasas. El extremo no reductor del carbohidrato se encuentra del lado izquierdo. La flecha indica el sitio de corte.

Los diferentes patrones de acción de las  $\alpha$ -amilasas han sido explicados a partir del número de subsitios en el sitio activo de la enzima, así como las distintas afinidades de cada uno de los subsitios por el residuo glucosilo que une.

### 2.2.2 Mecanismo catalítico de las $\alpha$ -amilasas

Las  $\alpha$ -amilasas cortan enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4 con una retención neta de la configuración del carbono anomérico, por lo que el extremo reductor formado después del corte del sustrato es liberado en la configuración  $\alpha$ . Este mecanismo es compartido por todas las glicosidasas que retienen la configuración del carbono anomérico (fig. 2.1) y consta de tres pasos. El primer paso es la protonación del oxígeno glicosídico por un donador de protón (Glu) seguido de un ataque nucleofílico en el C1 del residuo de glucosa ubicado en el subsitio -1, dicho ataque se encuentra a cargo del nucleófilo catalítico (Asp). Después de que la parte “aglicón” del sustrato es liberada, una molécula de agua es activada, presumiblemente por el Glu, ahora desprotonado. Esta molécula de agua hidroliza el enlace covalente existente entre el oxígeno del nucleófilo y el C1 del residuo de glucosa, completando así el ciclo catalítico. El tercer ácido conservado en el sitio activo, otro residuo Asp, no juega un papel directo en el mecanismo catalítico, pero se sabe que es importante para la catálisis ya que se encuentra involucrado en la unión y distorsión del sustrato, así como en la elevación del pKa del residuo Glu por medio de interacciones electrostáticas (Nielsen *et al.*, 2000).

### 2.2.3 $\alpha$ -Amilasas licuefactantes y sacarificantes

Las  $\alpha$ -amilasas pueden clasificarse como licuefactantes o sacarificantes en función del poder reductor que generan en la hidrólisis exhaustiva del almidón. Las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes producen un incremento en el poder reductor de aproximadamente el doble del producido por las enzimas licuefactantes para una misma conversión de almidón; de esta manera, mientras que las últimas generan oligosacáridos de cuatro o más unidades de glucosa como productos de la hidrólisis, las sacarificantes son capaces de generar productos de menor peso molecular como G2 y G3. Por lo general, las  $\alpha$ -amilasas licuefactantes son de origen bacteriano (ej. *B. licheniformis* y *B. stearothermophilus*) mientras que las sacarificantes son de origen fungal (ej. *A. niger* y *A. oryzae*). Se ha demostrado que son sobre todo las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes las que pueden llevar a cabo reacciones de transferencia, además de la reacción principal de hidrólisis (Saab-Rincón *et al.*, 1999).

### 2.2.4 Sacarificación como resultado de la combinación de las actividades hidrolítica y transglicosídica de algunas $\alpha$ -amilasas.

Como ya se mencionó, existen enzimas exo-amilolíticas que hidrolizan el almidón a partir del extremo no reductor generando principalmente maltosa y glucosa, ejemplo de ello son la  $\beta$ -amilasa (familia 14 de las glicosidasas) y la glucoamilasa (familia 15). La generación de productos de bajo peso molecular en estos casos resulta lógica. A pesar de que las  $\alpha$ -amilasas son endoenzimas que hidrolizan de manera azarosa, algunas de ellas, las sacarificantes, son capaces de generar productos de bajo peso molecular y son estas mismas amilasas las capaces de llevar a cabo reacciones de transglicosilación en adición a su reacción principal de hidrólisis.

Por otro lado, dentro de la familia de la  $\alpha$ -amilasa también se encuentran enzimas que son principalmente transglicosídicas, tal es el caso de la ciclodextrin-glicosil-transferasa (CGTasa), la cual genera ciclodextrinas a partir del almidón por medio de una transglicosilación intramolecular (van der Veen *et al.*, 2000).

En 1997, Del-Río *et al.* propusieron, a partir de un análisis filogenético, la hipótesis de que la  $\alpha$ -amilasa y la CGTasa divergieron de un ancestro común y que la CGTasa evolucionó a partir de la  $\alpha$ -amilasa para lograr una más eficiente degradación del almidón. Como hipótesis secundaria generada a partir del estudio experimental y de análisis de secuencias realizados, se propuso también que la combinación de las actividades de hidrólisis

y transferencia en las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes, es la responsable de la degradación más eficiente del almidón y por lo tanto de la producción de oligosacáridos de bajo peso molecular (Del-Río *et al.*, 1997).

Así, en una primera etapa del presente proyecto y con el objetivo de explorar el efecto de la combinación de las actividades de hidrólisis y de transferencia, se comparó el poder reductor y el perfil de productos resultantes del trabajo en conjunto de una  $\alpha$ -amilasa licuefactante (no transglicosídica) como la de *B. licheniformis* y una transferasa natural (CGTasa de *B. macerans*) con los obtenidos de las enzimas por separado, con el resto de las variables iguales, sobre la molécula de almidón.

### 2.2.5 Usos industriales de las $\alpha$ -amilasas

Las  $\alpha$ -amilasas son utilizadas en un considerable número de procesos industriales incluyendo el proceso de licuefacción de almidón dentro de la conversión de dicho sustrato en jarabes ricos en glucosa y fructosa. También son usadas como reemplazo parcial de la malta en la industria cervecera, para la mejora de harinas en la industria panadera y para la producción de almidones modificados en la industria del papel. Adicionalmente, son utilizadas para remover el almidón en la manufactura de textiles y como aditivos en detergentes (Gupta *et al.*, 2003; Kirk *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2000).

Dentro de las aplicaciones mencionadas, la industria del procesamiento de almidón es de las más importantes y actualmente requiere del uso de varias enzimas: el primer paso es la licuefacción del almidón a cargo de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, del cual se generan maltodextrinas de diversos pesos moleculares. Es importante hacer énfasis en la necesidad de gelatinizar el almidón para convertirlo en sustrato adecuado para las enzimas amilolíticas. La gelatinización del almidón es un proceso de hidratación y solubilización de los gránulos de dicho polímero a altas temperaturas (70-90°C) con la formación de una solución viscosa. Después de este paso prioritario y de la licuefacción del almidón, que involucra una hidrólisis parcial y una disminución de la viscosidad, la o las enzimas a utilizarse dependen del producto final que se desee obtener. Para la producción de glucosa, por ejemplo, se utiliza una glucoamilasa después del proceso de licuefacción para finalizar la hidrólisis y lograr la obtención de glucosa; si el producto final deseado es un jarabe alto en fructosa, se utiliza además la enzima glucosa isomerasa después del uso de la glucoamilasa (Crabb *et al.*, 1997; Haki *et al.*, 2003).

En este rubro en particular, sería altamente atractivo contar con una sola enzima capaz de hidrolizar el almidón hasta glucosa mayoritariamente y capaz también de llevar a

cabo el proceso de catálisis a las altas temperaturas requeridas en el proceso de la gelatinización del almidón.

En adición a las aplicaciones industriales ya mencionadas, las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes, gracias a su capacidad transglicosídica, tienen un gran potencial de aplicación en la obtención industrial de productos de transferencia específicos de alto valor agregado.

### 2.2.6 $\alpha$ -Amilasas en reacciones de transferencia

Si bien existen muchos reportes concernientes a la utilización de varias glicosidasas para llevar a cabo reacciones de transferencia, existen algunos inconvenientes en la utilización de dichas enzimas.

Dentro de las ventajas de la utilización de  $\alpha$ -amilasas para reacciones de transferencia, destaca el hecho de que por lo general las  $\alpha$ -amilasas son de alta disponibilidad comercial y actúan sobre almidón, sustrato ampliamente distribuido en la naturaleza o sobre sustratos originados de éste y fácilmente obtenibles, como maltodextrinas, oligosacáridos, etc.

Debido a estas ventajas y dentro del rubro de la investigación de glicosidasas en reacciones de transferencia, existen varios reportes concernientes a este tipo de reacciones llevadas a cabo por  $\alpha$ -amilasas. A modo de ejemplo de estas investigaciones, podemos citar a Allen y Thoma que, en 1978, reportaron un estudio sobre la degradación de maltotriosa por la  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae*, proceso que, tal y como reportaron, involucra múltiples reacciones de transglicosilación (Allen, 1978). En 1990, Graber y Combes reportaron que esta misma enzima era capaz de utilizar maltotetraosa para llevar a cabo reacciones de transglicosilación y que su capacidad transglicosídica aumentaba con la concentración del sustrato.

Se ha reportado que la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis* es capaz de llevar a cabo reacciones de glicosilación de compuestos fenólicos como la hidroquinona a partir de maltopentaosa como donador de residuos glicosilo (Nishimura *et al.*, 1994).

Más recientemente, se reportó que la  $\alpha$ -amilasa pancreática humana es capaz de llevar a cabo reacciones de transglicosilación a partir de derivados nitrofenólicos de maltosa y maltotriosa (Damager *et al.*, 2004).

Por otro lado, también se han reportado  $\alpha$ -amilasas fungales capaces de llevar a cabo reacciones de alcoholólisis a partir de almidón con la generación de alquil-glicósidos, moléculas con capacidad surfactante y con potencial aplicación en diversos procesos industriales (Larsson *et al.*, 2005; Santamaría *et al.*, 1999) aunque, cabe señalar, que en el rubro específico de reacciones de alcoholólisis, las investigaciones que involucran  $\alpha$ -amilasas son muy escasas.



En el grupo de trabajo se ha investigado la capacidad para llevar a cabo reacciones de transglicosilación a partir de  $\alpha$ -amilasas, uno de los rubros estudiados es el de la generación de alquil-glicósidos, en el que se concluyó que las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes son las que llevan a cabo estas reacciones con mayor eficiencia. Sin embargo, tal y como se detallará más adelante en la sección de resultados, de estas investigaciones se concluyó que sería muy ventajoso contar con una  $\alpha$ -amilasa termofílica para llevar a cabo reacciones de transglicosilación y que sea capaz de utilizar sustratos distintos al almidón, ya que éste genera soluciones muy viscosas, de difícil manejo y caracterización.

### **2.2.7 $\alpha$ -Amilasas termofílicas**

Se han aislado  $\alpha$ -amilasas de una gran variedad de fuentes distintas como bacterias, hongos, plantas y animales. Existe un número sorprendentemente alto de microorganismos que sobreviven y, de hecho, están adaptados a la vida a temperaturas desde 60 hasta incluso más de 100°C. Estos organismos elaboran enzimas que son, en general, más activas a altas temperaturas y más termoestables que sus contrapartes mesófilas. En general, los microorganismos eucariotas no viven por arriba de los 60°C mientras que existen procariotas que pueden vivir incluso en temperaturas de ebullición. Así, no es de sorprenderse que de las  $\alpha$ -amilasas termofílicas que se han caracterizado, son más termoestables las procedentes de bacterias termofílicas que las de hongos termofílicos (Kindle, 1983).

La razón principal para seleccionar enzimas de organismos termofílicos es su alta estabilidad, característica que las hace atractivas para diversos procesos industriales. La utilidad de estas enzimas en distintas aplicaciones no se debe sólo a su termoestabilidad, sino también su mayor estabilidad ante otras condiciones extremas, como un pH alto o bajas concentraciones de agua (Haki *et al.*, 2003, Vieille *et al.*, 2001, Zentgraf, 1992). Por otro lado, es más probable que estas enzimas resistan la presencia de solventes orgánicos o detergentes en el medio de reacción y sean más resistentes ante ataques proteolíticos.

Una ventaja adicional del uso de estas enzimas es el riesgo reducido de contaminación de las soluciones de reacción; las temperaturas superiores a 70°C son suficientemente altas para eliminar prácticamente todas las bacterias patógenas que, por lo general, ocasionan problemas en procesos de alimentos. Por otro lado, el uso de enzimas termoestables en procesos de producción implica la ventaja de aminorar la viscosidad de los fluidos del proceso. Además, es posible la solubilización de una mayor cantidad de sustrato a altas temperaturas, lo cual puede cambiar el equilibrio de la reacción hacia mayores rendimientos de producto (Bruins *et al.*, 2001).

En la tabla 2.4, se resumen las propiedades de algunas  $\alpha$ -amilasas termofílicas de diferentes microorganismos.

Tabla 2.4.  $\alpha$ -Amilasas termofílicas de diferentes microorganismos, su temperatura y pH óptimos (Haki *et al.*, 2003, Kindle, 1983).

<b>Organismo</b>	<b>Temp. óptima (°C)</b>	<b>pH óptimo</b>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	70	7.0
<i>Bacillus licheniformis</i>	100	6.0-6.5
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70-80	5.0-6.0
<i>Bacillus subtilis</i>	70	7.0
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	55	5.5
<i>Myceliophthora thermophila</i>	100	5.6
<i>Pyrococcus furiosus</i>	100	5.5
<i>Pyrococcus woesei</i>	100	6.5-7.5
<i>Staphylothermus marinus</i>	65	5.0
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	-	-
<i>Thermococcus aggregans</i>	100	5.5
<i>Thermococcus celer</i>	90	5.5
<i>Thermococcus fumicolans</i>	95	4.0-6.3
<i>Thermococcus hydrothermalis</i>	85	4.8-7.8
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	60	5.6
<i>Thermococcus profundus</i>	80	4.0-5.0
<b><i>Thermotoga maritima AmyA</i></b>	85	7.0
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	70	5.0
<i>Thermonospora curvata</i>	65	5.5-6.0
<i>Thermonospora vulgaris</i>	60	6.0
<i>Aspergillus niger</i>	60	5.5-6.0

Dentro de las enzimas de la tabla 2.4, la  $\alpha$ -amilasa de *T. maritima*, además de ser de las más termofílicas, es una amilasa sacarificante y, por lo tanto, capaz de llevar a cabo reacciones de transferencia. Cabe mencionar además, que en el grupo de Ingeniería de Proteínas del IBt se cuenta con el genoma de *Thermotoga maritima* MSB8.

## 2.3 *Thermotoga maritima* MSB8.

*Thermotoga maritima* es una bacteria no formadora de esporas, con forma de barra y que pertenece al orden Thermotogales. Este microorganismo fue aislado originalmente de sedimentos marinos geotermales en Vulcano, Italia y tiene una temperatura de crecimiento óptima de 80°C. *T. maritima* es capaz de metabolizar muchos carbohidratos simples y compuestos incluyendo glucosa, sacarosa, almidón, celulosa y xilano (Huber *et al.*, 1986). El genoma de este microorganismo es un cromosoma circular único que consiste de 1,860,725 pares de bases y tiene un contenido promedio de G + C del 46%. Aproximadamente 25% del genoma es de naturaleza archea (Nelson *et al.*, 1999) y del total de sus 1917 genes, el 97% son genes codificantes de proteínas, de los cuales, el 67% tienen una categoría funcional asignada (<http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/GenomePage.cgi?org=btm>).

### 2.3.1 Enzimas amilolíticas de *Thermotoga maritima*

Dentro de los hipertermófilos con datos disponibles de secuencia genómica, *Thermotoga maritima* posee el mayor número de glicosidasas identificables y aparentemente tiene la capacidad enzimática para degradar una gran variedad de  $\alpha$ - y  $\beta$ - glucanos, así como varias hemicelulosas (Chhabra *et al.*, 2002). La tabla 2.5 resume algunas de las glicosil hidrolasas identificadas, caracterizadas y producidas por esta bacteria.

Tabla 2.5 . Glicosil hidrolasas de la bacteria hipertermofílica *Thermotoga maritima*.

<i>Familia</i>	<i>Enzima</i>	<i>Referencia</i>
2	$\beta$ -galactosidasa	Kim <i>et al.</i> , 2004
	$\beta$ -manosidasa	Bauer <i>et al.</i> , 1998
	$\beta$ -glucuronidase	Salleh <i>et al.</i> ; 2006
3	$\beta$ -glucosidasa	Goyal <i>et al.</i> , 2001
4	$\alpha$ -glucosidasa	Lodge <i>et al.</i> , 2003
10	Xilanasa A	Wassenberg <i>et al.</i> , 1997
	Xilanasa B	Jiang <i>et al.</i> , 2004
12	Endoglucanasa A	Lieb <i>et al.</i> , 1996
	Endoglucanasa B	Lieb <i>et al.</i> , 1996
13	<b><math>\alpha</math>-amilasa AmyA</b>	<b>Liebl <i>et al.</i>, 1997</b>
	$\alpha$ -amilasa AmyB	Lim <i>et al.</i> ; 2003
	Pululanasa	Kriegshäuser <i>et al.</i> , 2000
	$\alpha$ -4-glucan glucotransferasa	Roujeinikova <i>et al.</i> , 2002

16	Laminarinasa	Bronnenmeier <i>et al.</i> , 1995
32	$\beta$ -fructosidasa	Alberto <i>et al.</i> ; 2003
36	$\alpha$ -galactosidasa	Comfort <i>et al.</i> , 2007
38	$\alpha$ -manosidasa	Nakajima <i>et al.</i> , 2006
57	$\alpha$ -amilasa AmyC	Ballschmitter <i>et al.</i> , 2006
		Dickmanns <i>et al.</i> , 2006
¿?	$\alpha$ -glucuronidasa	Suresh <i>et al.</i> , 2003

### 2.3.2 $\alpha$ -Amilasa de *T. maritima* (Amy A)

En 1997, Liebl y colaboradores reportaron la identificación y caracterización parcial de la  $\alpha$ -amilasa de *T. maritima* AmyA, una enzima capaz de generar productos de bajo peso molecular a partir de la hidrólisis del almidón a temperaturas de 80-85°C. Los autores lograron la expresión de la enzima en *E. coli* y la reportaron como una proteína de 553 aminoácidos y una masa molecular de 64, 706 Da. Los 18 residuos del extremo amino terminal aparentemente representan un péptido señal para la iniciación de la translocación a través de la membrana citoplásmica. Dicha secuencia está compuesta mayoritariamente de residuos cargados positivamente seguidos de aminoácidos hidrofóbicos. Por otro lado, reportaron que la enzima es capaz de hidrolizar amilosa, almidón y amilopectina, mientras que no hidroliza el pululano. Los productos principales de la hidrólisis de amilosa y almidón resultaron ser glucosa y maltosa. La máxima actividad registrada por los autores fue bajo condiciones de pH 7 y temperatura de 85-90°C. La actividad enzimática resultó ser dependiente de calcio como ocurre con una gran cantidad de  $\alpha$ -amilasas, aunque una adición de calcio a una concentración de 10 mM resultó en una inhibición de la actividad a 80°C. Por otro lado, los autores reportaron también un aumento de actividad enzimática al añadir NaCl al medio de reacción (Lieb *et al.*, 1997).

En la búsqueda de una  $\alpha$ -amilasa con potencial para llevar a cabo reacciones de transferencia bajo distintas condiciones de reacción, AmyA es sin duda una posibilidad atractiva a explorar debido no sólo a que es una enzima sacrificante –condición que, como ya se discutió anteriormente, es necesaria para poder llevar a cabo reacciones de transferencia-, sino también a su carácter termófilo, asociado también a una mayor estabilidad a distintas condiciones del medio de reacción.

Así, la mayor parte del presente proyecto se enfocó en la caracterización de AmyA en reacciones de transferencia resultando ser, como se reportará posteriormente, una enzima con gran capacidad y versatilidad transglicosídica.

Debido a que esta enzima no se encuentra disponible comercialmente y el cultivo de *T. maritima* es particularmente difícil por las condiciones de alta temperatura, alta presión y anaerobiosis necesarias y, por otro lado, a que es sabido que los niveles de expresión de la enzima en el microorganismo son bajos, resulta evidente que para la realización de este estudio, es necesaria la expresión heteróloga de la enzima.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Estudiar la capacidad transglicosídica de distintas enzimas amilolíticas y su relación con una degradación más eficiente del almidón y la capacidad para la formación de glucósidos.

#### **3.2 Objetivos particulares**

- Estudiar el efecto de combinar las actividades de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* y la CGTasa de *B. macerans* sobre los productos de degradación del almidón.
- Aprovechar la actividad de transglicosilación de las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes en reacciones de alcoholólisis con almidón y maltodextrinas.
- Analizar el tipo de productos y la especificidad de las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes en presencia de almidón, maltodextrinas y oligosacáridos.
- Identificar productos de interés, generados en las reacciones antes mencionadas.

## **4. HIPÓTESIS**

La combinación de las actividades hidrolítica y transglicosídica provenientes de dos enzimas o presentes en una sola, resulta en una degradación más eficiente del almidón y dicha actividad transglicosídica permite la formación compuestos glicosidados de diversa índole.

## 5. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 5.1 Enzimas y reactivos

- $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, Termamyl 120L de Novozymes A/S (D.F., México)
- CGTasa de *B. macerans* de Amano (Elgin, IL, USA)
- $\alpha$ -amilasa de *A. niger*, Suavizyme
- Almidón soluble, Sigma Aldrich S9765 (St. Louis, MO, USA)
- Maltodextrinas (Amidex, 20 DE) de Productos Arancia (Edomex, México)
- $\alpha$ - y  $\beta$ - ciclodextrinas de AMAIZO (Hammond, IN, USA)
- Glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa y maltoheptaosa, Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

### 5.2 Actividad enzimática

La actividad enzimática de las  $\alpha$ -amilasas se determinó mediante la cuantificación del poder reductor liberado a partir de almidón por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) con glucosa como estándar (Rivera *et al.*, 2003). Las reacciones se llevaron a cabo en una solución (10.5 ml) de almidón 1.2% w/v (12 mg/ml). Para la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* se utilizó buffer de fosfatos 30 mM y  $\text{CaCl}_2$  3mM a 60°C y pH 6; para la  $\alpha$ -amilasa de *A. niger* se utilizó buffer de acetatos 50 mM a 60°C y pH 4 y, finalmente, para la  $\alpha$ -amilasa de *T. maritima* se utilizó buffer TRIS-BIS-HCl 50 mM con 150 mM de NaCl y 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  a 85°C y pH 7.

El monitoreo se realizó cada dos minutos durante los primeros 10 minutos de la reacción. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de glucosa por minuto. Cabe aclarar que el método de DNS se utilizó en el presente proyecto para medir la actividad de las  $\alpha$ -amilasas, con el objetivo de estandarizar dicha actividad en las reacciones.

Por otro lado, la actividad de la CGTasa se midió por el decremento del color del yodo con amilosa en función del tiempo. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de producir una reducción del 1% de absorbancia ( $A_{660}$ ) por minuto (Terada *et al.*, 2001).



### **5.3 Determinación de proteína**

La determinación de la concentración de proteína de las  $\alpha$ -amilasas se llevó a cabo por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) con albúmina sérica bovina como proteína estándar.

### **5.4 Combinación de las actividades hidrolítica y transglicosídica de la $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* y la CGTasa de *B. macerans*.**

La actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* fue de 13.18 U/ml, mientras que la actividad de la CGTasa de *B. macerans* resultó ser de 6.8 U/ml.

Se llevaron a cabo reacciones con la  $\alpha$ -amilasa y la CGTasa por separado, así como con una combinación de ambas. Todas las reacciones con almidón se llevaron a cabo en una solución de almidón al 1.2% w/v en buffer de fosfatos 30 mM y  $\text{CaCl}_2$  3mM, en un volumen total de 10 ml a 60°C y pH 6. La  $\alpha$ -amilasa se añadió a una concentración de 0.1  $\mu\text{l/ml}$  y la CGTasa a 0.6  $\mu\text{l/ml}$ . El monitoreo de la reacción se realizó durante 30 minutos (después del cual no se observó aumento en azúcares reductores). Las reacciones con maltodextrinas (20 DE) se llevaron a cabo a una concentración de 15% w/v (150 mg/ml) bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para las reacciones con almidón. Los productos de todas las reacciones fueron analizados por HPLC.

### **5.5 Caracterización de reacciones de transferencia con la $\alpha$ -amilasa de *A. niger* a partir de almidón y maltodextrinas.**

#### **5.5.1 Perfil de productos de hidrólisis a partir de maltodextrinas**

Se determinó el perfil de productos obtenidos de las reacciones de hidrólisis con la  $\alpha$ -amilasa de *A. niger* a partir de maltodextrinas al 15% w/v en buffer de acetatos 50 mM (pH 4) y un volumen total de 10 ml. La enzima se añadió a concentraciones de 6.5, 9.1 y 12.1 mg de proteína / ml de reacción y la reacción se mantuvo a 60 °C durante 5 horas. Los compuestos obtenidos fueron analizados por cromatografía en capa fina.

### 5.5.2 Reacciones de alcoholólisis a partir de metanol y almidón /maltodextrinas

Se llevaron a cabo reacciones de alcoholólisis a partir de almidón al 6% w/v y 20% v/v de metanol en un volumen total de 10 ml de buffer de acetatos 50 mM (pH 4) y una concentración de enzima de 6 mg de proteína /ml, a 60 °C. Por otro lado, las reacciones de alcoholólisis con maltodextrinas se realizaron bajo las mismas condiciones descritas en este mismo inciso de pH y temperatura, pero con una concentración inicial de maltodextrinas del 15% w/v, concentración de la enzima 9 mg de proteína / ml de reacción y concentraciones iniciales de metanol de 1, 3, 5, 10, 20, 30 y 40% v/v. En todos los casos la reacción continuó durante cinco horas, después de las cuales los productos de reacción fueron analizados por cromatografía en capa fina.

## 5.6 Caracterización de las reacciones de transferencia con la $\alpha$ -amilasa de *Thermotoga maritima* (Amy A).

### 5.6.1 Amplificación del gen

La librería de DNA de *Thermotoga maritima* fue generosamente provista por el Dr. Enrique Morett. Tomando como base la secuencia de la enzima y los procedimientos reportados por Liebl *et al.* (1997), se diseñaron los siguientes oligos:

5'CGG AGG CAT ATG AAG GTT GTG AAG AAG CC 3'

5'CGA TCC AAG CTT CAC TTT TTG AAA ATG TAC GC 3'

Las líneas continúa y punteada subrayan los sitios de corte de las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*, respectivamente.

Con estos oligos sintetizados y el templado de DNA, se llevó a cabo una reacción de PCR con Expand ®, que además de la polimerasa, posee una enzima de corrección. El producto de PCR fue purificado del medio de reacción con un kit de purificación de productos amplificados por PCR, marca Roche.

### 5.6.2 Clonación en un vector de expresión

Se construyó un plásmido a partir de la inserción del producto de PCR en el vector pET3a de Novagen. El vector pET 3a con que se contaba tenía un inserto que no era de nuestro interés, sin embargo, con el objetivo de obtener suficiente cantidad del vector, se transformaron

por electroporación células de *E. coli* XLBue (Stratagene) con este plásmido. Las células transformadas se recuperaron y se sembraron en medio LB líquido con 200 µg/ml de ampicilina. Después de una incubación a 37°C durante aproximadamente 10 horas, se centrifugó el medio y se purificó el plásmido con un kit de purificación. Posteriormente, se llevaron a cabo las reacciones de digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* tanto del inserto como del plásmido; en este último caso, se logró obtener el vector pET3a sin ningún inserto para la posterior ligación con el inserto de interés.

El vector (de aproximadamente 4500 pb) se purificó con un gel de agarosa preparativo y un kit de purificación después de lo cual se llevó a cabo una reacción de desfosforilación del vector con fosfatasa alcalina y un nuevo paso de purificación. Una vez que se contaba con el inserto (*amy A*) y el vector pET3a puros, se llevó a cabo la reacción de ligación con la enzima ligasa y una incubación de aproximadamente 12 horas a 16°C. Las ligaciones se concentraron con butanol, después de lo cual se llevó a cabo una centrifugación, se removió la mayor parte del líquido y las muestras se secaron y se resuspendieron en 5 µl de agua.

### **5.6.3 Transformación en *E. coli***

Se realizó una electroporación a células de *E. coli* XL1 Blue con 2 µl de la muestra obtenida de la ligación. Las células electroporadas se recuperaron con 1 ml de medio LB y se incubaron a 37°C durante 1 hora. De este cultivo, se platearon 100 ml a cajas con LB y 200 µg/ml de ampicilina y dichas cajas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

De las colonias que crecieron, se seleccionaron cinco al azar y se transfirieron a medio LB líquido; después de un período de incubación se realizó una reacción de PCR de colonia. De las reacciones de PCR realizadas provenientes de cinco colonias diferentes, cuatro generaron productos de PCR del tamaño esperado (1.5 Kb). Por último, se llevó a cabo una transformación de células de *E. coli* BL21 con el plásmido purificado.

### **5.6.4 Expresión de la proteína y ensayo de actividad**

Las células de *E. coli* BL 21 transformadas con el plásmido purificado se recuperaron con 1 ml de medio LB y se sembraron en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina (200 µg/ml); las células se incubaron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.4, después de lo cual se indujeron con IPTG a una concentración final de 0.5 mM. Las células fueron incubadas toda la noche a 30°C. Se tomó 1 ml del cultivo y se centrifugó a 3800 rpm durante 15 minutos a 4°C; después de eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 100 µl de agua y se realizó una sonicación. Después de este proceso, las muestras se prepararon para

llevar a cabo una electroforesis SDS-PAGE (adición del buffer de carga y calentamiento a 90°C durante 5 minutos). Se llevó a cabo una segunda centrifugación a 14000 rpm durante 1 minuto. Se cargaron 5 µl del sobrenadante en el gel de electroforesis (fracción soluble) y, por otro lado, se cargaron 5 µl de la solución resultante de la resuspensión del pellet (fracción insoluble).

Después de comprobar que la enzima se encontraba en la fracción soluble, se realizó un ensayo de actividad a partir de almidón. Se centrifugaron 5 ml de cultivo y se separaron las células para un proceso de sonicación en un volumen final de 250 µl. Posteriormente, se tomaron 100 µl del extracto enzimático y se añadieron a una solución de almidón al 4% w/v en buffer BIS-Tris 50 mM, pH 7, con 2 mM de CaCl<sub>2</sub> y 150 mM de NaCl. La reacción se llevó a cabo a 80°C durante 3 horas. Los productos de reacción fueron analizados por cromatografía en capa fina en la cual se observó una actividad enzimática sacarificante.

### **5.6.5 Purificación de la enzima**

Se llevó a cabo una transformación de células *E. coli* BL 21 con el plásmido de interés purificado y las células se incubaron en 100 ml de medio LB con ampicilina (200 µg/ml) a 37°C hasta alcanzar una D.O. de 0.4-0.7 (600 nm). Con este cultivo se inoculó 1 L de medio LB con la misma concentración de ampicilina a la misma temperatura y hasta alcanzar una D.O. de 0.5-0.7 (600 nm). La inducción de la enzima se realizó con IPTG (50 mM) y el cultivo se incubó a 30°C durante 5 horas. Después de este tiempo, se llevó a cabo una centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C y las células así separadas fueron resuspendidas en 12 ml de buffer BIS-TRIS- HCl 50 mM con 1 mM de CaCl<sub>2</sub> y 1 mM de NaCl a pH 7. Después de un proceso de sonicación, se realizó una centrifugación a 8000 rpm durante 30 min a 4°C y se deshechó el pellet. El sobrenadante fue sometido a un tratamiento térmico a 70°C durante 30 min y después de otra etapa de centrifugación a 8000 rpm durante 15 min a 4°C, se recuperó nuevamente el sobrenadante. Se realizó una diálisis de la muestra en una bolsa de diálisis con límite máximo de poro de 30 KDa; la muestra se mantuvo en este proceso durante 12 horas a 4°C, con agitación constante. Una vez terminado el proceso de diálisis, se llevó a cabo una precipitación con sulfato de amonio al 75%, la muestra se mantuvo con la sal a agitación constante durante 2 h y posteriormente se sometió a una centrifugación a 3900 rpm, durante 10 min y a 4°C.

El último paso de purificación correspondió a una cromatografía por filtración en gel, para la cual se utilizó una columna de Superosa y se eluyó la muestra con buffer TRIS- BIS-HCl 50 mM, con 1 mM de NaCl y 1 mM de CaCl<sub>2</sub> a un flujo de 0.3 ml/min (0.95 MPa). De las fracciones obtenidas, se seleccionaron las fracciones correspondientes a los picos más

altos del cromatograma. Así, se realizó un ensayo cualitativo de actividad con 20  $\mu$ l de 7 fracciones distintas en una solución de 0.5 ml de almidón al 6%. Se llevó a cabo un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las fracciones en donde se registró actividad, así como de la muestra obtenida antes de la cromatografía y en dicho gel se observó una banda mayoritaria correspondiente a 60 KDa. Por último, se determinó el contenido de proteína y la actividad específica de la enzima purificada, tal y como se describió en los apartados correspondientes.

### **5.6.6 Perfil de productos a partir de almidón y maltodextrinas**

Se determinó el perfil de productos obtenidos de las reacciones de hidrólisis con la  $\alpha$ -amilasa de *T. maritima* a partir de almidón y maltodextrinas en un Thermomixer Compact (Eppendorf). Los sustratos fueron hidrolizados a concentraciones iniciales de 1.2, 2, 4 y 6% w/v de almidón ó 2, 6 y 15% w/v de maltodextrinas en 1 ml de buffer TRIS-BIS-HCl 50 mM con 150 mM de NaCl y 2 mM de CaCl<sub>2</sub> a 85 °C y pH 7 utilizando 0.5 U/ml de la enzima. Después de 24 h de reacción, los productos generados fueron analizados por CCF y HPLC. Las condiciones específicas para cada una de estas metodologías de análisis, se detallan posteriormente, en los apartados correspondientes.

### **5.6.7 Reacciones de transglicosilación a partir de maltosa.**

Las reacciones de transglicosilación a partir de maltosa se llevaron a cabo utilizando 1 U/ml de Amy A en un Thermomixer Compact (Eppendorf) en una solución de 1 ml de buffer TRIS-BIS-HCl 50 mM con 150 mM de NaCl y 2 mM de CaCl<sub>2</sub> a 85 °C y pH 7, con concentraciones iniciales de maltosa de 6 y 15% w/v. Se tomaron muestras de las reacciones durante 24 h y los productos generados fueron analizados por CCF y HPLC.

### **5.6.8 Reacciones de transglicosilación a partir de malto-oligosacáridos.**

Se utilizaron malto-oligosacáridos puros de 2 a 7 unidades de glucosa como sustratos de AmyA en reacciones de transferencia. Cabe aclarar aquí que cuando hablamos de G2, G3, G4, etc. como sustratos, nos referimos a maltosa, maltotriosa y maltotetraosa puros, respectivamente. Sin embargo, al hablar de G2, G3, etc., como productos de las reacciones de Amy A, nos es imposible referirnos a los malto-oligosacáridos puros ya que, como se demostrará más adelante, la enzima es capaz de generar disacáridos distintos a la maltosa, así como también probablemente malto-oligosacáridos de mayor peso molecular distintos a la

maltotriosa, maltotetraosa, etc. Así, cuando hablamos de productos de Amy A, G2 implica la presencia de disacáridos, G3 de trisacáridos y así sucesivamente.

Se llevaron a cabo reacciones de transglicosilación a partir de G2, G3, G4, G5, G6 y G7 utilizando 1 U/ml de la enzima en un Thermomixer Compact (Eppendorf) en una solución de 1 ml de buffer TRIS-BIS-HCl 50 mM con 150 mM de NaCl y 2 mM de CaCl<sub>2</sub> a 85 °C y pH 7. La concentración inicial del oligosacárido puro en la reacción correspondiente fue de 2% w/v. Se tomaron muestras de las reacciones después de 10 min y 24 y 48 h y los productos fueron analizados por CCF y HPLC. Se llevó también a cabo una reacción con Amy A utilizando maltosa al 6% w/v y G7 al 2% w/v en la misma reacción bajo las mismas condiciones descritas para las demás reacciones de transglicosilación. Las muestras fueron analizadas cada diez minutos durante una hora y después de 10 horas, por cromatografía en capa fina.

### **5.6.9 Determinación de la presencia de neotrehalosa como producto en las reacciones de transferencia**

Para la identificación de la neotrehalosa generada por Amy A en reacciones de transferencia, se llevó a cabo una reacción con G2 al 15% w/v y G7 al 2% w/v con 10 U/ml de la enzima en un Thermomixer Compact (Eppendorf) en una solución de 1 ml de buffer TRIS-BIS-HCl 50 mM con 150 mM de NaCl y 2 mM de CaCl<sub>2</sub> a 85 °C y pH 7 y los resultados fueron analizados por HPLC, tal y como se describe en el apartado correspondiente. La purificación del producto se llevó a cabo a partir de una segunda reacción bajo las mismas condiciones que la primera descrita, seguida de una reacción con la enzima glucoamilasa (sección 4.6.14) y la inyección de la reacción en el equipo de HPLC con una columna preparativa bajo las condiciones que se describirán más adelante. Se llevó a cabo una reacción con maltosa al 6% w/v, con 10 U/ml de la enzima en un Thermomixer Compact (Eppendorf) en una solución de 1 ml de buffer TRIS-BIS-HCl 50 mM con 150 mM de NaCl y 2 mM de CaCl<sub>2</sub> a 85 °C y pH 7 y la neotrehalosa y demás disacáridos resultantes fueron cuantificados por HPLC. Dicha cuantificación volvió a llevarse a cabo después de la reacción de los productos con la enzima glucoamilasa.

### **5.6.10 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para la identificación de neotrehalosa**

El análisis por RMN registró en un Espectrómetro RMN Varian Unity a 400 MHz para <sup>1</sup>H NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC, HSQC, y <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY y 100 MHz para <sup>13</sup>C NMR

utilizando D<sub>2</sub>O como solvente. Los experimentos de RMN están referidos a H<sub>2</sub>O y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están reportados en ppm.

#### **5.6.11 Reacciones de alcoholisis con Amy A a partir de metanol y almidón**

Se llevaron a cabo reacciones de alcoholisis utilizando 1 U/ml de Amy A en un Thermomixer Compact (Eppendorf) en una solución de 1 ml de buffer TRIS-BIS-HCl 50 mM con 150 mM de NaCl y 2 mM de CaCl<sub>2</sub> a 85 °C y pH 7 con una concentración inicial de almidón del 6% w/v y concentraciones iniciales de metanol de 10, 20, 30 y 40% v/v. La reacción se detuvo después de 24 h y los productos fueron analizados por CCF y HPLC.

#### **5.6.12 Reacciones de alcoholisis con Amy A a partir de metanol y maltodextrinas.**

Las reacciones de alcoholisis a partir de maltodextrinas y metanol se condujeron bajo las mismas condiciones descritas en el inciso anterior pero con una concentración inicial de maltodextrinas del 15% w/v. Los productos se analizaron por CCF y HPLC después de 24 h de reacción.

#### **5.6.13 Reacciones de alcoholisis con Amy A a partir de almidón y butanol.**

Se llevaron a cabo reacciones de alcoholisis utilizando 4 U/ml de la enzima en un Thermomixer Compact (Eppendorf) en una solución de 1 ml de buffer TRIS-BIS-HCl 50 mM con 150 mM de NaCl y 2 mM de CaCl<sub>2</sub> a 85 °C y pH 7 con una concentración inicial de almidón del 6% w/v y una concentración inicial de butanol del 8% v/v. Después de 48 h de reacción, los productos fueron analizados por CCF y se sometieron a una reacción con glucoamilasa (40 U/ml, 40°C, pH 7) con el objetivo de obtener únicamente glucosa y butilglucósido como productos finales. Dichos productos fueron cuantificados por HPLC.

#### **5.6.14 Reacciones con glucoamilasa para la cuantificación total de los productos.**

Los productos resultantes de la acción de AmyA en reacciones de transferencia o alcoholisis fueron sujetos a la acción de la enzima glucoamilasa de *A. niger* (Sigma Aldrich). La enzima fue directamente añadida al medio de reacción establecido para AmyA a una

concentración de 43 U/ml y las reacciones procedieron a 40°C durante 5h. Los productos fueron analizados por HPLC.

### **5.7 Análisis de las reacciones por Cromatografía en Capa Fina (CCF).**

El análisis de los productos por cromatografía en capa fina (CCF) se realizó en placas para CCF Whatman de sílica gel (10x10 cm y 200 µm de espesor). La fase móvil utilizada fue una mezcla de etanol:butanol:agua (50:30:20) y el revelado se realizó con una solución alcohólica de  $\alpha$ -naftol y ácido sulfúrico y un proceso de calentamiento a 100° C hasta ver el revelado de los productos en la placa.

### **5.8 Análisis de las reacciones por HPLC.**

El análisis de los productos se llevó a cabo por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con un cromatógrafo Waters Millennium (600E) con detector de índice de refracción (Waters 410) e inyector automático (Waters 717 plus). Para cada análisis, se inyectaron muestras de 10 µl en una columna cromatográfica Nova-Pak aminada 4.6 x 250 mm. Se utilizó una mezcla acetonitrilo : agua (67:33 ó 70:30) como fase móvil a un flujo de 0.8 ml/min a 35°C. Se utilizaron glucosa, maltosa, malto-oligosacáridos, metil-glucósido y butil-glucósido como estándares para crear las curvas de calibración. Para la purificación de la neotrehalosa se utilizó una columna preparativa Bondapak NH<sub>2</sub>, 7.8 x 300 mm y una mezcla acetonitrilo : agua (80:20) como fase móvil a un flujo de 1 ml/min a 35°C y, por otro lado, para la identificación y cuantificación de dicho producto se hizo uso de la columna analítica aminada mencionada anteriormente, bajo el resto de las condiciones descritas con excepción de la fase móvil, que fue de acetonitrilo : agua (80:20) a un flujo de 1ml/min.



## 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 6.1 Combinación de las actividades hidrolítica y transglicosídica de la $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* y la CGTasa de *B. macerans*.

Como se mencionó anteriormente, dentro del grupo de trabajo se ha propuesto que las  $\alpha$ -amilasas y las CGTasas divergieron de un ancestro común y que las CGTasas evolucionaron de las  $\alpha$ -amilasas con el objetivo de llevar a cabo una hidrólisis más eficiente a partir de almidón y de maltodextrinas. También se propuso que las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes son capaces de llevar a cabo una degradación de la molécula de almidón más extensa (con la generación de productos de bajo peso molecular), como consecuencia de una actividad hidrolítica complementada con la actividad transglicosídica que poseen estas enzimas. Para soportar esta hipótesis, en una primera etapa del presente proyecto se estudió el resultado de combinar la actividad de una enzima exclusivamente transglicosídica, como es la CGTasa, con una  $\alpha$ -amilasa primordialmente licuefactante, como la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, enzima ampliamente utilizada en distintos procesos industriales de modificación de almidón en donde la licuefacción es uno de los pasos iniciales (Del-Río *et al.*, 1997). Así, en esta etapa del proyecto se comparó el perfil de productos obtenidos de la acción de ambas enzimas por separado sobre la molécula de almidón y maltodextrinas, así como el obtenido de la acción combinada de las enzimas.

Tal y como se encuentra reportado en la literatura (Blakeney *et al.*, 1985; Saito, 1973), la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* tiene una acción licuefactante sobre la molécula de almidón y generó G5 como producto más abundante, seguido de G3 > G2 > G1 y, finalmente, G4. En total, se obtuvieron 9.3 mg/ml de oligosacáridos (G1-G5) como productos de la reacción a partir de 12 mg/ml de almidón, de modo que la conversión hasta productos resultó ser del 77.5%. Dichos resultados pueden observarse en la Tabla 6.1 y la Figura 6.1.

Tabla 6.1. Principales productos obtenidos de la acción de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* y la CGTasa de *B. macerans* por separado y en acción conjunta en una solución de almidón.

<b>Producto</b>	<b><math>\alpha</math>-amilasa</b>	<b>CGTasa</b>	<b><math>\alpha</math>-amilase + CGTasa</b>
	<b>Concentración (mg/ml)</b>		
G1	0.87	0.0	2.2
G2	1.7	0.0	4.1
G3	2.24	0.0	1.6
G4	0.82	0.0	1.1
G5	3.68	0.0	1.2

La concentración de productos se reporta en mg/ml. Condiciones de reacción: almidón 12 mg/ml (1.2% w/v), T 60°C, pH 6, 30 min, 0.1  $\mu$ l/ml de  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* y 0.6  $\mu$ l/ml de CGTasa de *B. macerans*.

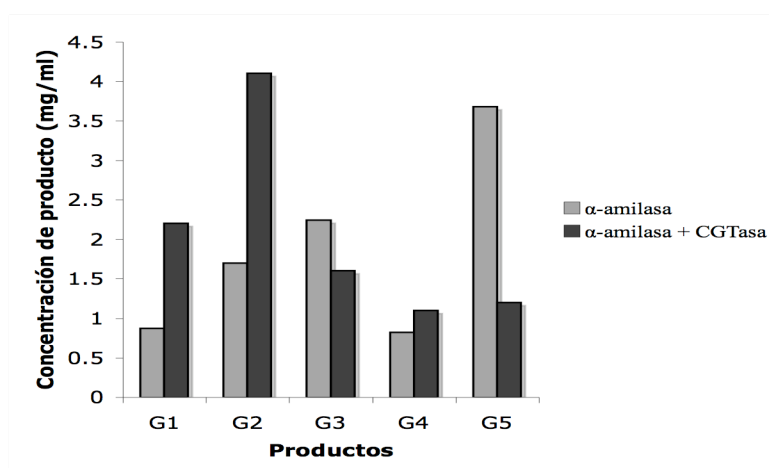


Figura 6.1. Distribución de los productos obtenidos de las reacciones con la  $\alpha$ -amilasa y la acción conjunta de la  $\alpha$ -amilasa y la CGTasa a partir de almidón. La cuantificación se llevó a cabo después de 30 min de reacción en una solución de almidón al 1.2%, T 60° y pH6. La  $\alpha$ -amilasa se añadió a una concentración (v/v) de 0.1  $\mu$ l/ml y la CGTasa a una concentración (v/v) de 0.6  $\mu$ l/ml.

Por otro lado, de la tabla 6.2 y la figura 6.2 puede observarse que, tal y como era de esperarse (Tonkova, 1998), la CGTasa produce principalmente ciclodextrinas (CDs) a partir de almidón, resultando la  $\alpha$ -ciclodextrina el producto principal (40%), seguido por la  $\beta$ -ciclodextrina (23%). Se sabe que en presencia de aceptores como glucosa, parte de la actividad de la CGTasa resulta en la producción de malto-oligosacáridos, pero en este caso no se observó la presencia de éstos después de 30 min de reacción, ni se observó la presencia de glucosa; estos resultados coinciden con los reportados por Terada *et al.* (Terada *et al.*, 2001).

Tabla 6.2. Productos obtenidos después de 30 min de la reacción de CGTasa de *B. macerans* en una solución de almidón.

<i>Producto</i>	<i>Concentración (mg/ml)</i>
$\alpha$ -ciclodextrina	4.8
$\beta$ -ciclodextrina	2.75

Condiciones de reacción: almidón 12 mg/ml (1.2% w/v), T 60°C, pH 6, 30 min, 0.6  $\mu$ l/ml de CGTasa de *B. macerans*.

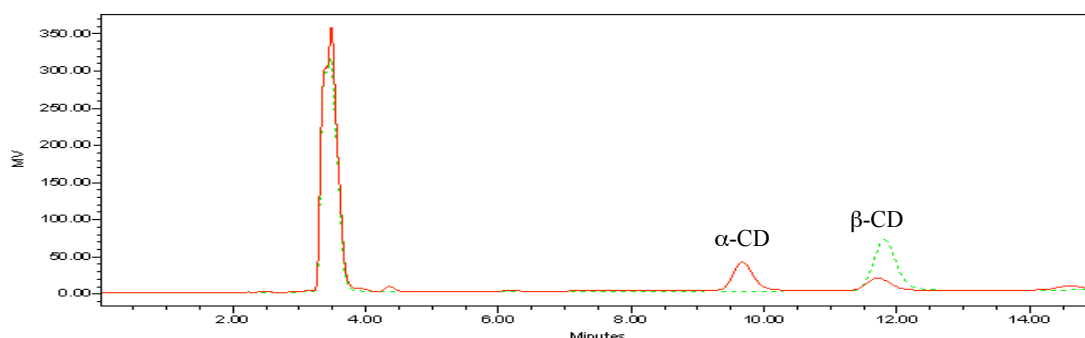


Figura 6.2. Cromatograma obtenido por HPLC de la reacción de CGTasa sobre la molécula de almidón. Línea continua: cromatograma obtenido después de 30 min de reacción en una solución de almidón al 1.2%, T 60°C, pH 6 y 0.6  $\mu$ l/ml de enzima. Línea punteada: cromatograma obtenido de la solución estándar de  $\beta$ -ciclodextrina.

En la figura 6.1 y tabla 6.1 se muestran también los resultados de la reacción en donde las actividades licuefactante de la  $\alpha$ -amilasa y transglicosídica de la CGTasa actúan conjuntamente. Para esta reacción se seleccionó una temperatura de 60° C, correspondiente a la temperatura óptima de la CGTasa y a la cual la  $\alpha$ -amilasa, que tiene una temperatura óptima mayor, conserva aproximadamente un 70% de actividad (70°C, pH 6) (Marchal *et al.*, 1999).

Como puede observarse al comparar los resultados de la combinación de actividades contra los de la  $\alpha$ -amilasa sola, la cantidad total y el perfil de productos obtenidos son diferentes. La cantidad total de oligosacáridos obtenidos aumentó hasta el 85% y resultó particularmente notorio el cambio en el perfil de productos obtenidos, generándose una mayor cantidad de G2 y G1 y disminuyendo la cantidad de G5 producida, malto-oligosacárido, éste último, generado primordialmente de la licuefacción. Esta distribución de productos, que claramente muestra una mayor generación de oligosacáridos de bajo peso molecular, parecido al obtenido con  $\alpha$ -amilasas sacarificantes, no puede ser obtenida a partir de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa o de la CGTasa solas.

Para demostrar que este perfil tampoco puede ser obtenido a partir de la acción secuencial de las enzimas, se analizó el patrón de productos obtenido de la acción de la CGTasa sobre maltodextrinas 20 DE, obtenidas de la previa acción licuefactante de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*.

Como se muestra en la figura 6.3, la CGTasa puede utilizar G3, G6 y G7 gracias a su actividad de disproporcionación, generando productos de mayor peso molecular (mayores al rango G1-G7). El aumento en las concentraciones de glucosa y maltosa, por otro lado, es muy pobre cuando se compara con aquél obtenido de la acción combinada de las enzimas. Así, los resultados observados en la figura 6.1 sólo pueden ser obtenidos con la combinación simultánea de las actividades de hidrólisis y de transferencia de las enzimas.

Los resultados obtenidos soportan la hipótesis propuesta inicialmente en este rubro, y demuestran que la introducción de la actividad transglicolítica a una actividad hidrolítica puede constituir una alternativa interesante para la generación de G2 o G3 en una sola reacción a partir de almidón, sin necesidad de cambiar las condiciones de pH y temperatura.

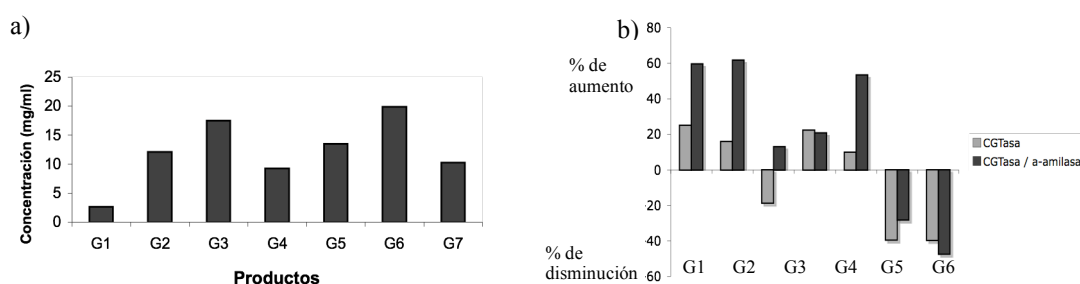


Figura 6.3 a) Composición inicial de maltodextrinas 20 DE (mg/ml). b) Incremento o decremento de los oligosacáridos componentes de Maltodextrinas (DE 20) generado a partir de la acción de la CGTasa y la  $\alpha$ -amilasa + CGTasa en conjunto. Condiciones de reacción: maltodextrinas 150 mg/ml (15%), 30 min, T 60°C, pH 6, 0.1  $\mu$ l/ml de  $\alpha$ -amilasa y 0.6  $\mu$ l/ml de CGTasa.

Cabe señalar que la introducción de dicha actividad transglicosídica puede ser lograda por ingeniería de proteínas sobre  $\alpha$ -amilasas licuefactantes, tal y como demuestran varios reportes. A modo de ejemplo, Saab-Rincón *et al.* (1999) introdujeron actividad transglicosídica en la  $\alpha$ -amilasa licuefactante de *B. stearothermophilus*, logrando una modificación en el perfil de productos y obteniendo mayor concentración de productos de bajo peso molecular.

## 6.2 Caracterización de reacciones de transferencia con la $\alpha$ -amilasa de *A. niger* a partir de almidón y maltodextrinas.

En la búsqueda de una  $\alpha$ -amilasa con una notoria capacidad transglicosídica, en el grupo de trabajo del Dr. Agustín López-Munguía se estudió la capacidad de diversas amilasas para llevar a cabo reacciones de transglicosilación (*A. niger*, *A. oryzae*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*), representadas por reacciones de alcoholólisis con almidón como donador de residuos glicosilo. En dichas reacciones, el aceptor de los residuos es un alcohol y, dependiendo del peso molecular del mismo, puede resultar en la generación de alquilglucósidos, moléculas de gran interés en distintos sectores de la industria debido a su capacidad surfactante (Camaotra *et al.*, 1998; Fietcher, 1992). Los resultados con diferentes enzimas mostraron que, efectivamente, las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes tienen mayor capacidad para llevar a cabo reacciones de transglicosilación que las licuefactantes de origen bacteriano. Por otro lado, también se observó que una mayor concentración de sustratos resultaba en una mayor actividad transglicosídica (Santamaría *et al.*, 1999).

A lo largo de esta investigación, resultaron evidentes algunos inconvenientes importantes asociados al uso de almidón en reacciones de transferencia y alcoholólisis, como la necesidad de gelatinizarlo a altas temperaturas y la alta viscosidad que genera (que limita la concentración a la que puede ser utilizado). Por otro lado, de las reacciones a partir de almidón se obtiene una amplia gama de productos de hidrólisis, transglicosilación y alcoholólisis, difícil de cuantificar.

A partir de lo anterior, surgió el interés de trabajar con maltodextrinas (20 DE), productos de la licuefacción del almidón, como donadores de residuos glicosilo en reacciones de transferencia. En el rubro que se describe a continuación, las reacciones de alcoholólisis con metanol como receptor de residuos glicosilo fueron las seleccionadas como modelos para las reacciones de transglicosilación, reflejo de la capacidad de la enzima para llevar a cabo reacciones de transferencia con un sustrato distinto al almidón.

Así, se realizaron inicialmente reacciones de alcoholólisis a partir de almidón al 6% y con la más prometedora de las enzimas sacarificantes (*A. niger*) para comprobar que la enzima funcionaba adecuadamente en una reacción ya estudiada; dicha enzima comercial contenía 818.4 mg de proteína /g y una actividad de 87.5 U/mg. La figura 6.4 muestra los resultados obtenidos a partir del análisis de cromatografía en capa fina de las reacciones con almidón.

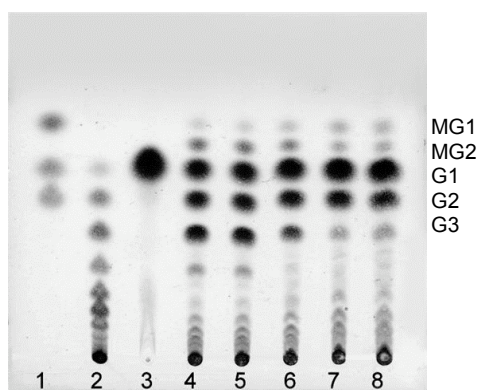


Figura 6.4. Cromatografía en capa fina de las reacciones de alcoholisis a partir de almidón al 6% y metanol al 20% con la  $\alpha$ -amilasa de *A. niger*. 1) Estándar de metil-glucósido (MG1), glucosa (G1) y maltosa (G2); 2) Estándar de maltodextrinas 20 DE; 3) Reacción de hidrólisis (sin presencia de metanol); 4-8) Reacciones de alcoholisis (original y repeticiones).

En esta figura puede observarse la generación de productos de alcoholisis correspondientes a metil-glucósido y a metil-maltósido (MG2).

Una vez comprobada la actividad de la enzima con almidón, se realizaron reacciones de hidrólisis de los nuevos sustratos, las maltodextrinas (15%) bajo las mismas condiciones descritas para el experimento anterior y a tres concentraciones diferentes de enzima: 6, 9 y 12 mg de proteína /ml de reacción. Los resultados obtenidos del análisis por cromatografía en capa fina de estas reacciones pueden verse en la figura 6.5.

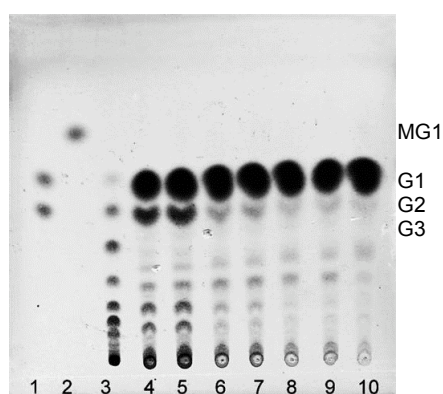


Figura 6.5. Cromatografía en capa fina de las reacciones de hidrólisis a partir de maltodextrinas 20 DE al 15% con la  $\alpha$ -amilasa de *A. niger*. 1) Estándar de glucosa y maltosa; 2) Estándar de metil-glucósido; 3) Estándar de maltodextrinas 20 DE; 4-5) Reacciones de hidrólisis con 6 mg de enzima / ml; 6-8) Reacciones de hidrólisis con 9 mg de enzima / ml; 9-10) Reacciones de hidrólisis con 12 mg de enzima/ ml.

Una vez que se hubo comprobado que las maltodextrinas eran buenos sustratos de hidrólisis para la enzima, se realizaron reacciones de alcoholisis con una concentración de

maltodextrinas del 15% y una concentración de enzima de 9 mg de proteína / ml de reacción. La concentración de metanol fue de 1, 3, 5, 10, 20, 30 y 40% con el resto de las condiciones de reacción anteriormente descritas. En la figura 6.6 se muestra la cromatografía en capa fina de estas reacciones.

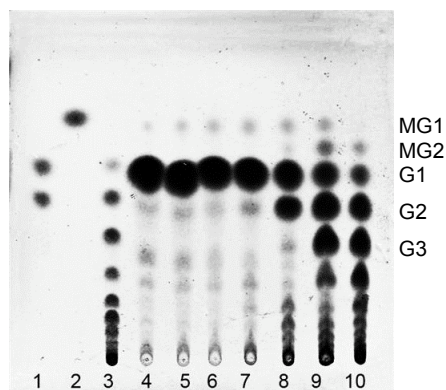


Figura 6.6. Cromatografía en capa fina de las reacciones de alcoholólisis a partir de maltodextrinas al 15% con la  $\alpha$ -amilasa de *A. niger*. 1) Estándar de glucosa (G1) y maltosa (G2); 2) Estándar de metil-glucósido; 3) Estándar de maltodextrinas 20 DE; 4) Reacción de alcoholólisis con 1% de metanol; 5) 3% de metanol; 6) 5% de metanol; 7) 10% de metanol; 8) 20% de metanol; 9) 30% de metanol; 10) 40% de metanol.

Como se puede observar a partir de los resultados, la producción de metil-gucosido se observó a partir de una concentración del 10% de metanol. A concentraciones más altas del 20% de metanol se observa una disminución aparente de la concentración de metil-glucósido y una disminución de producción de glucosa y maltosa. Estos resultados reflejan una pérdida de actividad enzimática por el aumento en la concentración de alcohol en el medio de reacción. A pesar de que se generaron productos de alcoholólisis a las diferentes concentraciones de metanol, la concentración de dichos productos resultó ser muy baja y ni siquiera cuantificable de manera confiable por HPLC.

Los resultados obtenidos demostraron que la enzima es inestable ante el metanol en ausencia del poder protector que el almidón ejerce sobre la enzima, lo que hace poco viable el uso de maltodextrinas como sustratos. Ante esta situación y dado el hecho bien conocido de que existe una relación entre la resistencia de las enzimas a temperaturas elevadas y su tolerancia a otras condiciones del medio de reacción y de las ventajas que nacen de trabajar con enzimas termorresistentes, nos avocamos a la tarea, no sólo de buscar y caracterizar una  $\alpha$ -amilasa con alta versatilidad para llevar a cabo reacciones de transferencia, sino de buscarla entre las  $\alpha$ -amilasas termófilas de las que se tiene conocimiento.

## 6.3 Caracterización de las reacciones de transferencia con AmyA de *Thermotoga maritima*.

### 6.3.1 Amplificación del gen

Como se describió en el apartado de materiales y métodos, con los oligos sintetizados y la librería de DNA de *T. maritima*, se realizó una reacción de PCR con Expand. El producto de PCR obtenido fue de 1.5 kb aproximadamente, lo cual coincidió con el peso molecular del producto esperado para el inserto *amyA*. La figura 6.7 corresponde a una fotografía de un corrimiento del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5%.

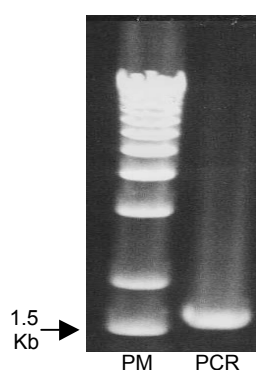


Figura 6.7. Fotografía del gel de agarosa en donde se muestra el producto de PCR obtenido a partir de los oligos sintetizados y la librería de DNA de *Thermotoga maritima*.

### 6.3.2 Clonación en un vector de expresión

Después de la purificación del producto de PCR con un Kit para tal fin, se procedió a la inserción del producto en el vector pET3a. Para dicha inserción, se llevó a cabo la digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* tanto del plásmido como del inserto. En la fotografía mostrada en la figura 6.8 se muestra el plásmido antes de la digestión y el vector sin el inserto después de la misma.



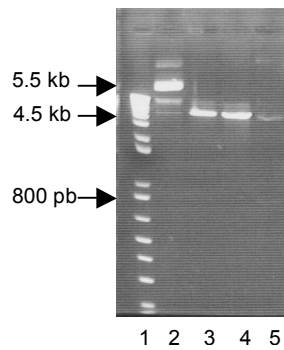


Figura 6.8. Fotografía del gel de agarosa en donde se muestra la digestión con *NdeI* y *HindIII* del vector con un inserto distinto al de interés. 1) Marcadores de peso molecular; 2) pET3a + inserto; 3) Digestión del plásmido con *HindIII*; 4) Digestión del plásmido con *NdeI*; 5) Digestión del plásmido con *HindIII* y *NdeI*.

Una vez purificados el vector y el inserto *amy A*, se llevó a cabo una reacción de ligación con la enzima ligasa y las ligaciones se prepararon de manera adecuada para su transformación por electroporación en células de *E. coli* XL1 Blue.

### 6.3.3 Transformación en *E. coli*

Se realizó la transformación en células de *E. coli* XL1 Blue tal y como se describe en materiales y métodos. De las células recuperadas y cultivadas en placas LB con ampicilina, se seleccionaron cinco colonias al azar, se incubaron en medio LB líquido y se realizó un PCR de colonia con cada una de ellas. Los pormenores de estos procesos se encuentran detallados en el apartado de materiales y métodos correspondiente. De las cinco reacciones de PCR realizadas, provenientes de cinco colonias diferentes, cuatro generaron productos de PCR del tamaño esperado del inserto *amyA* (1.5 kb) dichos productos se muestran en la fotografía del gel de agarosa de la figura 6.9, en la que también se muestran los plásmidos (pET3a + *amyA*) purificados, provenientes de las cuatro colonias que generaron los productos de PCR esperados.

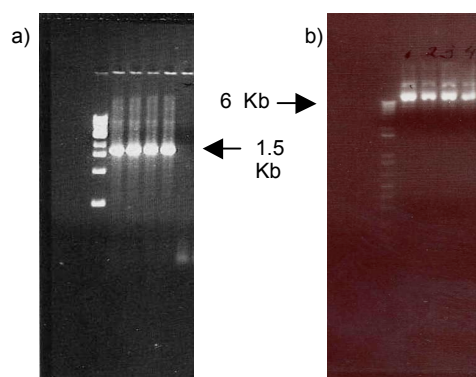


Figura 6.9. a) Fotografía del gel de agarosa en donde se muestran los productos de PCR de colonia de las cinco colonias seleccionadas. b) Fotografía del gel de agarosa en donde se muestran los plásmidos purificados de las cuatro colonias de donde se obtuvo el producto de PCR esperado.

Posteriormente, se llevó a cabo una transformación de células de *E. coli* BL21 con el plásmido puro.

### 6.3.4 Expresión del gen *amy A* y ensayo de actividad

Después del cultivo y la inducción de las células de *E. coli* BL 21 con IPTG en 5 ml de medio LB, se corrió un gel de electroforesis SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble de la muestra preparada tal y como ha sido anteriormente descrito. La figura 6.10 muestra el gel de electroforesis obtenido y puede observarse que la proteína expresada se encuentra en la fracción soluble del extracto.

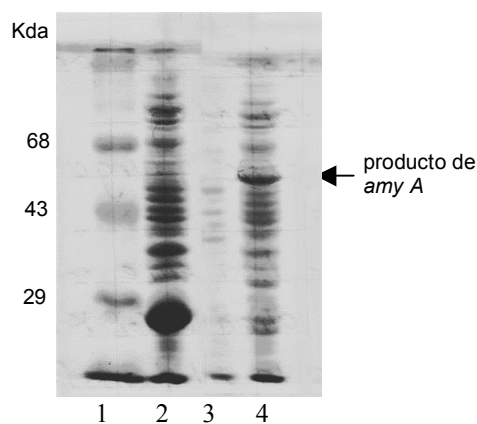


Figura 6.10. Fotografía del gel de electroforesis SDS-PAGE de la fracción soluble e insoluble del extracto. 1) Marcadores de peso molecular, 2) Blanco: pET3a + TIM Barrel; 3) Fracción insoluble; 4) Fracción soluble.

Después de un nuevo cultivo de las células transformadas y una nueva etapa de inducción en un volumen de 5 ml de medio LB, se llevó a cabo un ensayo cualitativo de actividad de la  $\alpha$ -amilasa de *T. maritima* tal y como se ha detallado anteriormente y los productos se analizaron por cromatografía en capa fina. En la figura 6.11 puede observarse que los productos principales de la degradación del almidón por la  $\alpha$ -amilasa de *T. maritima*, son glucosa y un disacárido, con lo que se comprobó que esta enzima es sacarificante y por lo tanto adecuada para llevar a cabo reacciones de transferencia.



Figura 6.11. Cromatografía en capa fina de las reacciones con los productos de *amyA* en almidón al 4%, pH 7, 80°C, 3 h. 1) Estándar de maltodextrinas 3%, 2) Blanco: Reacción con TIM Barrel; 3) Reacción con el producto de la la expresión de *amyA*.

### 6.3.5 Purificación de la enzima Amy A.

En la sección correspondiente de materiales y métodos se describe con detalle el proceso de purificación de la enzima seguido en el presente proyecto. Los pasos generales de dicha purificación consistieron en: cultivo de las células de *E. coli* BL21 transformadas en 1 L de medio LB con ampicilina, inducción con IPTG durante 5 horas, centrifugación y resuspensión de las células en 12 ml de buffer TRIS-BIS 50 mM, sonicación y centrifugación, calentamiento del sobrenadante a 70°C durante 30 minutos, centrifugación y diálisis, precipitación con sulfato de amonio al 75%, centrifugación y resuspensión en un volumen de 200  $\mu$ l de buffer, por último un proceso de cromatografía de filtración en gel por FPLC, con una columna preparative de Superosa® HR12. Después de seguir todos los pasos necesarios, se lograron obtener e identificar dos fracciones principales con la pureza enzimática buscada. La figura 6.12 es una fotografía de un gel de electroforesis SDS-PAGE con las muestras antes (parcialmente purificada) y después del paso de cromatografía de filtración en gel.

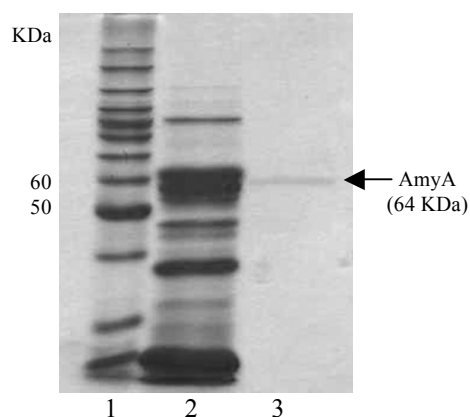


Figura 6.12. Gel de electroforesis SDS-PAGE. 1) Marcadores de peso molecular; 2) Muestra parcialmente purificada (antes de la cromatografía de filtración en gel); 3) Muestra después de la cromatografía de filtración en gel.

### 6.3.6 Determinación de proteína

El contenido de proteína en la muestra parcialmente purificada (antes de la cromatografía por filtración en gel) fue de 6.08 mg/ml, la enzima purificada resultó tener un contenido de proteína de 0.076. Cabe señalar que el contenido de proteína (y por lo tanto el porcentaje de recuperación en el proceso de purificación) resultaba variable en función principalmente del tiempo de inducción con IPTG. Debido a ello, se determinaron los valores de contenido de proteína y actividad enzimática en cada uno de los procesos de purificación, con el objetivo de utilizar las mismas unidades enzimáticas por volumen, en cada uno de los ensayos.

### 6.3.7 Determinación de actividad enzimática

La actividad enzimática de la muestra parcialmente purificada fue de 0.787  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de glucosa / min, resultando en una actividad específica de 1.168  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de glucosa / min mg de proteína. La actividad de la enzima después de todos los pasos de purificación resultó ser de 0.03  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de glucosa / min y la actividad específica de 17.894  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de glucosa / min mg de proteína. Es importante hacer notar que los resultados de contenido de proteína, actividad y por lo tanto actividad específica, no eran reproducibles en cada proceso de purificación; esta

variabilidad se daba en función de cambios pequeños en tiempo de inducción y de la lectura medida en el espectrofotómetro de O.D. antes del proceso de sonicación. Sin embargo, en todos los procesos de expresión enzimática para la obtención de la proteína, estos parámetros fueron medidos y la actividad enzimática por ml de reacción fue ajustada al mismo valor en todos los experimentos, tanto para la enzima pura como para la muestra parcialmente purificada, en los casos en lo que se utilizó esta última como catalizador en el medio de reacción.

### 6.3.8 Perfil de productos de Amy A a partir de almidón y maltodextrinas

Se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis a partir de almidón a diferentes concentraciones (1.2, 2, 4 y 6%) con una concentración de 0.5 U/ml de la enzima en un volumen total de 1 ml de reacción. Los productos generados fueron cuantificados por HPLC después de 24 horas. En la figura 6.13 se muestran estos resultados.

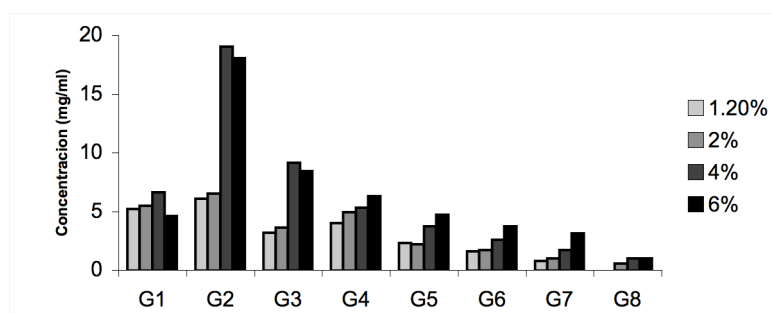


Figura 6.13. Productos de reacción obtenidos a partir de diferentes concentraciones de almidón con la  $\alpha$ -amilasa de *T. maritima*. Condiciones de reacción: 0.5 U/ml de Amy A, los productos se midieron después de 24 h de reacción.

Es importante aclarar aquí que cuando hablamos de G2, G3, G4, G5, G6 y G7 como sustratos de reacción, nos referimos a maltosa, maltotriosa, etc.; sin embargo, cuando nos referimos a G2, G3, G4, etc. como productos de la reacción de Amy A, nos estamos refiriendo a disacáridos, trisacáridos y tetrasacáridos en general, ya que, como se explicará más adelante, la capacidad transglicosídica de Amy A genera otros disacáridos distintos a la maltosa.

Liebl y colaboradores (1997) reportaron que los productos principales de la hidrólisis de almidón con esta enzima son glucosa y maltosa (Liebl *et al.*, 1997). En la figura anterior puede observarse que a todas las concentraciones de almidón empleadas, el producto principal de la reacción después de 24 horas fue G2, seguido por G1, G3 ó G3, G1 en función de la

concentración inicial de almidón y posteriormente G4) G5) G6, lo que coincide con lo reportado.

Posteriormente, se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis con maltodextrinas 20 DE a diferentes concentraciones (2, 4 y 6%) y 0.5 U/ml de enzima. En la figura 6.14 se esquematiza la cuantificación por HPLC de los productos generados.

Al igual que lo observado con almidón, el producto predominante resultó ser G2, seguido por G1) G3 ó G3) G1 en concentraciones que dependen de la concentración de sustrato.

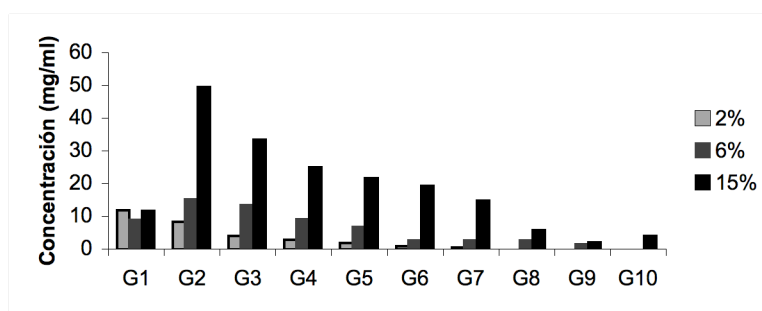


Figura 6.14. Productos de reacción obtenidos a partir de la hidrólisis de maltodextrinas (2, 6 y 15%) con 0.5 U/ml de la  $\alpha$ -amilasa de *T. maritima* después de 24 h de reacción.

La presencia predominante de oligosacáridos de bajo peso molecular como productos de reacción corroboró en esta etapa el carácter sacarificante de la enzima y por lo tanto, su potencial uso en reacciones de transglicosilación. Se comprobó que la enzima es capaz de utilizar maltodextrinas como sustrato. Con estos resultados como antecedente, nos abocamos a explorar el comportamiento de la enzima ante maltosa, maltotriosa, etc. (hasta maltoheptaosa) puros como sustratos de reacción.

Cabe señalar en este punto que se llevaron a cabo reacciones a partir de almidón 6% (w/v) con la enzima parcialmente purificada (antes de la cromatografía por filtración en gel), y los resultados después de 24 h se compararon con los obtenidos con la enzima pura, igualando las unidades de actividad enzimática por ml de reacción (0.5 U/ml).

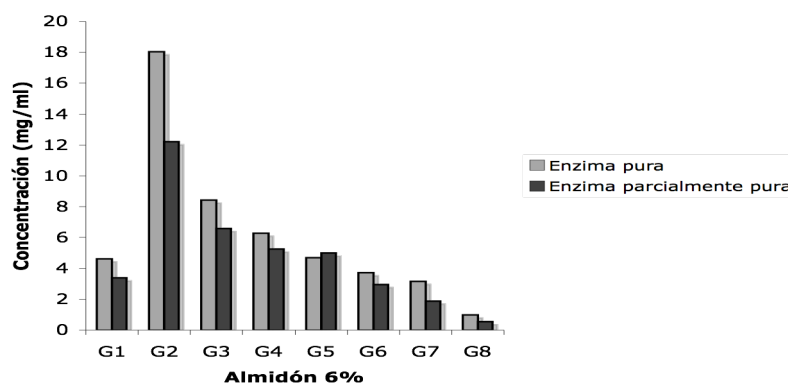


Figura 6.15. Perfil de productos de Amy A obtenidos a partir de la hidrólisis de almidón (6% w/v) con la enzima pura y la enzima parcialmente purificada (antes del proceso de purificación por filtración en gel).

Como puede observarse, se obtuvieron concentraciones ligeramente menores de G1-G8 cuando se utilizó la enzima parcialmente purificada, en comparación a la utilización de la enzima pura; sin embargo tanto el patrón de productos obtenidos, como las concentraciones de éstos, en ambos casos resultaron iguales o muy parecidas. En las reacciones de transferencia a partir de G2 a G7 se utilizó la enzima parcialmente purificada, estandarizando las unidades enzimáticas por volumen de reacción.

### 6.3.9 Reacciones de trnglicosilación con Amy A a partir de maltosa.

Se llevaron a cabo reacciones con Amy A a partir de maltosa para establecer si la enzima es capaz de utilizar oligosacáridos de bajo peso molecular para llevar a cabo reacciones de trnglicosilación. Las concentración utilizada de la enzima en el medio de reacción fue de 1 U/ml, con concentraciones de maltosa del 6 al 15% y los productos fueron analizados por CCF y HPLC. La figuras 6.16 y 6.17 muestran claramente que Amy A es capaz de utilizar maltosa como sustrato para la transferencia de unidades glicosilo a otros oligosacáridos en el medio, generando productos de mayor peso molecular (G3-G8), con la producción concomitante de glucosa.

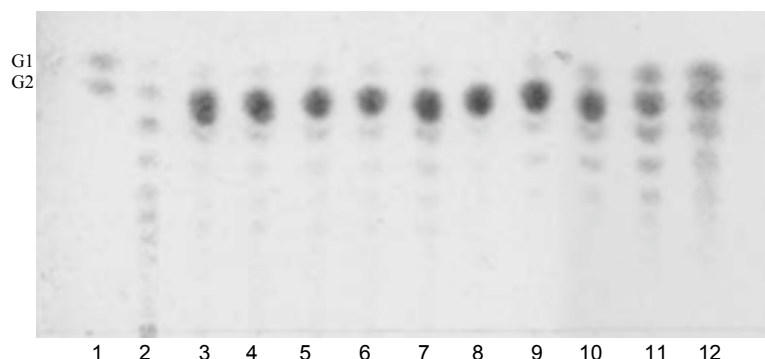


Figura 6.16. Cromatografía en capa fina de las reacciones de transglucosilación de Amy A a partir de maltosa al 6%. 1) Estándar de glucosa y maltosa; 2) Estándar de maltodextrinas; 3) 10 min de reacción; 4) 20 min de reacción; 5) 30 min de reacción; 6) 40 min de reacción; 7) 50 min de reacción; 8) 60 min de reacción; 9) 3 h de reacción; 10) 5 h de reacción; 11) 12 h de reacción; 12) 24 h de reacción.

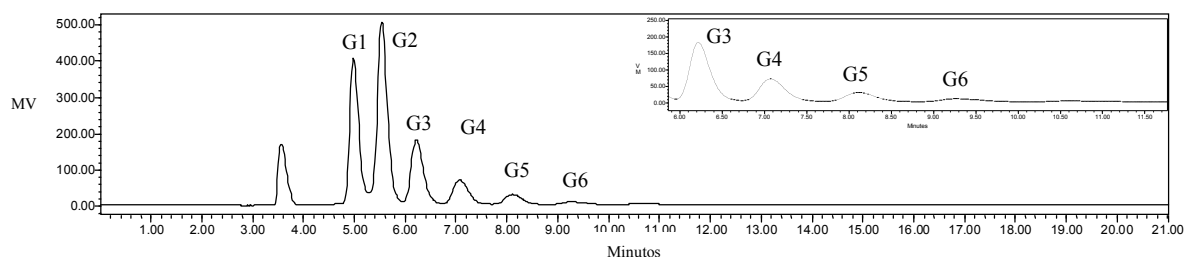


Figura 6.17. Cromatograma de HPLC de los productos de reacción obtenidos con Amy A y maltosa al 6%, después de 24 h de reacción. En el recuadro de la derecha, se muestra una ampliación del cromatograma, correspondiente a los productos mayores a G2.

Los principales productos de transglucosilación con maltosa resultaron ser glucosa y trisacáridos (G3), seguidos de tetrasacáridos (G4). Es probable que la glucosa se acumule en el medio de reacción debido a que la enzima corta inicialmente una molécula de maltosa transfiriendo un residuo glicosilo a otra molécula de maltosa, acumulando así G3 y glucosa en el medio. A partir de este punto, y con G2 y G3 presentes en el medio de reacción, pueden establecerse reacciones de transferencia entre estos oligosacáridos generando así G2, G3 y G4. De esta manera, los productos generados inicialmente se convierten en sustrato de la enzima, tanto en reacciones de transglucosilación como de hidrólisis con la acumulación de glucosa y la generación también de oligosacáridos de mayor peso molecular. Las reacciones



iniciales propuestas para la acción de Amy A sobre la molécula de maltosa se esquematizan en la figura 6.18.

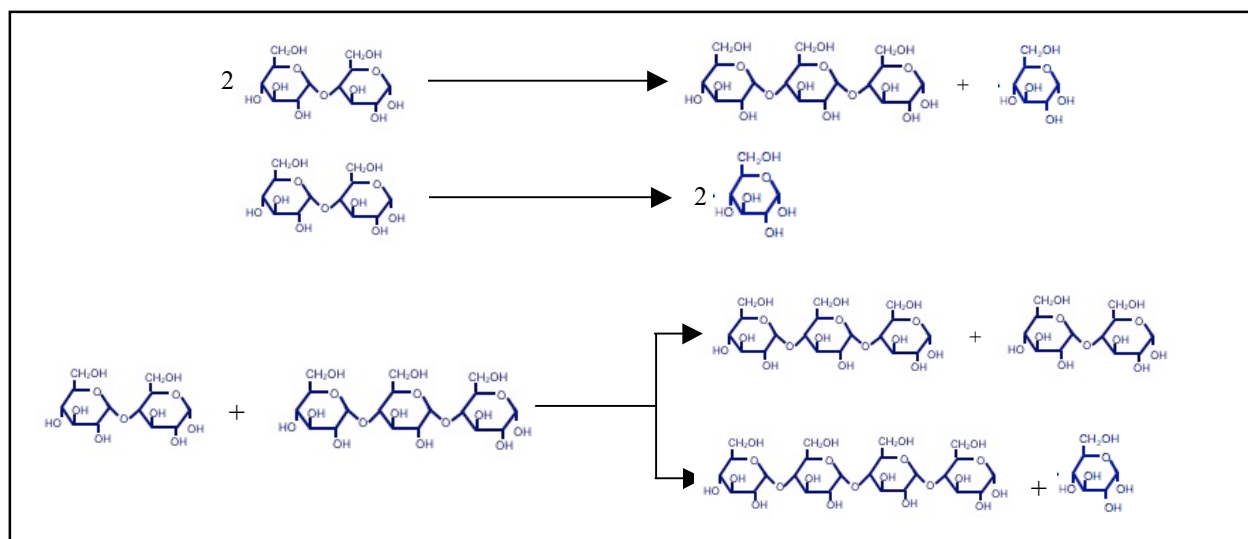


Figura 6.18. Esquemización de las reacciones iniciales de transglucosilación propuestas de AmyA sobre la molécula de maltosa.

Al analizar los productos resultado de reacciones con diferentes concentraciones de maltosa y tiempos de reacción, pudimos observar la producción de oligosacáridos de 7 y 8 unidades de glucosa a tiempos cortos de reacción, mismos que a tiempos más largos, son hidrolizados y ya no son detectables en el medio.

Cabe aquí hacer hincapié en la importancia del hecho de que la enzima sea capaz de utilizar la maltosa como sustrato para llevar a cabo reacciones de transglucosilación, ya que esta capacidad no la tienen la mayoría de las  $\alpha$ -amilasas que requieren de maltooligosacáridos más grandes como sustrato para la reacción de transferencia. Como excepción a lo anteriormente dicho, podemos mencionar a la BSA<sub>m</sub> (Bacterial Saccharifying  $\alpha$ -amylase), enzima proveniente del microorganismo *B. subtilis* y que, tal y como reportaron Suganuma *et al.* (1996), es capaz de utilizar maltosa como sustrato para llevar a cabo reacciones de transglucosilación.

Por otro lado, la acumulación notoria de G4 y oligosacáridos de mayor peso molecular en el medio de reacción, puede ser resultado no sólo de reacciones de transferencia, sino también de reacciones de condensación. Aunque esta reacción no se considera común dentro de las  $\alpha$ -amilasas, está reportado los autores antes mencionados, que BSA<sub>m</sub> es capaz de generar maltotetraosa a partir de la condensación de dos moléculas de maltosa. Estos autores utilizaron maltosa marcada con [<sup>14</sup>C] en el extremo reductor y observaron la

formación transitoria de productos radioactivos más grandes que G2 al utilizar este sustrato a altas concentraciones (81.6 mM). Para diferenciar si la enzima estaba generando estos oligosacáridos a partir de reacciones de transglicosilación o de condensación, los autores sometieron los productos de reacción a la acción de la  $\beta$ -amilasa de soya, enzima capaz de hidrolizar G3 de manera prácticamente exclusiva (> 99.5%) en el primer enlace glicosídico del extremo reductor y, posteriormente, cuantificaron la maltosa marcada (resultado de la reacción de condensación) y la glucosa marcada (resultado de la reacción de transglicosilación). Las reacciones reportadas por estos autores se muestran en la figura 6.19. A partir de estos experimentos concluyeron que dentro de las reacciones que la enzima es capaz de llevar a cabo, el 8-10% se encuentra representada por reacciones de condensación.

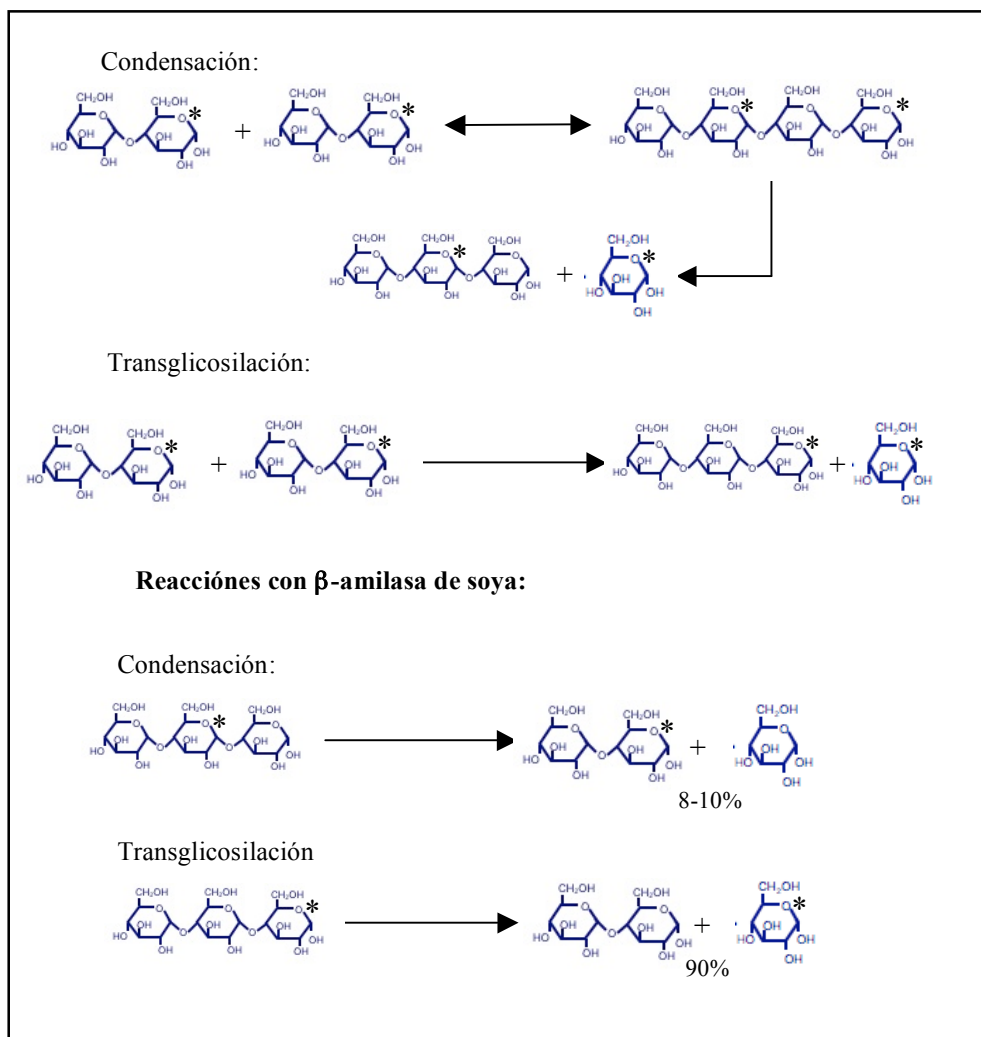


Figura 6.19. Esquematización de las reacciones de la enzima BSA<sub>m</sub> sobre la molécula de maltosa y las reacciones de la  $\beta$ -amilasa de soya sobre los productos reacción iniciales (Suganuma *et al.*, 1996).

Así, dada la versatilidad de la  $\alpha$ -amilasa de *T. maritima* para llevar a cabo reacciones distintas a la hidrólisis y dado que se observa la acumulación de productos de mayor peso molecular que G2 en el medio de reacción, no podemos rechazar la hipótesis de que parte de estos productos sean el resultado de reacciones de condensación en el sitio activo de la enzima, aunque sean primordialmente resultado de reacciones de transferencia.

Sin embargo, independientemente de la hipótesis de que la enzima es capaz de llevar a cabo reacciones de condensación, resulta extraño el hecho de la acumulación de productos de más de tres unidades de glucosa en el medio de reacción, ya que, a partir de la experiencia acumulada en el equipo de trabajo con otras  $\alpha$ -amilasas y con esta misma, estos productos son rápidamente hidrolizados por la enzima. Así, una hipótesis adicional que explica la acumulación de estos oligosacáridos es que, resultado de las reacciones de transglicosilación de Amy A, se establecen enlaces distintos a los  $\alpha$  1,4 que no son fácilmente hidrolizados por la enzima, aunque eventualmente su concentración en el medio de reacción disminuye. Posteriormente se detallará la comprobación de que la enzima es en efecto capaz de generar productos de transferencia con enlaces distintos a los  $\alpha$  1,4.

### 6.3.10 Reacciones de transferencia de Amy A empleando como sustratos G2-G7.

Se llevaron a cabo reacciones de transglicosilación con maltotriosa al 2% y 1 U/ml de la enzima. En la figura 6.20 puede observarse la formación de G4 y productos de mayor peso molecular resultado de la reacción de transglicosilación y en la figura 6.21 se presenta la evolución de la reacción hasta la primera hora.

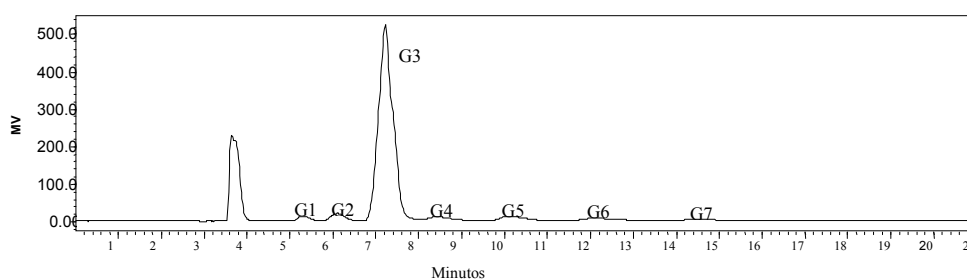


Figura 6.20. Cromatografía por HPLC de los productos de reacción de Amy A con maltotriosa al 2% después de 24 h.

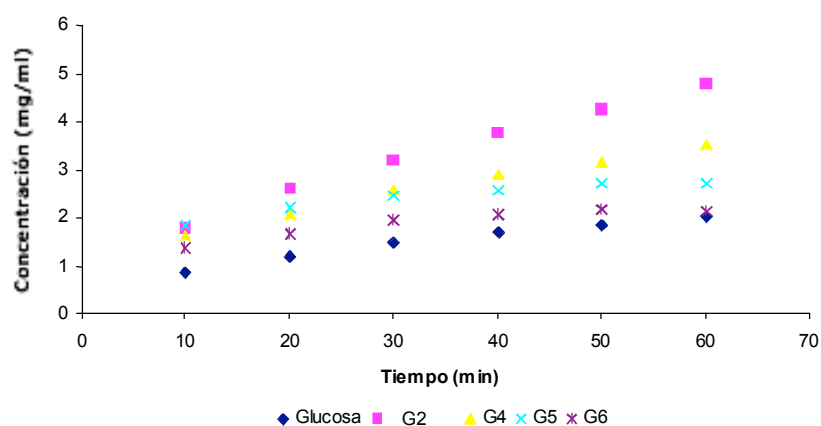


Figura 6.21 Evolución de los productos obtenidos de la reacción de Amy A con maltotriosa al 2%.

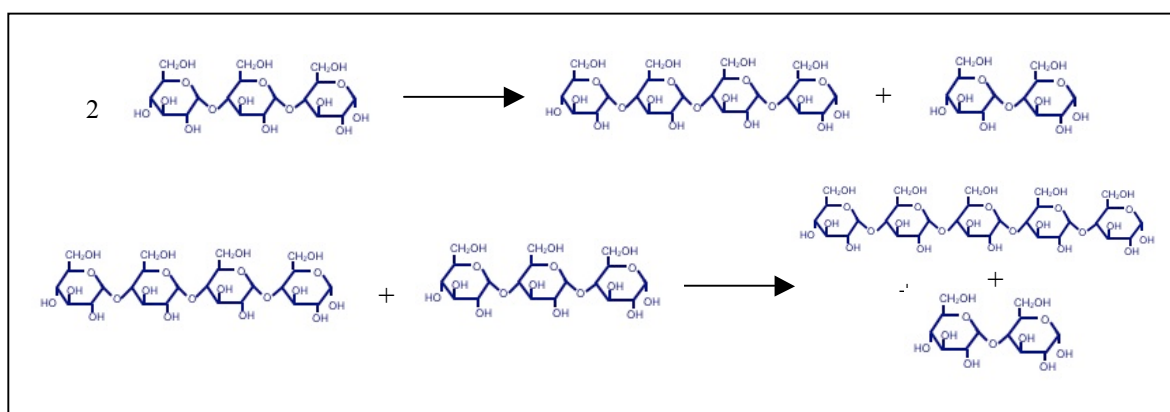


Figura 6.22. Ejemplo de algunas de las reacciones iniciales propuestas para la acción de Amy A sobre la molécula de maltotriosa.

Al ser G2 y G4 dos de los productos mayoritarios generados a partir de la reacción de transglucosilación con G3, podríamos inferir que la enzima corta una molécula de maltotriosa y le transfiere una molécula de glucosa a otra molécula de G3 para así formar G2 y G4. A partir de ahí pueden darse otras reacciones de transglucosilación, entre G4 y G3, entre dos moléculas de G4 y entrarían también en juego las moléculas de G5 formadas (figura 6.22). Así, los productos generados de las reacciones llevadas a cabo por la enzima se convierten en sustratos, ya sea para transglucosilación, hidrólisis o, tal como se había propuesto anteriormente, condensación.

La enzima fue capaz de utilizar también G4, G5, G6 y G7 como sustratos para llevar a cabo reacciones de transglicosilación a tiempos cortos, tal y como se muestra en la figura 6.23 que corresponde a la cromatografía en capa fina de las reacciones con Amy A y G3-G7, por separado, después de 10 min de reacción. Las reacciones de transglicosilación son evidentes por la formación de oligosacáridos de mayor peso molecular al sustrato, aunque en el caso de G7 se observa un barrido y la transglicosilación no es tan evidente. Por otro lado, en el caso de G7 se lleva probablemente a un tamaño tal, que la enzima lo utiliza preferentemente para hidrólisis.

Por otro lado, se llevaron a cabo reacciones con G2 al 6% y G7 al 2% juntos, con el objetivo de analizar el comportamiento de la enzima con dos oligosacáridos de diferente peso molecular. En la figura 6.24, se muestra la cromatografía en capa fina de los productos de esta reacción, en la que puede observarse la acumulación de productos intermedios entre G2 y G7, siendo únicamente evidente la hidrólisis de la maltoheptaosa, ya que el barrido observado en la parte baja del cromatograma no es indicativo claro de la generación de productos de transglicosilación mayores a G7. Podríamos pensar que inicialmente la reacción de preferencia de la enzima ante los dos sustratos, es la de hidrólisis de G7. Sin embargo, tal y como ya hemos comprobado anteriormente, al irse acumulando sustratos de menor peso molecular, la enzima puede utilizarlos para reacciones de transglicosilación. Puede observarse después de 10 horas de reacción, se acumulan predominante G1 y G2 como productos.

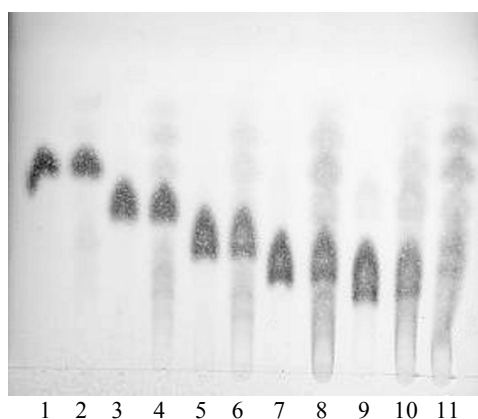


Figura 6.23. Cromatografía en capa fina de las reacciones de Amy A con G3, G4, G5, G6 y G7 al 2%, a tiempo 0 y después de 10 min de reacción. 1) G3, 0 min; 2) G3, 10 min; 3) G4, 0 min; 4) G4, 10 min; 5) G5, 0 min; 6) G5, 10 min; 7) G6, 0 min; 8) G6, 10 min; 9) G7, 0 min; 10) G7, 10 min; 11) Estándar de maltodextrinas.

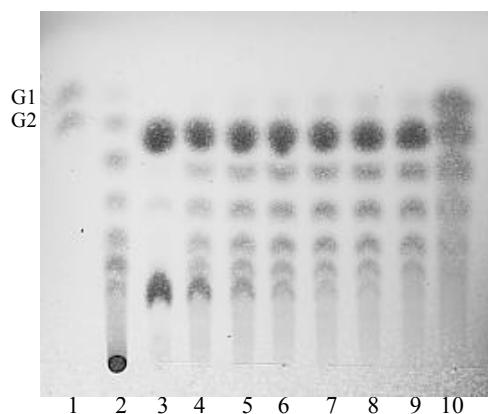


Figura 6.24. Cromatografía en capa fina de las reacciones de Amy A con 6% de G2 y 2% de G7 a diferentes tiempos de reacción. 1) Estándar de glucosa y maltosa; 2) Estándar de maltodextrinas; 3) 0 min; 4) 10 min; 5) 20 min; 6) 30 min; 7) 40 min; 8) 50 min; 9) 60 min, 10) 10 h.

Para analizar la generación de productos a tiempos largos de reacción, en que se alcance el equilibrio, se realizaron reacciones con G2 (6%) y G3 hasta G7 (2%) por separado y los productos fueron cuantificados por HPLC después de 48 horas de reacción. En la figura 6.25 se muestran los resultados de dichas reacciones.

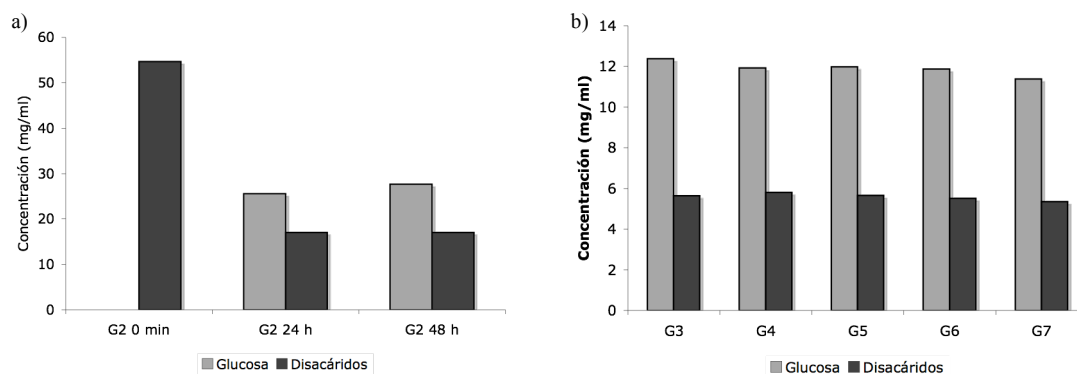


Figura 6.25. Productos obtenidos por a) Amy A y G2 (6%) o b) G3-G7 (2%) después de 24 ó 48 h de reacción.

Como puede observarse, después de 48 horas de reacción y una vez que se alcanza el equilibrio, los productos finales obtenidos en todos los casos son glucosa y G2 (disacáridos) en una relación de 2:1, lo que indica que todos los oligosacáridos formados por transglucosilación en etapas iniciales de la reacción, son finalmente hidrolizados hasta glucosa

y G2, independientemente de la eventual formación de oligosacáridos con otro tipo de enlace. Cuando la glucosa es incubada con la enzima, no se observan reacciones de condensación.

Con todos los sustratos analizados (almidón, maltodextrinas u oligosacáridos) la enzima genera los mismos productos una vez alcanzado el equilibrio (G1 y G2) y en la misma relación (2:1). En el caso del almidón, resulta lógico pensar que las reacciones preferentes al inicio de la reacción son las de hidrólisis, ya que el sustrato es de gran tamaño; sin embargo, una vez que se acumulan oligosacáridos de bajo peso molecular en el medio de reacción, la enzima puede utilizarlos para llevar a cabo reacciones de transglicosilación, con la formación transitoria de productos de mayor peso molecular, sujetos posteriormente a reacciones de hidrólisis, llegando finalmente, a un equilibrio en el que en el medio se encuentran únicamente G1 y G2.

Estos resultados muestran una inusual capacidad dentro de las  $\alpha$ -amilasas para utilizar productos de bajo peso molecular para formar oligosacáridos de mayor peso molecular en etapas iniciales de reacción, lo que no sólo es indicativo de la versatilidad de la enzima para llevar a cabo reacciones de transglicosilación, sino de la complejidad en el análisis de los procesos que se pueden llevar a cabo con esta enzima. Esto es debido a que se trata de una enzima que lleva a cabo reacciones de hidrólisis, transglicosilación y presuntamente condensación en el mismo medio de reacción, dando lugar a productos que a su vez se convierten en sustratos de la enzima, para cualquiera de las reacciones antes mencionadas. Esta situación es de naturaleza dinámica, ya que depende de la etapa de reacción, el peso molecular del sustrato y de la disponibilidad de los demás sustratos en el medio, así como de su tamaño.

### **6.3.11 Determinación de la presencia de neotrehalosa como producto en las reacciones de transferencia**

En ciertas reacciones llevadas a cabo con Amy A, particularmente en las correspondientes a las de alcoholólisis con metanol que se reportan más adelante, se llevaron a cabo reacciones de degradación de los productos de reacción de Amy A con la enzima glucoamilasa de *A. niger*. La glucoamilasa o amiloglicosidasa es una exo-glicosidasa que hidroliza los enlaces  $\alpha$  1-4 en el extremo no reductor del sustrato, liberando moléculas de D-glucosa con configuración  $\beta$  (Guzmán-Maldonado *et al.*, 1995). Así, con esta enzima logramos obtener exclusivamente glucosa de los productos de la reacción de hidrólisis o transglicosilación con Amy A ó metil-glucósido de los productos de alcoholólisis.

A pesar de que en algunas reacciones, la glucosa y el metil-glucósido eran los únicos productos esperados después de la reacción con glucoamilasa, en las cromatografías en capa fina se observa la presencia de productos resistentes a la degradación y por lo mismo de identidad desconocida, un ejemplo de ello se muestra en la figura 6.26. Cabe señalar que en los cromatogramas por HPLC, estos productos no eran separados bajo el sistema utilizado de los maltooligosacáridos correspondientes.

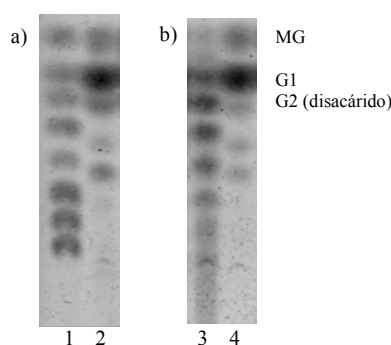


Figura 6.26. Cromatografía en capa fina de los productos observados antes (a) y después (b) de la acción de la enzima glucoamilasa de *A. niger* sobre los productos de alcoholísis de Amy A a partir de almidón y metanol 20%. 1) Estándar de maltodextrinas, 2) Productos de alcoholísis con Amy A, 3) Estándar de maltodextrinas, 4) Productos generados después de la acción de la glucoamilasa de *A. niger* sobre los productos de alcoholísis de Amy A.

Para analizar la identidad de estos productos se llevó a cabo una reacción con Amy A con maltosa al 15% y G7 al 2% y una concentración enzimática de 10 U/ml. Al utilizar una fase móvil de acetonitrilo : agua (80:20) por HPLC, se logró la separación de estos compuestos de la señal correspondiente a la de la maltosa.

A pesar que se ha reportado que la glucoamilasa es capaz de llevar a cabo reacciones de hidrólisis inversa con la formación de maltosa e isomaltosa a altas concentraciones de sustrato y de enzima (Rugh *et al.*, 1979), concluimos mediante los controles correspondientes que estos productos eran generados por la  $\alpha$ -amilasa al lograr su separación por HPLC antes de la reacción con glucoamilasa.

Una vez establecido el sistema de análisis de estos productos y comprobado que eran resultado de la reacción de la Amy A, se llevó a cabo una segunda reacción con G2 y G7 bajo las mismas condiciones para la purificación de un parente disacárido. Después de la reacción con Amy A, se sometieron los productos a la acción de la glucoamilasa y se inyectó la muestra a una columna preparativa con un fase móvil de acetonitrilo: agua (80:20). El cromatograma obtenido se muestra en la figura 6.27, en el que se puede observar la presencia de glucosa, y las dos señales correspondientes a los compuestos de identidad desconocida.



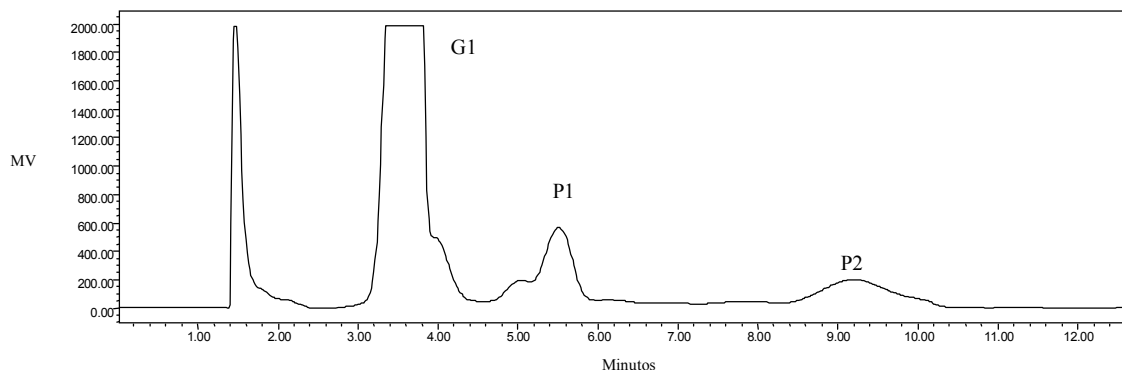


Figura 6.27. Cromatografía por HPLC, en columna preparativa de la reacción con Amy A y G2 al 15% y G7 al 2%, seguida de la reacción con glucoamilasa.

A partir de este sistema se logró la purificación del disacárido P1 para su identificación. La figura 6.28 muestra el cromatograma por HPLC en columna analítica del pico de interés purificado.

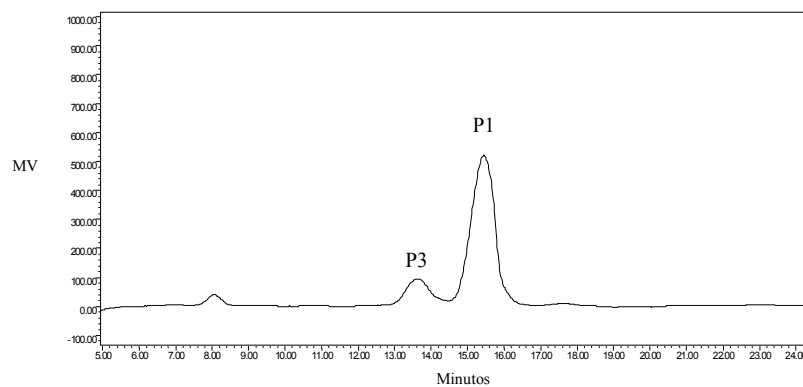


Figura 6.28. Cromatografía por HPLC, en columna analítica de la muestra con el disacárido de identidad desconocida purificado.

Los resultados preliminares de RMN señalaron que el disacárido analizado correspondía a un azúcar no reductor, por lo que se decidió comparar el tiempo de retención del compuesto en HPLC, con los tiempos de retención de distintos disacáridos no reductores, como la sacarosa, neotrehalosa y trehalosa, así como con los de algunos otros oligosacáridos. Al comparar el tiempo de retención de la señal de interés con los tiempos de retención de estos disacáridos, se comprobó que la señal correspondía al mismo tiempo de retención del disacárido neotrehalosa, tal y como se muestra en la figura 6.29.

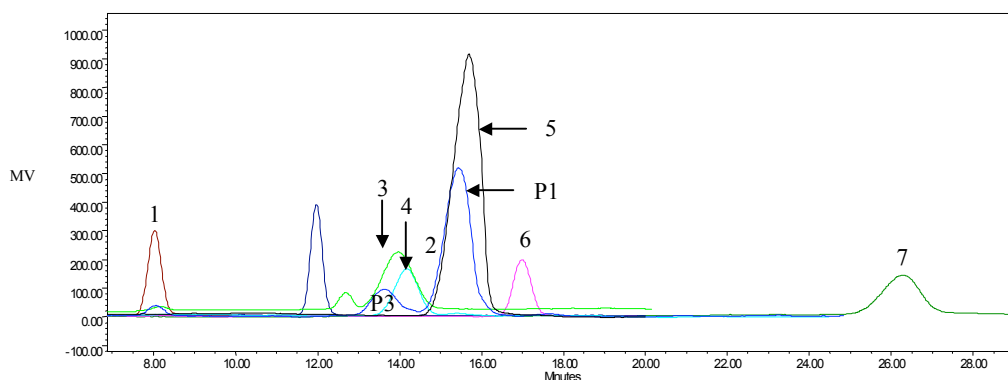


Figura 6.29. Cromatografía por HPLC, en columna analítica de la muestra con el disacárido de identidad desconocida purificado y estándares de 1) glucosa; 2) sacarosa; 3) nigerosa; 4) maltosa; 5) neotrehalosa; 6) trehalosa; 7) maltotriosa

Para confirmar que el compuesto de interés era, efectivamente neotrehalosa, se llevaron a cabo mediciones por NMR. El espectro  $^{13}\text{C}$ -NMR contenía 12 señales que se muestran en la tabla 6.3. En el espectro  $^1\text{H}$  NMR, se observaron dos protones anoméricos, uno de ellos en orientación  $\beta$  a 4.59 (1H, d,  $J=8.0$  Hz) y HSQC demostró su unión al carbono anomérico a  $\delta$  103.06. El segundo protón anomérico se observó en orientación  $\alpha$  a 5.17 (1H, d,  $J=3.6$  Hz) y por HSQC se demostró su unión al carbono anomérico a  $\delta$  100.36. Esto sirvió como punto de inicio para la obtención del sistema de “spin” de ambas glucosas a partir de experimentos COSY y TOCSY. Una vez que las señales  $^1\text{H}$  de ambos azúcares fueron asignados, se definió el carbono al cual se encontraban unidos los hidrógenos a partir de HSQC. Con base en correlaciones HMBC, se determinó la unión entre ambos azúcares como (1'  $\rightarrow$  1) debido a la correlación de rango largo entre el H-1' de la  $\alpha$ -glucosa y el carbono en  $\delta$  103.06 de la  $\beta$ -glucosa. Se observó una segunda correlación entre el H-1 de la  $\beta$ -glucosa y el carbono a  $\delta$  100.36 de la  $\alpha$ -glucosa. A partir de este resultado, se dedujo que el compuesto de interés era, efectivamente, neotrehalosa ( $\alpha$ -D-Glucopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosido). Para corroborar este resultado, se compararon los datos del compuesto de interés con los obtenidos para el estándar de neotrehalosa por  $^1\text{H}$  NMR.

Tabla 6.3. Datos de desplazamiento químico por  $^1\text{HRMN}$  y  $^{13}\text{CRMN}$  para la Neotrehalosa ( $\alpha$ -D-Glucopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosido)

$\alpha$ -glucosa	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1'	100.36	5.17 d(3.6)
2'	71.49	3.54 dd(3.6, 9.5)
3'	72.85	3.69 dd(8.4, 9.5)
4'	72.73	3.89 dd(10, 9.5)
5'	69.42	3.40 m
6'	60.61	3.72 m
		3.80 m
<b><math>\beta</math>-glucosa</b>		
1	103.06	4.59 d(8.0)
2	73.15	3.37 dd(9.2, 8.0)
3	75.43	3.47 dd(9.2, 9.0)
4	76.20	3.43 m
5	69.42	3.4 m
6	60.44	3.72 m
		3.80 m

Se obtuvieron los siguientes datos para neotrehalosa por NMR:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\alpha$ -glucosa,  $\delta$  5.17 (d, 1H,  $J$  3.6 Hz, H-1'),  $\delta$  3.54 (dd, 1H,  $J$  3.6, 9.5 Hz, H-2'),  $\delta$  3.69 (dd, 1H,  $J$  8.4, 9.5 Hz, H-3'),  $\delta$  3.89 (dd, 1H,  $J$  9.5, 10.0 Hz, H-4'),  $\delta$  3.40 (m, 1H, H-5'),  $\delta$  3.72 (m, 1H, H-6a'),  $\delta$  3.80 (m, 1H, H-6b');  $\beta$ -glucosa,  $\delta$  4.59 (d, 1H,  $J$  8.0 Hz, H-1),  $\delta$  3.37 (dd, 1H,  $J$  8.0, 9.2 Hz, H-2),  $\delta$  3.47 (dd, 1H,  $J$  9.0, 9.2 Hz, H-3),  $\delta$  3.43 (m, 1H, H-4),  $\delta$  3.40 (m, 1H, H-5),  $\delta$  3.72 (m, 1H, H-6a),  $\delta$  3.80 (m, 1H, H-6b);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\alpha$ -glucosa,  $\delta$  100.36 (C-1'),  $\delta$  71.49 (C-2'),  $\delta$  72.85 (C-3'),  $\delta$  72.73 (C-4'),  $\delta$  69.42 (C-5'),  $\delta$  60.61 (C-6');  $\beta$ -glucosa,  $\delta$  103.06 (C-1),  $\delta$  73.15 (C-2),  $\delta$  75.43 (C-3),  $\delta$  76.20 (C-4),  $\delta$  69.42 (C-5),  $\delta$  60.44 (C-6).

En la figura 6.30 se muestra la estructura de la neotrehalosa.

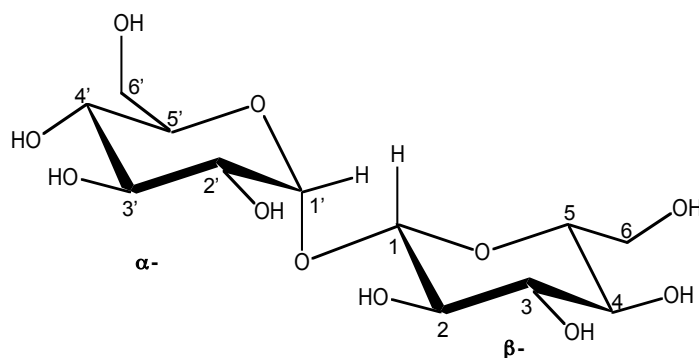


Figura 6.30. Estructura de la neotrehalosa ( $\alpha$ -D-Glucopiranosil- $\beta$ -D-glucopiranosido)

Una vez identificado el producto de interés, se decidió analizar si la enzima era capaz de producir neotrehalosa a partir de maltosa exclusivamente. Para tal fin, se llevó a cabo una reacción con maltosa al 6% y 10 U/ml de Amy A, después de 48 h la mezcla de productos se sometió a la acción de la glucoamilasa. Se llevó a cabo la cuantificación por HPLC tanto de la neotrehalosa después de la reacción con glucoamilasa, como de los disacáridos totales generados antes de dicha reacción.

La concentración de neotrehalosa generada de la reacción descrita resultó ser de 6.43 mg/ml, correspondiente a un rendimiento de aproximadamente el 10% y con una relación de disacáridos (G2) / neotrehalosa de 1.42.

El hecho de que Amy A sea capaz de generar neotrehalosa a partir de diferentes sustratos, la hace una enzima aún más atractiva y con aplicaciones en distintos tipos de reacciones de transferencia para la generación de diversos productos de valor comercial. La neotrehalosa, específicamente, es un disacárido que posee poder edulcorante, es muy soluble en agua, es no-reductor y posee una estabilidad satisfactoria para su utilización en las industrias de alimentos y farmacia. La neotrehalosa se administra oral o paraentalmente y es bien metabolizada y utilizada como suplemento energético sin toxicidad o efectos secundarios adversos. Dado que la neotrehalosa no es fácilmente fermentada por los microorganismos inductores de caries dental, puede ser utilizada como endulzante no-cariogénico. Más aún, la neotrehalosa es un endulzante estable y dicha estabilidad le confiere la propiedad de ser utilizada como agente de recubrimiento para tabletas cuando se combina con otro agente de unión como el pululano. Adicionalmente a esto, la neotrehalosa es químicamente estable y puede ser utilizada con otros sacáridos para regular su presión osmótica y mejorar sus características de llenado, impartición de brillo, retención de humedad, impartición de viscosidad, reducción de fermentabilidad y prevención de cristalización. Debido a todas las propiedades ventajosas de la neotrehalosa ya discutidas, puede ser utilizada como edulcorante, agente de mejora de sabor, agente de mejorado de calidad y estabilizante en composiciones de productos alimentarios, tabacos, cigarros, alimentos para mascotas, cosméticos y farmacéuticos. Aproximadamente un 5 a 10% de neotrehalosa puede ser incorporado a un producto para ejercer un efecto satisfactorio (Shibuya *et al.*, 1996).

En 1996, Shibuya *et al.* publicaron una patente referida al proceso de preparación de neotrehalosa y sus usos (Shibuya *et al.*, 1996). Dicha patente basa el proceso de producción de neotrehalosa en una reacción a partir de almidón, maltodextrinas u otras sustancias amiláceas con varias glicosidasas, entre ellas una glucoamilasa,  $\alpha$ -glucosidasa, Taka amilasa y la  $\alpha$ -amilasa sacarificante de *B. subtilis*, de donde se obtiene neotrehalosa a una

concentración de aproximadamente 5 – 10% en la solución resultante. Los autores reportaron que después de un proceso de recuperación de neotrehalosa, el producto puede ser utilizado en forma líquida, como jarabe o en forma sólida después de los procesos de filtración, purificación, concentración y secado adecuados, para los diversos usos discutidos anteriormente. Estos autores también concluyeron que la glucoamilasa, la  $\alpha$ -glucosidasa y la Taka amilasa son enzimas productoras de neotrehalosa pero a menor concentración que la  $\alpha$ -amilasa de *B. subtilis*. Así, si bien no es la primera vez que se reporta la utilización de una  $\alpha$ -amilasa sacarificante para la síntesis de neotrehalosa y, si bien podríamos suponer, como dicen los autores, que diferentes  $\alpha$ -amilasas sacarificantes pueden ser utilizadas con dicho fin, Amy A resultó ser una buena productora de neotrehalosa, con un rendimiento de 10% y con la gran ventaja de ser una enzima termofílica y con capacidad de utilizar sustratos de distinto peso molecular. Como mencionan los autores y como comprobamos en esta etapa del proyecto, después de la reacción con Amy A puede llevarse a cabo una reacción con glucoamilasa para facilitar la acumulación y purificación de neotrehalosa.

Por otro lado, estos mismos autores publicaron una patente en la que obtenían un oligosacárido en cuya estructura se encontraba una molécula de neotrehalosa. Los autores reportaron la obtención de dicho compuesto a partir de una solución de neotrehalosa, un donador de residuos glicosilo, específicamente un  $\alpha$ -glucosil sacárido (que puede ser almidón gelatinizado, almidón licuefactado, hidrolizado parcial de almidón, etc.) y una enzima capaz de transferir residuos glicosilo de el donador ya mencionado, a ambos residuos de glucosa de la neotrehalosa. Mencionaron el uso de glucosil transferasas como enzimas capaces de sintetizar el compuesto de interés, pero también mencionan el uso de  $\alpha$ -amilasas para tal fin, específicamente las sacarificantes del género *Bacillus*. El oligosacárido con estructura de neotrehalosa obtenido tiene varias de las características antes mencionadas para la neotrehalosa. Adicionalmente, es fuente calórica de baja cariogenicidad y químicamente muy estable, de modo que puede ser utilizado junto con aminoácidos, oligopéptidos y proteínas que por lo general ocasionan reacciones de empardamiento con sacáridos. Es capaz de estabilizar sustancias biológicamente activas que se deterioran rápidamente y tiene propiedades de regulación de presión osmótica, impartición de brillo, retención de humedad, prevención de cristalización de otros sacáridos, menor fermentabilidad y previene la retrogradación de sustancias amiláceas. Por todo ello, dicho compuesto puede ser utilizado ventajosamente en la generación de productos alimenticios incluyendo bebidas, comestibles, alimentos para mascotas y también en la producción de cosméticos y farmacéuticos (Aga *et al.*, 1996).

Si bien en las patentes mencionadas se describen muchas características atractivas de la neotrehalosa, no se han reportado datos que permitan suponer la implementación de un proceso industrial para la obtención de este disacárido no reductor ni de su comercialización, probablemente debido a los bajos rendimientos de neotrehalosa en los sistemas de reacción estudiados, comparados con los de trehalosa, un disacárido no reductor muy parecido a la neotrehalosa, con muchas de las atractivas características de ésta última y se obtiene con mejores rendimientos de reacción, con los sistemas adecuados.

A pesar de que en los trabajos resumidos ya se había reportado la utilización de  $\alpha$ -amilasas sacarificantes para la producción de neotrehalosa, la generación de un enlace  $\alpha$ 1, $\beta$ 1 por una enzima cuya reacción principal es la de hidrólisis de enlaces  $\alpha$ -1,4 con retención en la configuración, resulta intrigante.

En 1995, Maruta y colaboradores reportaron la purificación parcial de dos enzimas de la cepa Q36 de *Arthrobacter* sp. aislada del suelo, capaces de sintetizar trehalosa ( $\alpha$ -D-Glucopiranosil- $\alpha$ -D-glucopiranosido). Los autores reportaron que una de las enzimas era capaz de catalizar la conversión de maltopentaosa a maltotriosil trehalosa por medio de una transglicosilación intramolecular y la nombraron “malto-oligosil trehalosa sintasa”; la segunda enzima, por otro lado, tenía la capacidad de hidrolizar el producto transferido hasta maltotriosa y trehalosa, nombrándola “malto-oligosil trehalosa trehalohidrolasa” (Maruta *et al.*, 1995).

A pesar de que el producto de reacción era la trehalosa y de que, en este trabajo, los autores no mencionan la acción de una  $\alpha$ -amilasa sacarificante en las reacciones, la hipótesis de la formación del enlace  $\alpha$ -1,1 por medio de una transglicosilación intramolecular, resulta interesante.

Kato y colaboradores, en 1996, reportaron en una serie de tres artículos, un sistema de producción de trehalosa que involucraba dos actividades enzimáticas provenientes de un homogenado celular del archaia hipertermofílico y acidófilo *Sulfolobus solfataricus* KM1. Los autores reportaron que la primera enzima involucrada en dicho sistema, era una glicosil-transferasa capaz de convertir diferentes maltooligosacáridos hasta glicosil-trehalosas por medio de una transglicosilación intramolecular. En dicha reacción, la enzima corta una glucosa del extremo reductor del sustrato y lleva a cabo una reacción de transferencia, siendo el mismo residuo de glucosa saliente, el aceptor del resto de la molécula pero estableciéndose un enlace 1,1 debido a una distorsión de la molécula de glucosa en el sitio activo, posicionándola de modo que es el extremo reductor (C1-OH) el que funge como aceptor. Los autores nombraron a esta primera enzima “1,4,- $\alpha$ -glucan 1- $\alpha$ -glicosiltransferasa” y reportaron que, junto con esta reacción de transferencia, se

encontraba en competencia la reacción de hidrólisis, en la que el aceptor de residuos glicosilo es el agua, pero era la reacción de transferencia la primordial.

La segunda enzima en el sistema reportado, cataliza una reacción de hidrólisis de las glicosil-trehalosas por medio de la ruptura del enlace glicosídico  $\alpha$ -1,4 adyacente al enlace  $\alpha$ -1,1, liberando trehalosa y malto-oligosacáridos con dos unidades menos que las del sustrato inicial. Los autores reportaron que la identidad de esta segunda enzima correspondía a una  $\alpha$ -amilasa con base en el carácter endo-glicosídico de la enzima, pero aclaran que la supuesta  $\alpha$ -amilasa mostraba una especificidad de sustrato y un modo de hidrólisis distinta a otras  $\alpha$ -amilasas de distintas fuentes. La síntesis de trehalosa se logró a partir de distintos sustratos como almidón, maltotriosa, maltotetraosa, maltohexaosa, maltoheptaosa y aún maltosa (aunque con bajo rendimiento) (Kato *et al.*, 1996a; Kato *et al.*, 1996b; Kato *et al.*, 1996c).

Podrían plantearse varias hipótesis alrededor del mecanismo por el cual Amy A lleva a cabo la síntesis de neotrehalosa. En el caso de la producción a partir de maltosa, podríamos suponer que la enzima lleva a cabo el corte de una molécula de maltosa y la misma glucosa liberada es reorientada en el sitio activo de modo que se lleva a cabo una transglicosilación intramolecular parecida a la descrita por los Kato *et al.* con un enlace  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1. Por otro lado, debemos recordar que la enzima lleva a cabo reacciones de transglicosilación generando productos de mayor peso molecular y acumulando glucosa en el medio; así, es probable también que la glucosa acumulada sirva como aceptor de residuos glicosilo en la reacción de síntesis de neotrehalosa, llevándose a cabo una transglicosilación intermolecular. En todo caso, con la maltosa y otros malto-oligosacáridos como sustratos iniciales, es probable que el aceptor de residuos glicosilo en esta reacción sea una molécula de glucosa, ya que resulta más improbable, por razones de impedimento estérico, la reorientación en el sitio activo de oligosacáridos de mayor peso molecular, aunque no podemos descartar completamente dicha posibilidad.

Por otro lado, la posibilidad de la enzima de transferir residuos glicosilo creando productos de mayor peso molecular que el sustrato inicial a partir de maltosa y otro sustrato significa que, si bien el aceptor de residuos glicosilo es probablemente una glucosa para la formación de neotrehalosa, la transferencia puede involucrar más de una unidad glicosilo, generándose glucosil-neotrehalosa, maltosil-neotrehalosa, etc. A pesar de que no fue posible purificar e identificar productos de tal índole, sí se registró la presencia de un pico, probablemente correspondiente a un trisacárido, señalado como P2 en la figura 6.27. Dados los datos obtenidos de la enzima, la identidad de este trisacárido bien podría ser glucosil-neotrehalosa. No sabemos si AmyA sería capaz de hidrolizar el enlace glicosídico  $\alpha$ -1,4 adyacente al enlace  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1, pero sabemos que la glucoamilasa es capaz de hacerlo, ya que después de la acción de esta enzima la señal desaparece,

pudiendo utilizar esta actividad enzimática después de la acción de AmyA para la concentración de neotrehalosa cuando el fin para el que se utilice AmyA sea la obtención de este producto.

En las figuras 6.28 y 6.29 puede observarse la presencia de otro pico de identidad desconocida, correspondiente a P3 en los cromatogramas mencionados. A pesar de que no podemos asegurarlo con certeza, a partir de la comparación de su tiempo de retención con el de distintos estándares, dicha señal podría corresponder a la presencia de nigerosa (3-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-glucosa). De ser este el caso, Amy A sería capaz de transglicosilar generando no sólo enlaces  $\alpha$ -1-4 y  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1 como hemos comprobado, sino también  $\alpha$ -1,3. Dada la versatilidad que presenta la enzima, y el hecho de que debe haber una reorientación del sustrato en el sitio activo para la generación del enlace  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1 de la neotrehalosa y dado el hecho de que la enzima forma dicho enlace, no hay razón para no suponer que es capaz de generar distintos tipos de enlaces en las reacciones de transglicosilación, si bien es lógico pensar que la formación de algunos se da de manera preferente a otros, en función del impedimento estérico en el sitio activo de la enzima.

En todo caso, hemos demostrado que Amy A es una productora de neotrehalosa y que es altamente transglicosídica y lo suficientemente versátil para generar enlaces distintos al  $\alpha$ -1,4, además de tener la ventaja de ser termofílica.

### **6.3.12 Reacciones de alcoholólisis con metanol y almidón**

Se llevaron a cabo reacciones de alcoholólisis a partir de almidón al 6% y con diferentes concentraciones de metanol (10, 20, 30 y 40%), tomando muestras después de 1, 5, 12 y 24 h de reacción. En la figura 6.31a se ejemplifica el registro de la producción de alquil-glicósidos (arriba de la mancha correspondiente a glucosa), principalmente metil-glicósido (MG), pero también la probablemente correspondiente a metil-maltósido (MG2). El metil-glicósido generado a las diferentes concentraciones de metanol después de 24 h de reacción fue cuantificado por HPLC; la figura 6.31b corresponde al cromatograma resultante de la reacción con 30% de metanol en el que se puede observar con claridad la señal de metil-glicósido generada.

En la tabla 6.4 se resumen los resultados de la cuantificación por HPLC con las diferentes concentraciones de metanol utilizadas. La mayor cantidad de metil-glicósido obtenido se observó a concentraciones de metanol entre 20 y 30%, en las que se logró obtener entre 3 y 3.5 mg/ml; en este punto, consideramos que existe un buen balance entre el rendimiento del producto y la estabilidad de la enzima.



Por otro lado, cabe recordar que junto con la generación de metil-glucósido, la enzima genera otros alquilglucósidos con un mayor número de residuos glicosilo que no pueden ser observados en las placas de cromatografía en capa fina ni por HPLC bajo las condiciones utilizadas. Para cuantificar el total de los alquil-glucósidos generados con la enzima a partir de almidón y metanol, se llevó a cabo una reacción con glucoamilasa, la cual degrada los oligosacáridos y alquil-glicósidos con enlaces  $\alpha$  (1-4) exclusivamente, hasta glucosa y metil-glucósido respectivamente. La tabla 6.5 compara la concentración de metil-glucósido total obtenido por AmyA con almidón al 6% y metanol al 20%, después de la reacción con glucoamilasa, con las obtenidas a partir de dos  $\alpha$ -amilasas sacarificantes caracterizadas anteriormente en el grupo de trabajo (provenientes de *A. niger* y *A. oryzae*).

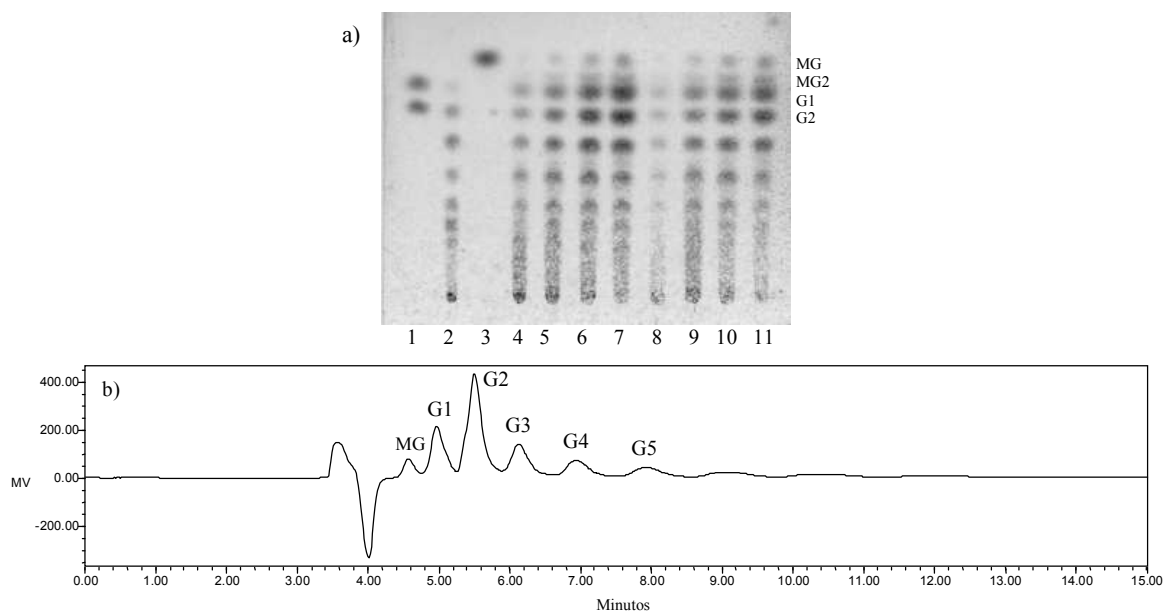


Figura 6.31. a) Cromatografía en capa fina de las reacciones de alcoholólisis a partir de almidón al 6% y metanol con Amy A. 1) Estándar de glucosa y maltosa; 2) Estándar de maltodextrinas; 3) Estándar de metil-glucósido; 4) metanol 10%, 1h; 5) metanol 10% 5h; 6) metanol 10%, 12h; 7) metanol 10%, 24h; 8) metanol 20%, 1 h; 9) metanol 20%, 5 h; 10) metanol 20%, 12 h; 11) metanol 20%, 24 h.

b) Cromatograma por HPLC de la reacción de alcoholólisis de Amy A con almidón al 6% y metanol al 30%.

Tabla 6.4. Metil-glucósido obtenido después de 24 h de reacción de la Amy A con almidón al 6% y diferentes concentraciones de metanol.

Metanol (%)	Metil-glucósido (mg/ml)
10	2.85
20	2.98
30	3.51
40	2.96

Tabla 6.5. Metil-glucósido obtenido de la reacción a partir de almidón (6%) y metanol con Amy A y otras  $\alpha$ -amilasas sacarificantes (Damián-Almazo *et al.*, 2008; Santamaría *et al.*, 1999).

Enzima	Metil-glucósido (mg/ml)
<i>T. maritima</i>	7.5
<i>A. niger</i>	2.32
<i>B. licheniformis</i> A289Y	0.76
<i>A. oryzae</i>	0.76

Así, Amy A es capaz de generar más de tres veces la concentración máxima obtenida con la  $\alpha$ -amilasa de *A. niger*, que era la enzima más prometedora en términos de su capacidad para llevar a cabo reacciones de alcoholólisis de las investigadas hasta el momento, con menor concentración de metanol en el medio de reacción. Este resultado puede atribuirse a una mayor capacidad transglicolítica de la enzima, a una mayor estabilidad de la enzima ante alcoholes en el medio de reacción, o a un compromiso entre ambas características. En todo caso, resultó ser un dato alentador para la utilización de Amy A en reacciones de alcoholólisis con maltodextrinas, las cuales no generan el mismo poder protector que el que se sabe ejerce el almidón gelatinizado. Por otro lado, cabe resaltar el hecho de que al degradar los productos de reacción con la enzima glucoamilasa, la concentración medida de metil-glucósido es mayor que antes de dicha degradación, a partir de lo cual se puede concluir que Amy A también es capaz de generar productos de alcoholólisis de mayor peso molecular que el metil-glucósido y que cuando no se utiliza la glucoamilasa para degradar dichos productos, se genera una notoria subestimación de los productos de alcoholólisis de la enzima.

### 6.3.13 Reacciones de alcoholisis de Amy A con metanol y maltodextrinas.

Se llevaron a cabo reacciones de alcoholisis con maltodextrinas al 15% y diferentes concentraciones de metanol (10, 20, 30, 40 y 50%). Como se mencionó anteriormente, el uso de maltodextrinas como sustratos es atractiva debido a la posibilidad de manejar un medio de reacción mucho menos viscoso que el que resulta con almidón. En la figura 6.32 puede observarse, a partir de las placas de cromatografía en capa fina de las reacciones, que la enzima es capaz de generar metil-glucósido a las diferentes concentraciones probadas. El metil-glucósido generado de las reacciones a las 24 h de reacción fue cuantificado por HPLC y los resultados se esquematizan en la figura 6.33.

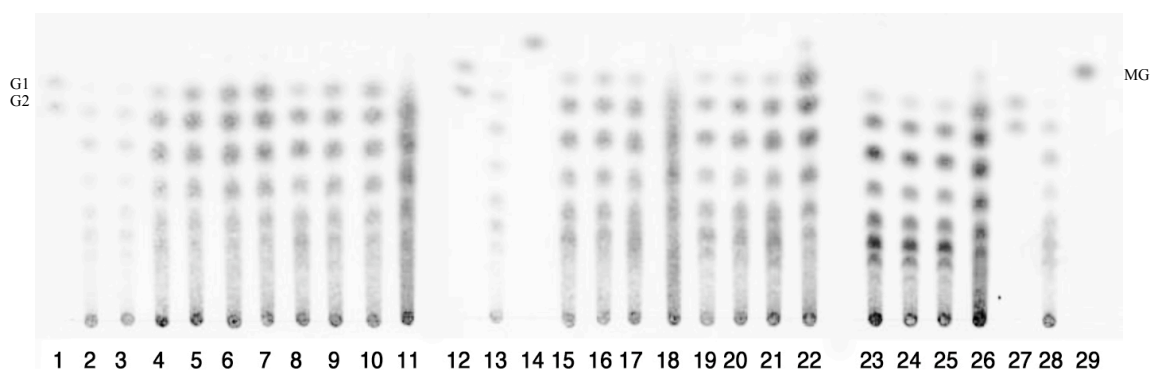


Figura 6.32 Cromatografía en capa fina de las reacciones de alcoholisis a partir de maltodextrinas al 15% y metanol con Amy A. 1) Estándar de glucosa y maltosa; 2) y 3) Estándar de maltodextrinas; 4) metanol 10%, 1 h; 5) metanol 10%, 5 h; 6) metanol 10%, 12 h; 7) metanol 10%, 24 h; 8) metanol 20%, 1 h; 9) metanol 20%, 5 h; 10) metanol 20%, 12 h; 11) metanol 20%, 24 h; 12) Estándar de glucosa y maltosa; 13) Estándar de maltodextrinas; 14) Estándar de metil-glucósido; 15) metanol 30%, 1 h; 16) metanol 30%, 5 h; 17) metanol 30%, 12 h; 18) metanol 30%, 24 h; 19) metanol 40%, 1 h; 20) metanol 40%, 5 h; 21) metanol 40%, 12 h; 22) metanol 40%, 24 h; 23) metanol 50%, 1 h; 24) metanol 50%, 5 h; 25) metanol 50%, 12 h; 26) metanol 50%, 24 h; 27) Estándar de glucosa y maltosa, 28) Estándar de maltodextrinas; 29) Estándar de metil-glucósido.

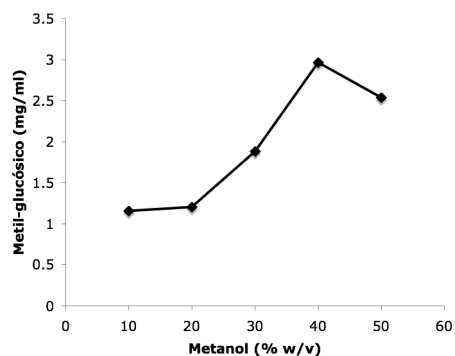


Figura 6.33. Efecto de la concentración de methanol en los productos de alcoholísis con Amy A, a partir de maltodextrinas al 15% y 24 h de reacción.

Se encontró que empleando una concentración de metanol al 40%, fue posible obtener prácticamente 3 mg/ml de metil-glucósido, valor parecido al máximo obtenido con almidón al 6% y 20 - 40% de metanol. Como se explicó anteriormente, las  $\alpha$ -amilasas sacarificantes hasta ahora estudiadas no resultan eficientes en las reacciones de alcoholísis a partir de maltodextrinas. Estos resultados demuestran que Amy A es capaz de utilizar estos sustratos para reacciones de alcoholísis, aún sin el poder protector del almidón en el medio de reacción. Esto indica la ventaja que representa la utilización de una enzima termófila en comparación con sus contrapartes mesófilas. Así, es posible que Amy A en efecto sea más estable ante la concentración de alcohol en el medio y que ello sea un factor que explique su capacidad para utilizar sustratos de bajo peso molecular para llevar a cabo reacciones de transglucosilación, incluso con alcoholes en el medio de reacción, con la generación de alquil-glicósidos.

Una vez obtenidos estos resultados, decidimos probar la capacidad de la enzima para llevar a cabo reacciones de alcoholísis a partir de maltosa. Con tal fin, se llevaron a cabo reacciones con maltosa al 10% y diferentes concentraciones de metanol. Desafortunadamente, no se registró la generación de alquil-glicósidos después de 24 h de reacción.

Se llevaron a cabo también reacciones con AmyA y metil-glucósido a diferentes concentraciones como sustrato con el objetivo de comprobar si la enzima es capaz de hidrolizar el producto generado de la alcoholísis con metanol. La enzima se añadió a una concentración de 0.5 U/ml y las reacciones se analizaron por cromatografía en capa fina después de 5 h. En la figura 6.34 se muestra la placa de CCF obtenida, en donde se puede observar que no se lleva a cabo la hidrólisis del sustrato.

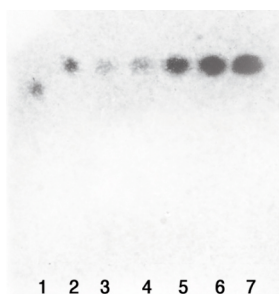


Figura 6.34. Cromatografía en capa fina de las reacciones de Amy A y metil-glucósido. 1) Estándar de glucosa; 2) Estándar de metil-glucósido; 3) metil-glucósido 0.5%; 4) metil-glucósido 1%; 5) metil-glucósido 1.5%; 6) metil-glucósido 2%; 7) metil-glucósido 2.5%.

### 6.3.14 Reacciones de alcoholólisis con Amy A a partir de butanol y almidón.

Para analizar si alcoholes de mayor peso molecular que el metanol pueden fungir como aceptores nucleofílicos de Amy A en reacciones de alcoholólisis, llevamos a cabo reacciones con almidón al 6% y butanol al 8%. Las reacciones se analizaron por cromatografía en capa fina después de 48 h de reacción y el cromatograma obtenido se muestra en la figura 6.35.

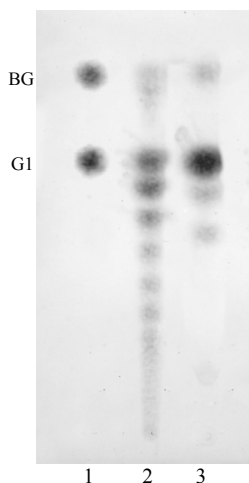


Figura 6.35. Cromatografía en capa fina de las reacciones de Amy A y almidón al 6% y butanol al 8%. 1) Estándar de glucosa y butil-glucósido, 2) Productos de reacción antes de la acción de la enzima glucoamilasa, 3) Productos de reacción después de la acción de la enzima glucoamilasa.

Después de 48 horas de reacción, se cuantificó la cantidad de butil-glucósido generada por la enzima y resultó ser de 4 mg/ml. Así, se demostró que la enzima es capaz de

utilizar este alcohol para la generación de alquil-glicósidos con una mayor capacidad surfactante que los generados a partir de las reacciones con metanol y por lo tanto, con un mayor valor comercial.

Finalmente, cabe señalar que a lo largo de la presente investigación, fueron las enzimas sacarificantes y transglicosídicas las capaces de generar glicósidos, productos de las reacciones de transglicosilación (alquil-glicósidos y neotrehalosa), soportando la hipótesis planteada inicialmente, que relaciona la capacidad transglicosídica de las enzimas amilolíticas con su capacidad para generar para generar este tipo de productos.

## 7. CONCLUSIONES

En la primera etapa del proyecto, se concluyó que la combinación de actividades de hidrólisis y transferencia, resulta en una mayor eficiencia en la degradación del almidón, soportando la hipótesis planteada inicialmente, que relaciona las reacciones de transglicosilación de las enzimas amilolíticas sacarificantes con la mayor eficiencia en la degradación del polímero mencionado.

Se logró identificar una  $\alpha$ -amilasa sacarificante, termófila, con alta capacidad transglicosídica, capaz de generar productos de transferencia de alto valor comercial a partir de diferentes sustratos donadores de residuos glicosilo como alquil-glicósidos y el disacárido no reductor neotrehalosa, con características atractivas para su utilización en diferentes aplicaciones industriales.

A partir de las distintas reacciones de transglicosilación caracterizadas de AmyA, podemos decir que la enzima es altamente versátil y capaz de llevar a cabo reacciones de hidrólisis y transferencia produciendo, en el último caso, compuestos con enlaces distintos al  $\alpha$ -1,4. Amy A resultó ser una enzima con mucho mayor versatilidad para llevar a cabo reacciones de transferencia que las otras  $\alpha$ -amilasas sacarificantes estudiadas en el laboratorio y reportadas, con la gran ventaja de ser además una enzima termofílica, con una temperatura óptima de 85°C y estable ante alcoholes.

Por todo lo anteriormente mencionado, AmyA posee un uso potencial en distintos procesos de obtención de productos con un alto valor comercial.

A lo largo de la presente investigación, se observó que las enzimas sacarificantes, capaces de llevar a cabo reacciones de transglicosilación, fueron aquellas capaces de generar glicósidos, como alquil-glicósidos y neotrehalosa, soportando la hipótesis inicialmente planteada, que relaciona la capacidad transglicosídica de estas enzimas con su capacidad de generar este tipo de productos.

## 8. PERSPECTIVAS

El hecho de haber identificado una  $\alpha$ -amilasa termófila y altamente transglicosídica, capaz de generar enlaces distintos al  $\alpha$  1,4, abre una amplia gama de posibilidades de investigación y planteamiento de nuevas metas. Resulta conveniente, por un lado, la optimización de las condiciones de reacción para la obtención de un mayor rendimiento de neotrehalosa, con el fin de establecer un sistema para su fácil extracción y que eventualmente permita su aplicación real en industrias de diversa índole.

Por otro lado, resulta también conveniente la identificación de otros disacáridos y trisacáridos formados en las reacciones de transglicosilación con Amy A, con enlaces distintos al  $\alpha$  1,4 y con posible aplicación industrial, que además arrojen más luz sobre la versatilidad de la enzima para la formación de enlaces distintos al  $\alpha$ -1,4

En el rubro de las reacciones de alcoholólisis, resultaría interesante analizar el potencial de Amy A para llevar a cabo reacciones en medios bifásicos con alcoholes de mayor peso molecular (como hexanol u octanol), que generarían alquil-glicósidos con mayor capacidad surfactante, de interés en distintos tipos de industria. Por otro lado, la versatilidad de Amy A en reacciones de transferencia, permitiría probablemente la utilización de distintos aceptores de residuos glicosilo, como polioles, a partir de de maltodextrinas y malto-oligosacáridos de menor peso molecular, que tal y como se demostró en este proyecto, son buenos sustratos de la enzima.

Con estas perspectivas en consideración, se lograría ampliar la obtención de diversos productos de alto valor comercial, con rendimientos adecuados para su utilización en distintas aplicaciones industriales.



## 9. REFERENCIAS

- Aga, H.; Shibuya, T.; Sugimoto, T.; Miyake, T. "Non-Reducing Oligosaccharide with Neotrehalose Structure, and its Products and Uses". Assignee: Kaisha, K.; Seibutsu, H.; Kenkyujo. Int. Cl. A23L 1/100. United States Patent. 5523099. 1996-06-04.
- Alberto, F.; Bignon, C.; Sulzenbacher, G.; Henrissat, B.; Czjzek, M., 2004, "The Three-Dimensional Structure of Invertase ( $\beta$ -Fructosidase) from *Thermotoga maritima* Reveals a Bimodular Arrangement and an Evolutionary Relationship between Retaining and Inverting Glycosidases". *J. Biol. Chem.* 279: 18903-18910.
- Allen, J.; Thoma, J., 1978, "Model for Carbohydrase Action. *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -Amylase Degradation of Maltotriose". *Biochem.* 17: 2345-2350.
- Andreotti, G.; Giordano, A.; Tramice, A.; Mollo, E.; Trincone, A., 2006, "Hydrolyses and Transglycosylations Performed by Purified  $\alpha$ -D-Glucosidase of the Marine Mollusc *Aplysia fasciata*". *J. Biotechnol.* 122: 274-284.
- Ballschmier, M.; Fütterer, O.; Liebl, W., 2006, "Identification and Characterization of a Novel Intracellular Alkaline  $\alpha$ -Amylase from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima* MSB8". *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2206-2211.
- Bauer, M.; Driskill, L.; Kelly, R., 1998, "Glycosyl Hydrolases from Hyperthermophilic Microorganisms". *Biochem. Eng.* 9:141-145.
- Blakeney, S.; Stome, B., 1985, "Activity and Action Pattern of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -Amylase in Aqueous Ethanol". *FEBS Lett.* 186: 229-232.
- Bourne, Y.; Henrissat, B., 2001, "Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases: Families and Functional Modules". *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 593-600.
- Bronnenmeier, K.; Kern, A.; Liebl, W.; Staudenbauer, W., 1995. "Purification of *Thermotoga maritima* Enzymes for the Degradation of Cellulosic Materials". *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1399-1407.
- Bruins, M.; Janssen, A.; Boom, R., 2001, "Thermostzymes and their Applications". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 90: 155-186.
- Cameotra, S.; Makkar, R., 1998, "Synthesis of Biosurfactants in Extreme Conditions". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 520-529.
- Chhabra, S.; Shockley, K.; Ward, D.; Kelly, R., 2002, "Regulation of Endo-Acting Glycosyl Hydrolases in the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima* Grown on Glucan- and Mannan- Based Polysaccharides". *Appl. Environ. Biotechnol.* 68: 545-554.

- Comfort, D.; Bobrov, K.; Shabalin, K.; Harris, J.; Kulminskaya, A.; Brumer, H.; Kelly, R., 2007, "Biochemical Analysis of *Thermotoga maritima* GH36 Alpha-Galactosidase (TmGalA) Confirms the Mechanistic Commonality of Clan GH-D Glycosyl Hydrolases". *Biochem.* 46: 3319-3330.
- Crabb, W.; Mitchinson, C., 1997, "Enzymes Involved in the Processing of Starch to Sugars". *TIBTECH.* 15: 349-352.
- Damager, I.; Numao, S.; Chen, H.; Brayer, G.; Withers, S., 2004, "Synthesis and Characterisation of Novel Chromogenic Substrates for Human Pancreatic  $\alpha$ -Amylase". *Carb. Res.* 339: 1727-1737.
- Damián-Almazo, J.; Moreno, A.; López-Munguía, A.; Soberón, X.; González-Muñoz, F.; Saab-Rincón, G., 2008, "Enhancement of the Alcoholytic Activity of  $\alpha$ -Amylase from *Thermotoga maritima* MSB8 (DSM 3109) by Site-Directed Mutagenesis". *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5168-5177.
- Davies, G.; Henrissat, B., 1995, "Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases". *Structure.* 3: 853-859.
- Davies, G.; Wilson, K.S.; Henrissat, B., 1997, "Nomenclature for Sugar-Binding Subsites in Glycosyl Hydrolases". *Biochem. J.* 321: 557-559.
- Del-Río, G.; Morett, E., Soberón, X., 1997, "Did Cyclodextrin Glycosyltransferases Evolve from  $\alpha$ -Amylases?" *FEBS Lett.* 416: 221-224.
- Del-Río, G., Saab-Rincón, G., Santamaría, R.I., López-Munguía, A., Soberón, X., 1999, "Introducing Transglycosylation Activity in a Liquefying Alpha-Amylase". *FEBS Lett.* 453: 100-106.
- Dickmanns, A.; Ballschmiter, M.; Liebl, W.; Ficner, R., 2006, "Structure of the Novel  $\alpha$ -Amylase AmyC from *Thermotoga maritima*". *Biol. Cryst.* D62: 262-270.
- Drouet, P.; Zhang, M.; Legoy, M., 1994, "Enzymatic Synthesis of Alkyl  $\beta$ -D-Xilosides by Transglycosylation and Reverse Hydrolysis". *Biotechnol. Bioeng.* 43: 1075-1080.
- Eneyskaya, E.; Brumer, H.; Backinowsky, L.; Ivanen, D.; Kulminskaya, A.; Shabalin, K.; Neustroev, K., 2003, "Enzymatic Synthesis of  $\beta$ -Xylanase Substrates: Transglycosylation Reactions of the  $\beta$ -Xylosidase from *Aspergillus* sp.". *Carb. Res.* 338: 313-325.
- Eneyskaya, E.; Ivanen, D.; Bobrov, K.; Isaeva-Ivanova, L.; Shabalin, K.; Savel'el, A.; Golubev, A.; Kulminskaya, A., 2007, "Biochemical and Kinetic Analysis of the GH3 Family  $\beta$ -Xylosidase from *Aspergillus awamori* X-100". *Arch. Biochem. Biophys.* 457: 225-234.

- Fiechter, A.; 1992, “Biosurfactants: Moving Towards Industrial Application”. *TIBTECH*. 10: 208-217.
- Fourage, L.; Dion, M.; Colas, B., 2000, “Kinetic Study of a Thermostable  $\beta$ -Glycosidase of *Thermus thermophilus*. Effects of Temperature and Glucose on Hydrolysis and Transglycosylation Reactions”. *Glycoconjugate J.* 17: 377-383.
- García-Garibay, M.; López-Munguía, A.; Barzana, E., 2000, “Alcoholysis and Reverse Hydrolysis Reactions in Organic One-Phase System with a Hyperthermophilic  $\beta$ -Glycosidase”. *Biotechnol. Bioeng.* 69: 627-632.
- Goyal, K.; Selvakumar, P.; Hayashi, K., 2001, “Characterization of a Thermostable  $\alpha$ -Glucosidase from *Thermotoga maritima* Showing Transglycosylation Activity”. *J. Mol. Cat. B. Enzymatic.* 15: 45-53.
- Graber, M.; Combes, D., 1990, “Action Pattern of Alpha-Amylase from *Aspergillus oryzae* in Concentrated Media”. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 12-18.
- Gupta, R.; Gigras, P.; Mohapatra, H.; Goswami, V.; Chauhan, B., 2003, “Microbial  $\alpha$ -Amylases: a Biotechnological Perspective”. *Process Biochem.* 00: 1-18.
- Guzmán-Maldonado, H.; Paredes-López, O.; 1995, “Amylolytic Enzymes and Products Derived from Starch: A Review”. *Crit. Rev. Food. Sci. Nut.* 35: 373-403.
- Haki, G.; Rackshit, S., 2003, “Developments in Industrially Important Thermostable Enzymes: A Review”. *Biores. Technol.* 89:17-34.
- Hansson, T.; Kaper, T.; Van der Oost. J.; De vos, W.; Adlercreutz, P., 2001, “Improved Oligosaccharide Synthesis by Protein Engineering of  $\beta$ -Glucosidase CelB from Hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*”. *Biotechnol. Bioeng.* 73: 203-210.
- Hart, J.; Kröger, L.; Falshaw, A.; Farkas, E.; Thiem, J.; Win, A., 2004, “Enzyme-Catalysed Synthesis of Galactosylated 1D- and 1L-*chiro*-Inositol, 1D-Pinitol, *myo*-Inositol and Selected Derivatives using the  $\beta$ -Galactosidase from the Thermophile *Thermoanaerobacter* sp. Strain TP6-B1”. *Carb. Res.* 339: 1857-1871.
- Henrissat, B.; 1991, “A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities”. *Biochem. J.* 280: 309-316.
- Henrissat, B.; Bairoch, A.; 1993, “New Families in the Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities”. *Biochem. J.* 293: 781-788.
- Henrissat, B.; Bairoch, A.; 1996, “Updating the Sequence-Based Classification of Glycosyl hydrolases”. *Biochem. J.* 316: 695-696.
- Henrissat, B.; Davies, G.; 1997, “Structural and Sequence-Based Classification of Glycosyl Hydrolases”. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 637-644.

- Hommalai, G.; Chaiyen, P.; Svasti, J., 2005, “Studies of the Transglucosylation Reactions of Cassava and Thai Rosewood  $\beta$ -Glucosidases using 2-Deoxy-2-Fluoro-Glycosyl-Enzyme Intermediates”. *Arch. Biochem, Biophys.* 442: 11-20.
- Huber, R.; Langworthy, T.; König, H.; Thomm, M.; Woese, C.; Sleytr, U.; Stetter, K., 1986, “*Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C”. *Arch. Microbiol.* 144: 324-333.
- Ismail, A.; Soultani, S.; Ghoul, M., 1999, “Enzymatic Catalysed Synthesis of Alkylglycosides in Monophasic and Biphasic Systems. I. The Transglycosylation Reaction”. *J. Biotechnol.* 69: 135-143.
- Janecek, S., 1995, “Close Evolutionary Relatedness among Functionally Distantly Related Members of the ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>-Barrel Glycosyl Hydrolases Suggested by the Similarity of their Fifth Conserved Sequence Region”. *FEBS Lett.* 377: 6-8.
- Janecek, S., 1997, “ $\alpha$ -Amylase Family: Molecular Biology and Evolution”. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67: 67-97.
- Janecek, S.; Svensson, B.; Henrissat, B., 1997, “Domain Evolution in the  $\alpha$ -Amylase Family”. *J. Mol Evol.* 45: 322-331.
- Jiang, Z.; Zhu, Y.; Li, L.; Yu, X.; Kusakabe, I.; Kitaoka, M.; Hayashi, K., 2004, “Transglycosylation Reaction of Xylanase B from the Hyperthermophilic *Thermotoga maritima* with the Ability of Synthesis of Tertiary Alkyl  $\beta$ -D-Xylobiosides and Xylosides”. *J. Biotechnol.* 114: 125-134.
- Kato, M.; Miura, Y.; Kettoku, M.; Shindo, K.; Iwamatsu, A.; Kobayashi, K., 1996a, “Purification and Characterization of New Trehalose-Producing Enzymes Isolated from the Hyperthermophilic Archae, *Sulfolobus solfataricus* KM1”. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 546-550.
- Kato, M.; Miura, Y.; Kettoku, M.; Shindo, K.; Iwamatsu, A.; Kobayashi, K., 1996b, “Reaction Mechanism of a New Glycosyltrehalose-Producing Enzyme Isolated from the Hyperthermophilic Archaeum, *Sulfolobus solfataricus* KM1”. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 921-924.
- Kato, M.; Miura, Y.; Kettoku, M.; Shindo, K.; Iwamatsu, A.; Kobayashi, K., 1996c, “Reaction Mechanism of a New Glycosyltrehalose-Hydrolyzing Enzyme Isolated from the Hyperthermophilic Archaeum, *Sulfolobus solfataricus* KM1”. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 925-928.
- Kato, N.; Suyama, S.; Shirokane, M.; Kato, M.; Kobayashi, T.; Tsukagoshi, N., 2002, “Novel  $\alpha$ -Glucosidase from *Aspergillus nidulans* with Strong Transglycosylation Activity”. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1250-1256.

- Kim, C.; Ji, E.; Oh, D., 2004, "Characterization of a Thermostable Recombinant  $\beta$ -Galactosidase from *Thermotoga maritima*". *J. Appl. Microbiol.* 97: 1006-1014.
- Kindle, K., 1983, "Characteristics and Production of Thermostable  $\alpha$ -Amylase". *Appl. Biochem. Biotech.* 8: 153-170.
- Kirk, O.; Borchert, T.; Fuglsang, C., 2002, "Industrial Enzyme Applications". *Curr. Opin. Biotechnol.* 345-351.
- Kriehäuser, G.; Liebl, W., 2000, "Pullulanase from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*: Purification by  $\beta$ -Cyclodextrin Affinity Chromatography". *J. Chromat. B.* 737: 245-251.
- Kuriki, T.; Kaneko, H.; Yanase, M.; Takata, H.; Shimada, J.; Handa, S.; Takada, T.; Umeyama, H.; Okada, S., 1996, "Controlling Substrate Preference and Transglycosylation Activity of Neopullulanase by Manipulating Steric Constraint and Hydrophobicity in Active Center". *J. Biol. Chem.* 29: 17321-17329.
- Kuriki, T.; Imanaka, T., 1999, "The Concept of the  $\alpha$ -Amylase Family: Structural Similarity and Common Catalytic Mechanism". *J. Biosc. Bioeng.* 87: 557-565.
- Larsson, J.; Svensson, D.; Adlercreutz, P., 2005, " $\alpha$ -Amylase-Catalysed Synthesis of Alkyl Glycosides". *J. Mol. Cat. B.* 37: 84-87.
- Liebl, W.; Ruile, P.; Bronnenmeier, K.; Reidel, K.; Lottspeich, F.; Greiff, I., 1996, "Analysis of a *Thermotoga maritima* DNA Fragment Encoding Two Similar Thermostable Cellulases, CelA and CelB, and Characterization of the Recombinant Enzymes". *Microbiol.* 142:2533-2542.
- Liebl, W.; Stemplinger, I.; Ruile, P., 1997, "Properties and Gene Structure of the *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -Amylase AmyA, a Putative Lipoprotein of a Hyperthermophilic Bacterium". *J. Bacteriol.* 179: 941-948.
- Lim, W.; Park, S.; An, C.; Lee, J.; Hong, S.; Shin, E. Kim, E.; Kim, J.; Yun, H., 2003, "Cloning and Characterization of a Thermostable Intracellular  $\alpha$ -Amylase Gene from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima* MSB8". *Res. Microbiol.* 154: 681-687.
- Lodge, J.; Maier, T.; Liebl, W.; Hoffmann, V.; Sträter, N., 2003, "Crystal Structure of *Thermotoga maritima* Alpha-Glucosidase AglA Defines a New Clan of NAD<sup>+</sup> - Dependent Glycosidases". *J. Biol. Chem.* 278: 19151-19158.
- López, R.; Fernández-Mayoralas, A., 1994, "Enzymatic  $\beta$ -Galactosidation of Modified Monosaccharides: Study of the Enzyme Selectivity for the Acceptor and Its Application to the Synthesis of Disaccharides". *J. Org. Chem.* 59: 737-745.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, U. L., 1951, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent". *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

- Ly, H.; Withers, S., 1999, "Mutagenesis of Glycosidases". *Annu. Rev. Biochem.* 68: 487-522.
- Marchal, L.M.; Jonkers, J.; Frankie, G.; Gooijer, C.F.; Tramper, J., 1999, "The Effect of Process Conditions on the  $\alpha$ -Amylolytic Hydrolysis of Amylopectin Potato Starch: An Experimental Design Approach". *Biotechnol. Bioeng.* 62: 348-357.
- Maruta K.; Nakada, T.; Kubota M.; Chaen, H.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Tsujiska, Y., 1995, "Formation of Trehalose from Maltooligosaccharides by a Novel Enzymatic System". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 1829-1834.
- McCarter, J.; Withers, S., 1994, "Mechanisms of Enzymatic Glycoside Hydrolysis". *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4: 885-892.
- McGregor, E., 1988, " $\alpha$ -Amylase Structure and Activity". *J. Prot. Chem.* 7:399-414.
- McGregor, E.; Janecek, S.; Svensson, B., 2001, "Relationship of Sequence and Structure to Specificity in the  $\alpha$ -Amylase Family of Enzymes". *Biochim. Biophys. Acta.* 1546: 1-20.
- Monsan, P.; Paul, F., 1995, "Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides". *FEMS Microbiol. Rev.* 16: 187-192.
- Moreno-Beltrán, A.; Salgado, L.; Vazquez-Duhalt, R.; López-Munguía, A., 1999, "Modelling the Alcoholysis Reaction of  $\beta$ -Galactosidase with Butanol in Reverse Micelles". *J. Mol. Cat. B.* 6: 1-10.
- Nakajima, M.; Fushinobu, S.; Imamura, H.; Shoun, H.; Wakagi, T., 2006. "Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of Cytosolic  $\alpha$ -Mannosidase from *Thermotoga maritima*". *Acta Cryst.* F62: 104-105.
- Nelson, K.; Clayton, R.; Gil, S.; Gwinn, M.; Dodson, R.; Haft, D.; Hickey, E.; Peterson, J.; Nelson, W.; Ketchum, K.; McDonald, L.; Utterback, T.; Malek, J.; Linher, K.; Garret, M.; Stewart, A.; Cotton, M.; Pratt, M.; Phillips, C.; Richardson, D.; Heidelberg, J.; Sutton, G.; Fleischmann, R.; Eisen, J.; White, O.; Salzberg, S.; Smith H.; Venter, C. Fraser, C., 1999, "Evidence for Lateral Gene Transfer Between Archaea and Bacteria from Genome Sequence of *Thermotoga maritima*". *Nature.* 399: 323-329.
- Nielsen, J.; Borchert, T., 2000, "Protein Engineering of Bacterial  $\alpha$ -Amylases". *Biochim. Biophys. Acta.* 1543: 253-274.
- Nishimura, T.; Kometani, T.; Takii, H.; Terada, Y.; Okada, S., 1994, "Purification and Some Properties of  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus subtilis* X-23 That Glucosylates Phenolic Compounds Such as Hydroquinone". *J. Ferm. Bioeng.* 78: 31-36.

- Okahata, Y.; Mori, T., 1998, "Transglycosylation Catalyzed by a Lipid-Coated  $\beta$ -D-Galactosidase in a Two-Phase Aqueous-Organic System". *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 5: 119-123.
- Ooi, Y.; Hashimoto, T.; Mitsuo, N.; Satoh, T., 1984, "Enzymic Synthesis of Chemically Unstable Cardiac Glycosides". *Tetrahedron Lett.* 25: 2241-2244.
- Prodanovi'c, R.; Milosavi'c, N.; Dusan, S.; Cirkovic, T.; Vujcic, Z., 2005, "Synthesis of Hydroquinone- $\alpha$ -Glucoside by  $\alpha$ -Glucosidase from Baker's Yeast". *Biotechnol. Lett.* 27: 551-554.
- Puchart, V.; Biely, P.; 2005, "Glycosylation of Internal Sugar Residues of Oligosaccharides Catalyzed by  $\alpha$ -Galactosidase from *Aspergillus fumigatus*". *Biochim. Biophys. Acta.* 1726: 206-216.
- Rabiú, B.; Jay, A.; Gibson, G.; Rastall, R., 2001, "Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by  $\beta$ -Galactosidases from *Bifidobacterium* Species". *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2526-2530.
- Reddy, N.S.; Nimmagadda, A.; Rao, S., 2003, "An Overview of the Microbial  $\alpha$ -Amylase Family". *African J. Biotechnol.* 2: 645-648.
- Rivera, M.H.; López-Munguía, A.; Saab-Rincón, G. 2003, " $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis* Mutants Near to the Catalytic Site: Effects on Hydrolytic and Transglycosylation Activity". *Protein Eng.* 16: 505-514.
- Rodríguez, M.; González, F.; Bárzana, E.; López-Munguía, A. 1997, "Estability of Invertase in Alcoholsis Reactions with Methanol". *J. Mol. Cat. B.* 2: 299-306.
- Roujeinikova, A.; Raasch, C.; Sedelnikova, S.; Libl, W.; Rice, D., 2002, "Crystal Structure of *Thermotoga maritima* 4- $\alpha$ -Glucanotransferase and its Acarbose Complex: Implications for Substrate Specificity and Catalysis". *J. Mol. Biol.* 321: 149-162.
- Rugh, S.; Nielsen, T.; Poulsen, P., 1979, "Application Possibilities of a Novel Immobilized Glucoamylase". *Starch.* 31: 333.
- Saito, A., 1973, "A Thermophilic Extracellular  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis*". *Arch. Biochem. Biophys.* 155: 290-298.
- Salleh, H.; Müllegger, J.; Reid, S.; Chan, W.; Hwang, J.; Warren, A.; Withers, S., 2006, "Cloning and Characterization of *Thermotoga maritima*  $\beta$ -Glucuronidase". *Carb. Res.* 341: 49-59.
- Saab-Rincón, G.; del Rio, G.; Santamaría, R.; López-Munguía, A.; Soberón, X., 1999, "Introducing Transglycosylation Activity in a Liquefying  $\alpha$ -Amylase". *FEBS Lett.* 453: 100-106.

- Santamaría, R.I.; Saab-Rincón, G.; Rodríguez, M. E.; Soberón, X.; López-Munguía, A., 1999, "Alcoholysis Reactions from Starch with  $\alpha$ -Amylases". *FEBS Lett.* 452: 346-350.
- Shibuya, T.; Chaen, H.; Sakai, S.; Miyake, T. "Process for Preparing Neotrehalose, and its Uses" Assignee: Kabushiki, K.; Hayashibara, S.; Kagaku, K. United States Patent 5578469. 1996-11-26.
- Shinoyama, H.; Takei, K.; Ando, A.; Fuji, T.; Sasaki, M.; Doi, Y.; Yasui, T., 1991, "Enzymatic Synthesis of Useful Alkyl  $\beta$ -Glucosides". *Agric. Biol. Chem.* 55: 1679-1681.
- Sinnot, M., 1990, "Catalytic Mechanisms of Enzymic Glycosyl Transfer". *Chem. Rev.* 90: 1171-1202.
- Spangenberg, P.; André, C.; Dion, M.; Rabiller, C.; Mattes, R., 2000, "Comparative Study of New  $\alpha$ -Galactosidases in Transglycosylation Reactions". *Carb. Res.* 329: 65-73.
- Spangenberg, P.; André, C.; Langlois, V.; Dion, M.; Rabiller, C., 2002, " $\alpha$ -Galactosyl Fluoride in Transfer Reactions Mediated by the Green Coffee Beans  $\alpha$ -Galactosidase in Ice". *Carb. Res.* 337: 221-228.
- Suganuma, T.; Ohnishi, M.; Nagahama, T., 1996, "Elucidation of the Subsite Structure of Bacterial Saccharifying Alpha Amylase and its Mode of Degradation of Maltose". *Carb. Res.* 282: 171-180.
- Suresh, C.; Kitaoka, M.; Hayashi, K., 2003, "A Thermostable Non-Xylanolytic Alpha-Glucuronidase of *Thermotoga maritima* MSB8". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:2359-2364.
- Svensson, B.; 1994, "Protein Engineering in the  $\alpha$ -Amylase Family: Catalytic Mechanism, Substrate Specificity and Stability". *Plant. Mol. Biol.* 25: 141-157.
- Terada, Y.; Sanbe, H.; Takaha, T.; Kitahata, S.; Koizumi, K.; Okada, S., 2001, "Comparative Study of the Cyclization Reactions of Three Bacterial Cyclomaltodextrin Glucanotransferases". *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1453-1460.
- Tonkova, A., 1998, "Bacterial Cyclodextrin Glucanotransferase". *Enzyme Microb. Technol.* 22: 678-686.
- Trincone, A.; Giordano, A., 2006, "Glycosyl Hydrolases and Glycosyltransferases in the Synthesis of Oligosaccharides". *Curr. Org. Chem.* 10: 1163-1193.
- Tzortzis G.; Jay, A.; Baillon, M.; Gibson, G.; Rastall, R., 2003, "Synthesis of  $\alpha$ -Galactosidase from *Lactobacillus reuteri* of Canine Origin". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 286-292.



- Van der Maarel, M.; Van der Veen, B.; Uitdehaag, J.; Leemhuis, H.; Dijkhuizen, L., 2002, "Properties and Applications of Starch-Converting Enzymes of the  $\alpha$ -Amylase Family". *J. Biotechnol.* 94: 137-155.
- Van der Veen, B.; Uitdehaag, J.; Dijkstra, B.; Dijkhuizen, L., 2000, "Engineering of Cyclodextrin Glycosyltransferase Reaction and Product Specificity". *Biochim. Biophys. Acta.* 1543: 336-360.
- Vasella, A.; Davies, G.; Böhm, M., 2002, "Glycosidase Mechanisms". *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 619-629.
- Vieille, C.; Zeikus, G., 2001, "Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses and Molecular Mechanisms for Thermostability". *Am. Soc. Microbiol.* 65: 1-43.
- Wassenberg, D.; Schurig, H.; Liebl, W.; Jaenicke, R., 1997, "Xylanase XynA from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*: Structure and Stability of the Recombinant Enzyme and its Isolated Cellulose-Binding Domain". *Protein Sci.* 6: 1718-1726.
- Wierenga, R. K., 2001, "The TIM-Barrel Fold: A Versatile Framework for Efficient Enzymes". *FEBS Lett.* 492: 193-198.
- Zechel, D.; Withers, S., 2000, "Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a Finely Tuned Catalyst". *Acc. Chem. Res.* 33: 11-18.
- Zeng, X.; Yoshino, R.; Murata, T.; Akisaka, K.; Usui, T., 2000, "Regioselective Synthesis of p-Nitrophenyl Glycosides of  $\beta$ -D-Galactopyranosyl-Disaccharides by Transglycosylation with  $\beta$ -D-Galactosidases". *Carb. Res.* 325: 120-131.
- Zentgraf, B., 1992, "Enzymes from Thermophiles". *Acta Biotechnol.* 5: 377-382.

## **ANEXOS**

Alina Moreno  
Gloria Saab-Rincón  
Rosa Isela Santamaría  
Xavier Soberón  
Agustín López-Munguía

Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional Autónoma  
de México,  
Cuernavaca, Morelos, México

## A more Efficient Starch Degradation by the Combination of Hydrolase and Transferase Activities of $\alpha$ -Amylase and Cyclomaltodextrin Glucanotransferase

$\alpha$ -Amylases catalyze the hydrolysis of internal  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) linkages of glucose polymers as their main reaction; however, some  $\alpha$ -amylases catalyze transfer reactions in addition to hydrolysis. It has been observed that those  $\alpha$ -amylases capable of transferring glycoside residues are also those that generate low molecular weight products from their action on starch (i.e. saccharifying  $\alpha$ -amylases). In this paper the product profiles of a liquefying  $\alpha$ -amylase, a cyclomaltodextrin glucanotransferase and both enzymes acting together on starch and maltodextrins are compared. The increase in glucose and maltose concentration, when both enzymes act together, is due to the combined action of the transfer and hydrolytic activity of CGTase and the liquefying  $\alpha$ -amylase, respectively.

**Keywords:**  $\alpha$ -Amylase; Transglycosylation; CGTase

### 1 Introduction

$\alpha$ -Amylases ( $\alpha$ -1,4-D-glucan glucanohydrolases, E.C. 3.2.1.1) are enzymes that catalyze the hydrolysis of internal  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) linkages of starch molecules acting through a "retaining mechanism" [1, 2]. Depending on the mechanism of starch degradation,  $\alpha$ -amylases are known as saccharifying or liquefying, the former producing twice the reducing sugar power than the latter for the same degree of hydrolysis [3]. As a consequence, saccharifying amylases, mainly of fungal origin, generate lower molecular weight products than liquefying  $\alpha$ -amylases, mainly of bacterial origin [2, 4].  $\alpha$ -Amylases consist of three domains. The catalytic and central domain or domain A, is an ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> barrel (TIM barrel) that contains one aspartic acid and one glutamic acid required for catalysis. Domain B is formed by a loop connecting the third strand and the third helix of the TIM barrel, this domain varying greatly in size and structure among different  $\alpha$ -amylases. Domain B forms a large part of the substrate binding cleft and is thought to be important for the differences in substrate specificity between  $\alpha$ -amylases. Domain C, found in the C-terminal end of the protein, has an antiparallel  $\beta$ -sandwich fold and is presumably involved in starch binding [5, 6].

While  $\alpha$ -amylases cleave  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) linkages in a way dependent on the number and the affinity of their subsites towards the substrate, producing oligosaccharides of

variable length, amylases such as  $\beta$ -amylases or glucoamylases act through an "exo" mechanism resulting in low molecular weight products, mainly maltose and glucose, respectively [2, 7]. On the other hand, cyclomaltodextrin glucanotransferase (E.C. 2.4.1.19, CGTase) is a natural transferase, although a member of the  $\alpha$ -amylase family. The specific reaction catalyzed by this enzyme is that of cyclization and the main products obtained from its action are  $\alpha'$ -,  $\beta'$ - and  $\gamma'$ -cyclodextrins containing 6, 7 and 8 glucose residues, respectively [6, 8, 9].

Although all  $\alpha$ -amylases act through an endo mechanism, the saccharifying enzymes produce lower molecular weight products. It has been demonstrated that they also catalyze  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) transglycosylation reactions in addition to hydrolysis [10]. The transglycosylation reaction can be understood as the transfer of a glycosyl group of a substrate donor to an acceptor; the reaction is similar to hydrolysis, except that water is no longer the acceptor [11].

The initial step in the industrial production of glucose, maltose or cyclodextrins is starch hydrolysis by the liquefying and thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* [12]. Afterwards, a second enzyme, and often a change of reaction conditions, pH and temperature are required, depending on the desired product. Recently, several reports have dealt with the mutation of hydrolytic enzyme structures in order to introduce transferase activity modifying the product profile [13–15].

In a recent article based on a phylogenetic analysis, some of us proposed that CGTases and  $\alpha$ -amylases diverged from a common ancestor and that CGTases evolved from

Correspondence: Agustín López-Munguía, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, CP 62271, México. Phone: +52-777-329-16-00, Fax: +52-777-317-23-88, e-mail: agustin@ibt.unam.mx.

$\alpha$ -amylases in order to carry out a more efficient degradation of starch and maltodextrins [16]. As a conclusion, it was proposed that the combination of hydrolysis and transfer activities in saccharifying  $\alpha$ -amylases is responsible for a more extensive degradation of starch, resulting in low molecular weight products. This was demonstrated by looking at the product profile of liquefying  $\alpha$ -amylase and CGTase as compared with the product of each enzyme alone. In the case of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niger*, which is known as maltogenic due to the large amount of maltose produced from starch or DE 8-15 liquefied starch, the product profile may be due to the transferase and hydrolytic activities of this enzyme [16].

In order to further explore the effect of both activities, hydrolysis and transferase acting together, the action pattern of an hydrolytic  $\alpha$ -amylase such as *B. licheniformis* and a transferase such as *Bacillus macerans* CGTase acting together on starch were investigated. The reaction products of the combined action of the liquefying  $\alpha$ -amylase and the transferase were analyzed and compared with the products obtained by each enzyme, acting on starch and maltodextrins.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Enzymes

$\alpha$ -Amylase from *B. licheniformis*, Termamyl 120L, was purchased from Novozymes A/S (D. F., México). CGTase from *B. macerans* was obtained from Amano (Elgin, IL, USA). Soluble starch, actually amylopectin produced by treating potato or corn starch with dilute hydrochloric acid, was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) (Sigma number S9765). Glucose and maltose were from Sigma-Aldrich, maltodextrins (Amidex, 20 DE) were supplied by Arancia Corn Products (Edomex, México). Both  $\alpha$ '- and  $\beta$ '-cyclodextrin were produced by AMAIZO (American Maize Products Company, Hammond, IN, USA).

### 2.2 Enzyme activity

The depolymerization of starch by *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylase was monitored following the formation of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid method with glucose as standard. This method was only used in the evaluation of the amount of enzyme activity in the commercial preparation in order to standardize it in the reactions. A unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to release 1  $\mu$ mol of glucose equivalents per minute. The reactions were carried out at 60°C in 10.5 mL of a pH 6, 30 mM phosphate buffer containing

12 mg/mL starch and 3 mM CaCl<sub>2</sub>. The activity of the commercial product was 13.175 U/mL. On the other hand, CGTase contained 6.804 U/mL as measured by the general assay using amylose and measuring the decrease in iodine-staining power [17]. One unit of enzyme is defined as the amount of the enzyme that produced a 1% reduction in A<sub>660</sub> per min.

### 2.3 Reactions with $\alpha$ -amylase and CGTase

Reactions with  $\alpha$ -amylase from *B. licheniformis*, CGTase from *B. macerans* and a combination of both were conducted. All the reactions with starch were carried out with a 12 mg/mL starch concentration in 30 mM phosphate buffer with 3 mM CaCl<sub>2</sub> in a total volume of 10 mL at 60°C and pH 6, containing 0.1  $\mu$ L of  $\alpha$ -amylase per milliliter and 0.6  $\mu$ L of CGTase per milliliter. The reaction was followed until no further increase in reducing sugars was observed (usually 30 min) and the final products were analyzed by HPLC. All the reactions with maltodextrins (20 DE) were carried out with 150 mg/mL concentration using the same conditions and the same enzyme concentrations as those used in the starch reactions. The products were also analyzed by HPLC when the reactions reached completion. All the experiments were carried out in triplicate.

### 2.4 HPLC analysis of oligosaccharides

Analysis of the reaction products was carried out by HPLC (Waters 600E) using a Waters chromatograph with a refraction index detector (Waters 410) with an automatic injector model (Waters 717 plus). Samples of 10  $\mu$ L of the reaction mixture were injected for each analysis. The chromatographic column used for the separation of products was an aminated 4.6  $\times$  250 mm Nova-Pack column. A 67% (v/v) aqueous solution of acetonitrile was used as the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL/min. Glucose, maltose, malto-oligosaccharides,  $\alpha$ '- and  $\beta$ '-cyclodextrins were used as standards and were injected at known concentrations to create a calibration curve. For yield determinations, the concentrations of G1 to G5 were calculated from the corresponding chromatogram areas and referred as oligosaccharides G1–G5.

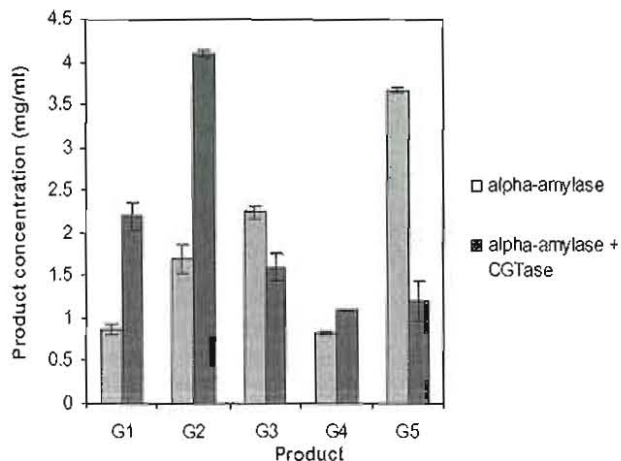
## 3 Results and Discussion

It is well known that  $\alpha$ -amylase from *B. licheniformis* is a liquefying enzyme releasing low molecular weight malto-oligosaccharides after extensive degradation of starch [18, 19]. After 30 min of reaction, maltopentaose (G5) was the most abundant product resulting from the action of  $\alpha$ -amylase on starch, followed by maltotriose (G3), maltose (G2),

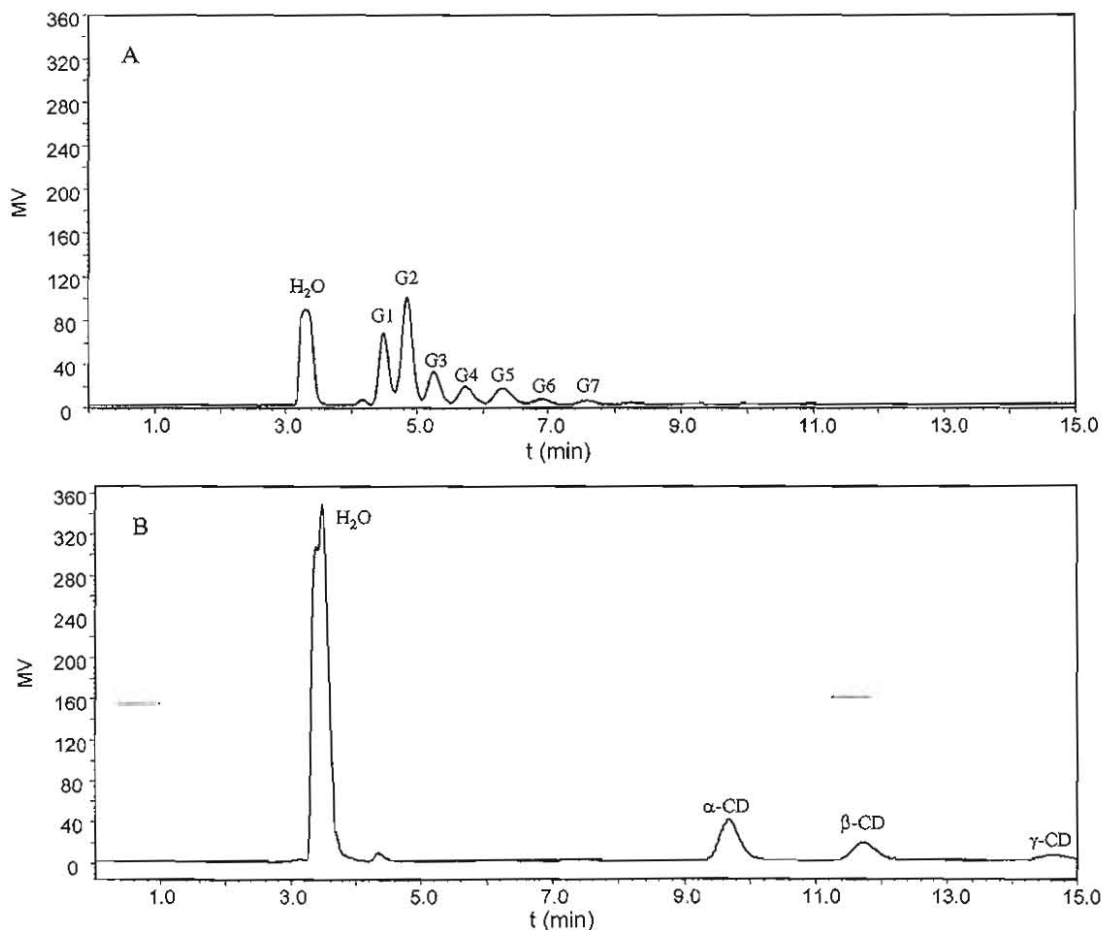
glucose (G1) and finally maltotetraose (G4) (see Fig. 1). Although it has been reported that higher transferase activity is observed at higher temperatures [20], the same product profile was observed at 90°C. In total, 9.3 mg/mL of oligosaccharides (G1–G5) were obtained from 12 mg/mL of starch as determined from HPLC quantification.

On the other hand, it is known that CGTase has three main activities: the cyclization reaction producing  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins, which is the most important; the hydrolysis reaction and finally, the disproportionation reaction, which is also a transglycosylation reaction in which the donor and the acceptor of glucosyl residues are linear oligosaccharides [6, 8, 9]. It is also known that in the presence of acceptors such as glucose, part of the activity results in the production of malto-oligosaccharides [21].

In Fig. 2, it may be observed that in the presence of starch (12 mg/mL), CGTase from *B. macerans* produces mainly CDs,  $\alpha$ -cyclodextrin being the preferential product



**Fig. 1.** Product profile obtained from the reactions with  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -amylase + CGTase on 12 mg/mL starch. No oligosaccharides (G1–G5) were observed when CGTase reacted alone with starch. For reaction conditions see Materials and Methods.

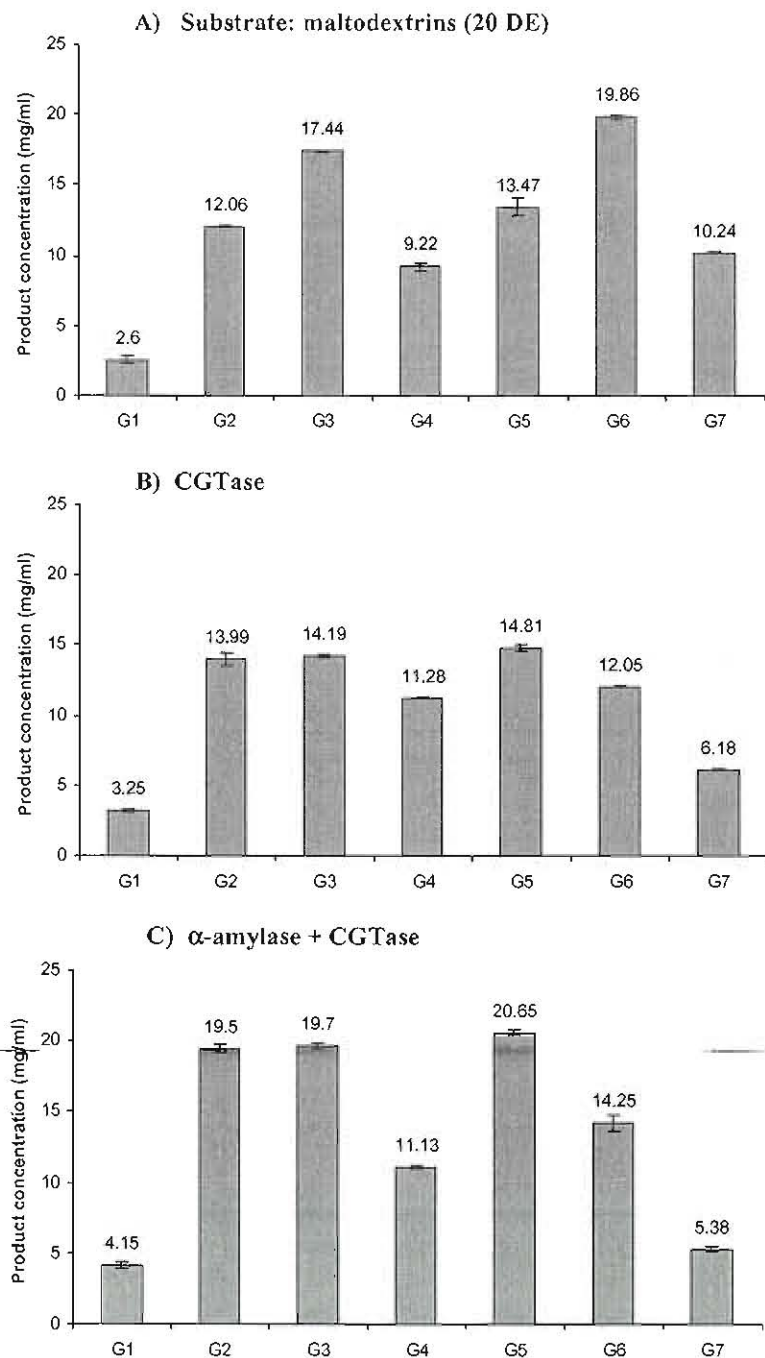


**Fig. 2.** Chromatogram obtained by HPLC from the reaction with (A)  $\alpha$ -amylase + CGTase and (B) CGTase alone, acting on 12 mg/mL starch. For reaction conditions see Materials and Methods.

(4.8 mg/mL), followed by  $\beta$ -cyclodextrin (2.8 mg/mL). A very small amount of  $\gamma$ -cyclodextrin was produced. No glucose or oligosaccharides were observed as already reported by Tonkova [9] and Terada et al. [17].

As already stated, the difference found in the product profile obtained with a saccharifying  $\alpha$ -amylase, as compared with a liquefying  $\alpha$ -amylase, has been explained as the result of the combined action of hydrolytic and

transferase activities, resulting in more efficient degradation of starch. Transferase activity may be quantified by the ability of the  $\alpha$ -amylase to transfer glucose from starch to acceptors other than water, such as alcohols. By site directed mutagenesis, Saab-Rincón et al. introduced transferase activity in a liquefying enzyme from *Bacillus stearothermophilus*, increasing its efficiency to transfer glucose moieties to methanol [14]. When acting on starch, this new enzyme produces lower molecular weight prod-



**Fig. 3.** Product concentration profile obtained from the action of  $\alpha$ -amylase and CGTase acting on 150 mg/mL of maltodextrins (20 DE) used as substrate. A) 20 DE maltodextrins used as substrate. B) Product profile after 30 min of reaction with CGTase. C) Product profile after 30 min of reaction with a mixture of  $\alpha$ -amylase and CGTase. For reaction conditions see Materials and Methods.

ucts than the wild type. Therefore, some advantages may be found by direct combination of both types of activities in the production of oligosaccharides. This is shown in Figs. 1 and 2, where the products of the combined action of the liquefying  $\alpha$ -amylase and CGTase when used together in the same reaction are shown. The temperature for this reaction was selected as 60°C, which is optimal for CGTase, although  $\alpha$ -amylase from *B. licheniformis* has higher optimal value, retaining 60% of its activity at 70°C and pH 6 [22].

When the products of both enzymes,  $\alpha$ -amylase and CGTase, are compared with those of  $\alpha$ -amylase alone, the total amount of oligosaccharides is increased to 10.2 mg/mL but, most important, the product distribution is modified, resulting in a higher specificity towards maltose and glucose and reducing the production of G5, the main product of the hydrolytic activity. It is important to point out that this distribution of products is obtained by neither of the enzymes acting alone nor by the sequential application of  $\alpha$ -amylase followed by CGTase. This last possibility was demonstrated by analyzing the product pattern of the reaction of CGTase on commercial maltodextrins (20 DE, 150 mg/mL) obtained by the action of a liquefying  $\alpha$ -amylase. This product has an oligosaccharide profile shown in Fig. 3A, with G3 and G5 as the main components. After 30 min with CGTase, the enzyme is capable of using G3, G6 and G7 because of its transferase activity, resulting in higher molecular weight products out of the G1–G7 range as observed in the HPLC chromatograms (data not shown). From the mass differences in the quantified products corresponding to Figs. 3A and 3B, more than 10 mg/mL were converted to products of higher molecular weight than G7. However, the increase in maltose concentration is poor compared to the yield of this product obtained by the action of both enzymes acting together, as shown in Fig. 3C. Therefore, when using starch as substrate, the products can only be described as the result of the combined action of transferase and hydrolytic activities.

#### 4 Conclusions

In this work, we demonstrated that the combination of the hydrolytic activity of a liquefying  $\alpha$ -amylase and the transferase activity of a CGTase results in a more efficient starch degradation, and thus in the generation of low molecular weight products as compared with the action of each activity separately.

In the starch industry, the first step in the substrate conversion is carried out by a liquefying and thermostable  $\alpha$ -amylase and, depending on the product of interest (e.g. glucose, fructose, maltose and maltotriose, cyclodex-

trins, etc.), it is often necessary to use one or more other enzymes with the subsequent change in reaction conditions.

The high concentration of starch used in industry favors the transferase activity of  $\alpha$ -amylases, particularly those bearing saccharifying properties. According to the results obtained in this work, the combination of the adequate activities present in amylases, either by combination of a liquefying  $\alpha$ -amylase and CGTase or by introduction of transferase activity in liquefying  $\alpha$ -amylases, may constitute an interesting alternative for the production of maltose or maltotriose (depending on the transferase and hydrolase specificities) in a single reaction from starch without the need for changing pH or temperature conditions.

#### Acknowledgement

The authors express their gratitude to T. L. Fernando González for technical support.

#### References

- [1] E. A. Mac Gregor:  $\alpha$ -Amylase structure and activity. *J. Protein Chem.* 1988, 7, 399–415.
- [2] M. Sinnott: Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* 1990, 90, 1171–1202.
- [3] W. M. Fogarty: Microbial amylases, in *Microbial Enzymes and Biotechnology* (Ed. W. M. Fogarty) Applied Science Publishers, New York, 1983.
- [4] R. I. Santamaría, G. Del Río, G. Saab, M. E. Rodríguez, X. Soberón, A. López-Munguía: Alcoholysis reactions from starch with  $\alpha$ -amylases. *FEBS Lett.* 1999, 452, 346–350.
- [5] J. Nielsen, V. Torben, T. Borchert: Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1543, 253–274.
- [6] B. Van der Veen, J. Uitdehaag, B. Dijkstra, L. Dijkhuizen: Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1543, 336–360.
- [7] A. Pandey, P. Nigam, C. Socol, V. Socol, D. Singh, R. Mohan: Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2000, 31, 135–152.
- [8] A. MacGregor, S. Janecek, B. Svensson: Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1546, 1–20.
- [9] A. Tonkova: Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb. Technol.* 1996, 22, 678–686.
- [10] E. Hehre, D. Genghof, G. Okada: The alpha-amylases as glycosylases, with wider catalytic capacities than envisioned or explained by their representation as hydrolases. *Arch. Biochem. Biophys.* 1971, 142, 382–393.
- [11] D. Wong: *Food Enzymes, Structure and Mechanisms*, Chapman and Hall, New York, 1995.
- [12] M. J. van der Maarel, B. van der Veen, J. C. Uitdehaag, H. Leemhuis, L. Dijkhuizen: Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J. Biotechnol.* 2002, 94, 137–155.

- [13] T. Kuriki, H. Kaneko, M. Yanase, H. Takata, H. Umeyama, S. Okada: Controlling substrate preference and transglycosylation activity of neopullulanase by manipulating steric constraint and hydrophobicity in active center. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 17321–17329.
- [14] G. Saab-Rincón, G. del-Río, R. I. Santamaría, A. López-Mungula, X. Soberón: Introducing transglycosylation activity in a liquefying  $\alpha$ -amylase. *FEBS Lett.* 1999, 453, 100–106.
- [15] L. Beier, A. Svendsen, C. Andersen, T. Frandsen, T. Borchert, J. Cherry: Conversion of the maltogenic  $\alpha$ -amylase Novamyl into a CGTase. *Protein Eng.* 2000, 13, 509–513.
- [16] G. Del-Río, E. Morett, X. Soberón: Did cyclodextrin glycosyltransferases evolve from  $\alpha$ -amylases? *FEBS Lett.* 1997, 416, 221–224.
- [17] Y. Terada, H. Sanbe, T. Takaha, S. Kitahata, K. Koizumi, S. Okada: Comparative study of the cyclization reactions of three bacterial cyclomaltodextrin glucanotransferases. *App. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 1453–1460.
- [18] N. Saito: A thermophilic extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1973, 155, 290–298.
- [19] S. Blakeney, B. Stone: Activity and action pattern of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase in aqueous ethanol. *FEBS Lett.* 1985, 186, 229–232.
- [20] L. M. Marchal, A. M. van der Laar, E. Goetheer, E. B. Schimmelpennink, J. Bergsma, H. H. Beftink, J. Tramper: Effect of temperature on the saccharide composition obtained after  $\alpha$ -amylolysis of starch. *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 63, 344–355.
- [21] T. Martin, M. Alcalde, F. Plou, L. Dijkhuizen, A. Ballesteros: Synthesis of malto-oligosaccharides via the acceptor reaction catalyzed by cyclodextrin glycosyltransferases. *Biotransform.* 2001, 19, 21–35.
- [22] L. M. Marchal, J. Jonkers, G. T. Franke, C. D. de Gooijer, J. Tramper: The effect of process conditions on the  $\alpha$ -amylolytic hydrolysis of amylopectin potato starch: An experimental design approach. *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 62, 348–357.

(Received: January 6, 2003)

(Revised: March 10/July 5, 2003)

(Accepted: September 30, 2003)



## Enhancement of the Alcoholic Activity of $\alpha$ -Amylase AmyA from *Thermotoga maritima* MSB8 (DSM 3109) by Site-Directed Mutagenesis<sup>∇</sup>

Juanita Yazmin Damián-Almazo, Alina Moreno, Agustín López-Munguía, Xavier Soberón, Fernando González-Muñoz, and Gloria Saab-Rincón\*

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, México

Received 15 January 2008/Accepted 7 June 2008

**AmyA, an  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, is able to hydrolyze internal  $\alpha$ -1,4-glycosidic bonds in various  $\alpha$ -glucans at 85°C as the optimal temperature. Like other glycoside hydrolases, AmyA also catalyzes transglycosylation reactions, particularly when oligosaccharides are used as substrates. It was found that when methanol or butanol was used as the nucleophile instead of water, AmyA was able to catalyze alcoholysis reactions. This capability has been evaluated in the past for some  $\alpha$ -amylases, with the finding that only the saccharifying fungal amylases from *Aspergillus niger* and from *Aspergillus oryzae* present measurable alcoholysis activity (R. I. Santamaria, G. Del Rio, G. Saab, M. E. Rodriguez, X. Soberon, and A. Lopez, FEBS Lett. 452:346–350, 1999). In the present work, we found that AmyA generates larger quantities of alkyl glycosides than any amylase reported so far. In order to increase the alcoholic activity observed in AmyA, several residues were identified and mutated based on previous analogous positions in amylases, defining the polarity and geometry of the active site. Replacement of residue His222 by glutamine generated an increase in the alkyl glucoside yield as a consequence of a higher alcoholysis/hydrolysis ratio. The same change in specificity was observed for the mutants H222E and H222D, but instability of these mutants toward alcohols decreased the yield of alkyl glucoside.**

$\alpha$ -Amylases (EC 3.2.1.1) are retaining glycosidases that catalyze the hydrolysis of internal  $\alpha$ -1,4-glycosidic bonds in starch through a double-displacement mechanism in which a covalent intermediate glycosyl enzyme is deglycosylated by water (43, 62).  $\alpha$ -Amylases contain 5 to 11 subsites that bind glucose moieties (8, 51), with their numbers and relative affinities defining their product profiles (38). Like all retaining glycosidases,  $\alpha$ -amylases can also catalyze transfer reactions, which are the result of employing molecules other than water as glucosyl acceptors, such as carbohydrates (transglycosylation reactions) or alcohols (alcoholysis reactions). When a high-molecular-weight alcohol is used as an acceptor, the product is an alkyl glycoside with surface tension activity properties that are important in several industrial applications. Therefore, the extremely laborious and inefficient chemical synthesis of alkyl glycosides presents an opportunity to develop enzymatic methods devoted to increasing the yields and specificities of these reactions.

The feasibility of alcoholysis reactions using various exoglycosidases has been extensively investigated (references 57 and 65 and references therein), and although efficient processes have been developed using activated substrates, such as *p*-nitrophenyl-glucoside or *p*-nitrophenyl-galactoside, with  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidases and galactosidases, the use of a readily available substrate, such as starch or amyloextrins, could prove attractive if efficient reactions employing  $\alpha$ -amylases are developed.

For a given degree of starch depolymerization, endoamylases (such as  $\alpha$ -amylase) generate lower-molecular-weight products than exoamylases (such as  $\beta$ -amylase or glucoamylase); while the former hydrolyze the polymer chain at random, the latter perform the hydrolysis from the nonreducing end of the molecule. However, in the case of maltogenic or saccharifying  $\alpha$ -amylases, which are in principle endoenzymes, lower-molecular-weight products are obtained, presumably as a result of differences in subsite binding site affinities (3, 32) and the combination of hydrolytic and transfer mechanisms during the degradation process (42). Consequently, saccharifying  $\alpha$ -amylases, such as *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*  $\alpha$ -amylases, can transfer glucoside residues to alcohols (39), a limited property in liquefying  $\alpha$ -amylases (55).

The direct use of fungal  $\alpha$ -amylases for the production of alkyl glycosides from starch is precluded by the high temperature required for starch solubilization and the required stability of the protein toward alcohols. Currently, the industrial processing of starch requires initial hydrolysis by a liquefying (bacillar) thermostable  $\alpha$ -amylase during the phase known as liquefaction, which is followed by a saccharifying step after pH and temperature adjustment due to the thermal stability of the saccharifying glucoamylase (63). In this context, the use of a thermophilic saccharifying  $\alpha$ -amylase would be attractive, not only in the development of alcoholysis reactions, but also in the starch-processing industry, considering that thermophilic proteins are by their nature more stable at higher temperatures than their mesophilic equivalents and that thermostability has often been related to other important properties for a biocatalyst, such as resistance to substrate or product inhibition, as well as substrate and product solubility (66).

In 1997, Liebl et al. described an  $\alpha$ -amylase (AmyA) found

\* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62271, México. Phone: (52) (777) 329-1640. Fax: (52) (777) 317-2388. E-mail: gsaab@ibt.unam.mx.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 13 June 2008.

in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8 (DSM 3109) as a saccharifying amylase with an optimal temperature at 85°C that was able to hydrolyze internal  $\alpha$ -1,4-glycosidic bonds in various  $\alpha$ -glucans, such as starch, amylose, amylopectin, and glycogen, yielding mainly glucose and maltose as final products (37). As AmyA offers the advantage of a saccharifying profile in a very stable scaffold, we decided to explore its properties as a transferase, particularly in alcoholysis reactions, compared to other  $\alpha$ -amylases and to improve this property by site-directed mutagenesis.

From the structural point of view, the direct comparison through multiple-sequence alignments of liquefying and saccharifying enzymes, as well as maltogenic amylases, neopullulanases, and CGTases, that have important transglycosylation activities has allowed the identification of residues potentially involved in transglycosylation activity (20, 30, 54). In spite of the fact that the  $\alpha$ -amylase AmyA from *T. maritima* is already a saccharifying enzyme, after a sequence and structure comparison, we were able to identify various residues that are important in saccharifying amylases and are not conserved in the *T. maritima*  $\alpha$ -amylase, suggesting that their mutation may generate an even more saccharifying enzyme; actually, as alcoholysis can be considered a specific type of transfer reaction, this would probably result in a more alcoholytic enzyme.

Several reports in the literature indicate that transglycosylation activity can be introduced or modified by promoting the effective concentration of less polar substrates in the active site, either by decreasing the affinity for water (7, 20, 34) or by modifying the geometry of the active site to disable the activation of the catalytic water molecule (39) and thereby favoring the activation of other, bulkier acceptor groups. The importance of aromatic residues in substrate binding at the active site of glycosidases through stacking interactions is well documented (7), and it has been proven that the introduction or substitution of these kinds of residues can modify the affinity of the protein at the different substrate subsites, affecting both the product profile and the activity of the enzyme (40, 45, 50, 54).

With this background, we focused our mutagenic strategy especially on those aromatic residues that, according to our model, might be involved in stacking interactions with the substrate, like Trp177, Tyr178, and Phe179 in domain B and His222 and Val259 in domain A of *T. maritima*  $\alpha$ -amylase. Our expectations were that the modification of these residues to linear side chains might favor the entrance of other substrates to compete with water.

In the present work, we report some properties of AmyA and analyze the properties of several mutant proteins intended to improve the capacity of AmyA to carry out transglycosylation and alcoholysis reactions, in particular, its alcoholytic activity using starch as a substrate. The mutation positions were defined based on multiple-sequence alignments and a structural model constructed for AmyA.

## MATERIALS AND METHODS

**Homology modeling of AmyA.** There is no structural information on AmyA. However, it contains the four most highly conserved signatures present in members of family 13 of glycoside hydrolases (16, 26, 44, 52, 61) and 31% sequence identity to its closest homologous with known structure. In order to identify residues near the active site, a homology model for  $\alpha$ -amylase AmyA was generated with the Swiss Model server (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS>

-MODEL.html) (19) using the coordinates of the  $\alpha$ -amylase from *A. oryzae* (Protein Data Bank [PDB] entry 7TAA) (7) complexed with a modified acarbose inhibitor as a template. The side chain conformations in the model (root mean square score) were evaluated using the WHAT CHECK program (21). The model was minimized, and the substrate was introduced by homology to the TAA structure using InsightII molecular-modeling software (Accelrys Software, Inc.). Alternatively, using the program Deep View/Swiss PDB viewer version 3.7 (<http://expasy.org/spdbv/>) (19), the modified acarbose inhibitor crystallized in the 7TAA structure was superimposed on the generated model, guided by the four conserved regions characteristic of the amylase family (46).

**Gene cloning and site-directed mutagenesis.** The *amyA* gene from *T. maritima* (GenBank accession number CAA72194) was cloned into pET28a+ from a *T. maritima* library kindly provided by Enrique Morett, using the oligonucleotides 5'-CGAAGGCATATGAAGGTTGTGAAG-3' and 5'-CGATCCAAGCTTCACTTTTGGAAAATGTACGC-3' through the NdeI and HindIII restriction sites. The megaprimer method (56) was used to construct a DNA fragment carrying mutations at positions Trp177, Tyr178, and Phe179 to valine; His222 to aspartic acid, glutamic acid, and glutamine; and Val259 to tryptophan using the oligonucleotides 5'-CCGAAATACACGACTTTTGGACC-3', 5'-CCGAAAACCCAGACTTTTGGACCC-3', 5'-AGCCAAAAAGTCCGACATACCAGAC-3', 5'-GACCAGCATATATSTSTTTGACGC-3' (where S = G or C), and 5'-CCGCTGAACCACTCTCCAC-3', respectively, by PCR, in combination with the oligonucleotide 5'-CGAAGGCATATGAAGGTTGTGAAG-3', which anneals at the 5' terminus of the gene. The megaprimers obtained were purified and further extended in a second round of PCR with the oligonucleotide 5'-CCGC AAGCTTTTGGAAAATGTACGCTTTC-3', which anneals at the 3' end to complete the genes. The resulting mutated genes were cloned through NdeI and HindIII restriction sites in the pET28a+ expression vector from Novagen, which adds a sequence that encodes a six-His tag at the 3' termini of the genes. The ligated vectors were used to transform electrocompetent ER2566 *E. coli* cells (New England Biolabs) by electroporation and plated on Luria-Bertani medium supplemented with 25  $\mu$ g/ml kanamycin. Plasmid DNA was purified from six independent colonies using the High Pure plasmid isolation kit (Roche) and sequenced completely to ensure that mutations other than the ones designed did not occur. In order to carry out a fine characterization of particular mutants, the genes were subcloned, eliminating the signal peptide-coding region. To do this, the already mutated genes were amplified with the oligonucleotides 5'-TTGCTGAGCCGAAGGCATATGTGCTTTCAAACGCTTATGAGTCAATCC-3' and 5'-CGATCCAAGCTTCACTTTTGGAAAATGTACGC-3' and subcloned through NdeI and HindIII restriction sites in vector pET28a+ as described above. Production of proteins with these vectors had a much higher yield, and contamination of unprocessed peptide was avoided.

**Enzyme purification.** Transformants of wild-type AmyA and mutants were cultured in 3 liters of Luria-Bertani medium supplemented with kanamycin and induced with 0.25 mM dioxane-free IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) at an optical density at 600 nm of 0.4 and grown further at 21°C for 12 h. The cells were spun down at 5,000  $\times$  g for 30 min at 4°C. The pellet was resuspended in 7 ml of 300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer, pH 7.7, and lysed by sonication on an ice bath (Branson Sonifier 450). The cell extracts were heated at 82°C for 20 min, centrifuged for 30 min at 5,000  $\times$  g at 4°C, filtered through a 0.2- $\mu$ m membrane, and purified using a 5-ml affinity column (HiTrap Chelating HP; Amersham Biosciences) using Ni<sup>2+</sup> as a ligand in an Äkta-Pharmacia fast protein liquid chromatography system. The column was washed with 20 volumes of 20 mM imidazole, and the protein was eluted with a 25-volume linear gradient from 20 to 300 mM imidazole in 300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer, pH 7.7, at a flow rate of 5 ml/min. Fractions with high amylase activity were pooled, concentrated, and dialyzed against 20 mM Tris buffer, pH 8, and purified on a MonoQ 4.6/100PE (Amersham Biosciences) anion-exchange column employing a linear gradient of 0 to 1,000 mM NaCl in a 20 mM Tris buffer, pH 8. Fractions with high amylase activity were dialyzed against 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> buffer, pH 7. Protein purity was assured by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and the concentration was quantified by the Bradford method (Bio-Rad) using bovine serum albumin as a standard. The proteins expressed without signal peptide were purified from 500-ml cultures treated as described above, except that as a second purification step, size exclusion chromatography instead of anion exchange was used. For this step, a Superose HR12 column (Amersham Bioscience) was used in a fast protein liquid chromatography system, using 50 mM Tris, 150 mM NaCl, and 2 mM CaCl<sub>2</sub> buffer at pH 7 as an eluent.

**Activity determination.** The enzyme activities of wild-type AmyA and the mutants were estimated by measuring the initial velocities of formation of reducing sugars released upon starch hydrolysis by the 3,5-dinitrosalicylic acid method as reported previously (50). The reaction was carried out in 1 ml of

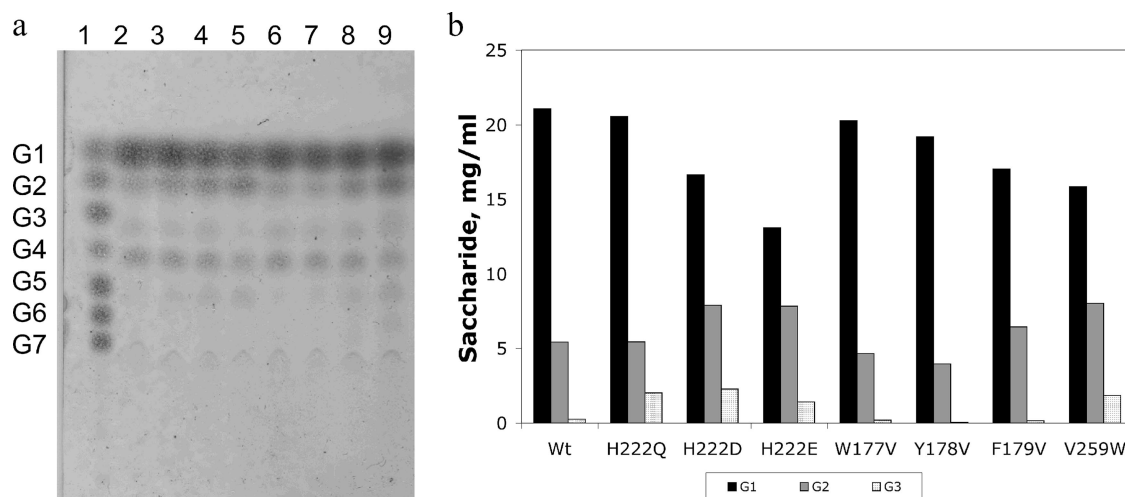


FIG. 1. (a) TLC product profile of the hydrolysis reaction of a 30-mg/ml starch solution with 10 U/ml of the wild-type and mutant  $\alpha$ -amylases from *T. maritima* after 24 h of reaction at 85°C. G1, glucose; G2, maltose; G3, maltotriose; G4, maltotetraose; G5, maltopentaose; G6, maltohexaose; G7, maltoheptaose. Lane 1, malto-oligosaccharides; lane 2, wild type; mutants, lanes 3, H222Q; 4, H222E; 5, H222D; 6, W177V; 7, Y178V; 8, F179V; and 9, V259W. (b) Quantification of G1, G2, and G3 for the different variants.

10-mg/ml soluble starch (Sigma-Aldrich) dissolved in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  buffer, pH 7, at 85°C, employing approximately 4 U/ml of activity in each enzyme assay. Only in the case of the wild-type and mutants at position His222, the concentration of substrate (soluble starch from Sigma-Aldrich) was varied from 0.1 to 10 mg/ml to obtain Michaelis-Menten parameters. A unit of enzyme activity is defined as the amount of glucose equivalents ( $\mu\text{mol}$ ) released per min and is reported in terms of mg of AmyA.

**Product profile.** Starch hydrolysis reactions carried out with 10 U/ml of wild-type AmyA were conducted at 85°C in a Thermomixer Compact (Eppendorf) in 1 ml of 50 mM Tris-Bis-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  buffer, pH 7, with 3% soluble starch as a substrate. Samples were taken after 30 min to determine the reaction progress and after 24 h to obtain the product concentration at equilibrium. Samples were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) and quantified by high-pressure liquid chromatography (HPLC). For TLC analysis, 10-cm by 10-cm by 200- $\mu\text{m}$  Whatman Silica Gel 60 plates were used, with a mixture of ethanol, butanol, and water as a solvent (50:30:20), and visualized as previously reported (54). Reverse-phase HPLC was carried out in a Waters-Millipore 510 HPLC system with a refractive-index detector (Waters model 410) equipped with an automatic sampler (model 717 Plus) and a  $\text{C}_{18}$  column (4.6 by 250 mm) using water as the mobile phase at a flow rate of 0.7 ml/min.

**Alcoholysis reactions.** 20 U/ml of each enzyme was incubated at 85°C in a Thermomixer Compact (Eppendorf) with a suspension of 6% starch and either 20% methanol in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  buffer, pH 7, or a solution of the same buffer containing 8% butanol saturated with the same buffer. The reaction products were analyzed after 48 h of reaction. Methyl and butyl glycosides were visualized by TLC as previously described (54). In order to quantify the total amount of alkyl glycosides after the reaction, all products were hydrolyzed for 3 h at 40°C with *A. niger* glucoamylase (43 U/ml) (Sigma-Aldrich) to transform all the alkyl glycosides into alkyl glucoside and glucose. Samples of the reaction mixture were diluted 1:2 and analyzed in an HPLC system equipped with a Nova-Pak aminated column (4.6 mm by 250 mm) using acetonitrile and water as the mobile phase (67:33) at a flow rate of 0.8 ml/min. The peak areas were measured and compared against those of a standard curve containing known amounts of oligosaccharides from glucose (G1) to maltoheptaose (G7) and the corresponding alkyl glucoside (Sigma-Aldrich). Alcoholysis and hydrolysis events were calculated taking into account the amounts of equivalents of alkyl glucoside quantified by HPLC and the number of equivalents of glucose released in the reaction.

**Determination of alcoholysis yields.** When a hydrolysis reaction takes place, for each molecule of a reducing substrate broken, one additional reducing end is formed, increasing its contribution to the solution reducing power, while when an alcoholysis reaction occurs, there is no real gain in reducing power. Therefore, a measure of the increasing equivalent dextrose concentration measured by the 3,5-dinitrosalicylic acid method (59) reflects the number of hydrolysis events occurred during the reaction, while the number of alcoholysis events can be

independently determined by quantification of the increase in the alkyl glucoside concentration in the same period of time. From these data, it is possible to determine the numbers of hydrolysis and alcoholysis events in the reaction, as well as an alcoholysis/hydrolysis ratio and an alcoholysis efficiency: It is important to point out that this is an approximate calculation, as it assumes that the reducing power is independent of the oligosaccharide chain length. Nevertheless, it is useful as a comparative tool for modified amylases.

**Transglycosylation reactions.** Aliquots with 4 U/ml of native and mutant enzymes were incubated at 85°C in a Thermomixer Compact (Eppendorf) with 2% maltotriose and maltotetraose (Sigma-Aldrich), each diluted in 50 mM Tris-Bis-HCl buffer, pH 7, containing 150 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ . Aliquots were taken at 0 and 10 min and 1 and 12 h, and the reaction was stopped by transfer of the sample to ice; the products were visualized by TLC as previously reported (54), employing a mixture of oligosaccharides containing G1 to G7 as standards.

**Thermostability.** Aliquots of the wild-type and mutant enzymes were incubated at 85°C in sealed Eppendorf tubes in a Thermomixer Compact (Eppendorf). Residual enzyme activity was measured at 85°C with 10 mg/ml of starch after different incubation times, starting from an activity of 3 U/ml. The value of stability is reported as a percentage of residual activity, taking the activity prior to incubation as 100% activity.

## RESULTS

**Product profile formation with wild-type AmyA.** The starch hydrolysis product profile is shown in Fig. 1a, where it may be observed that glucose (G1) and maltose (G2) are the main products, as already demonstrated (37). In contrast to other bacillar  $\alpha$ -amylases, such as those of *Bacillus stearothermophilus* or *Bacillus licheniformis*, which produce maltopentaose (G5) and maltohexaose (G6) as the main products after extensive starch hydrolysis, the product profile obtained with AmyA is similar to the profile observed with *A. niger*  $\alpha$ -amylase (15, 55).

**Alcoholysis reactions with wild-type AmyA.** The higher degree of starch depolymerization observed with AmyA in comparison to other bacterial  $\alpha$ -amylases can be explained in terms of a combination of hydrolase and transferase reactions, as already demonstrated by del Río et al., (14). Therefore, we decided to explore if AmyA was also capable of catalyzing alcoholysis reactions. Figure 2a shows the alcoholysis profile of

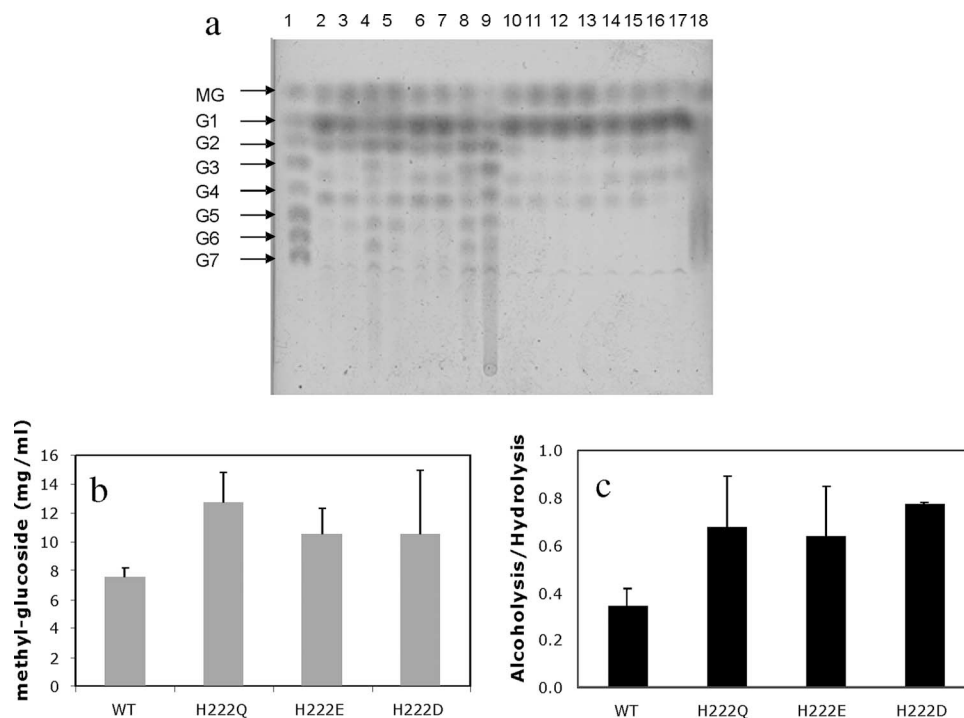


FIG. 2. (a) Alcoholysis reaction products obtained from 6% starch-20% methanol reaction medium with 20 U/ml of the respective enzymes after 48 h of incubation at 85°C. Lane 1, standards: MG, methyl glucoside; G1, glucose. Lanes 2 to 9, methanolysis reaction with the wild type and H222Q, H222D, H222E, W177V, Y178V, F179V, and V259W mutants, respectively; lanes 10 to 17, subsequent treatment of methanolysis reaction mixtures with *A. niger* glucoamylases of the wild type and H222Q, H222D, H222E, W177V, Y178V, F179V, and V259W mutants, respectively. (b) Yields of methyl glucoside after 48 h of incubation at 85°C and their subsequent treatment with *A. niger* glucoamylase of the wild type and variants at position 222. (c) Alcoholysis/hydrolysis ratios for the wild type and variants at position 222. The error bars indicate standard deviations.

wild-type AmyA. Besides the spots that comigrate with maltodextrins, corresponding to hydrolysis products, we can observe spots that do not correspond to maltodextrins, among which methyl glucoside can be identified from a standard. In order to quantify the alcoholysis yield, given the wide diversity of methyl glucoside products, we treated the resulting reaction products with glucoamylase, an exoglycosidase that excises  $\alpha$ -1,4-saccharides at the nonreducing end. The quantification of the resulting methyl glucoside was carried out by HPLC. After 48 h of incubation, the concentration of methyl glucoside generated by AmyA was 8 mg/ml.

**Structural model of AmyA.** The structural model generated on the basis of homology with *A. oryzae*  $\alpha$ -amylase (see Materials and Methods) shows that the catalytic ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barrel domain, or A domain, is the more conserved domain. Domain B varies in size and structure from one amylase to another (25, 26, 47). Although some sequence similarities allow the classification of glycoside hydrolases into subgroups that presumably share the same supersecondary structure in domain B (23), AmyA shows a very low sequence identity to most amylases in this region. In effect, when a PSI-BLASTP (4, 5) search of its sequence was run against all nonredundant GenBank coding sequence databases, only a few high-score hits were obtained in the B domain sequence. This was the case for  $\alpha$ -amylases from *Thermosipho melanesiensis* BI429 and from *Fervidobacterium nodosum*, while a lower score (under 60%) was obtained for oligo-1,6-glucosidases from some *Lactobacillus* species. As there is no crystal structure for any of these proteins, the

domain B generated model is inaccurate and has to be taken with caution. As far as the C domain is concerned, it has a more conserved Greek key motif; however, it is less relevant for the reaction itself, since it is far from the active site (Fig. 3A). The modified acarbose inhibitor can be observed inside a crevice between domains A and B. Selection of residues to mutagenize was focused on residues located 4 Å around the modified acarbose (Fig. 3B). Based on the reports in the literature (30, 36, 64), special attention was devoted to aromatic residues and residues that could form hydrogen bonds near the acceptor binding sites (subsites +1, +2, and +3).

Among the potential residues to mutagenize, we identified residue His222, which points toward the sugar moiety at subsite +1 (Fig. 3B). In fact, in  $\alpha$ -amylase from *A. oryzae*, the equivalent His222 hydrogen bonds the substrate sugar situated at subsite +1 (9). This residue has also been implicated in Ca<sup>2+</sup> ion coordination and is conserved in  $\alpha$ -amylases (Fig. 4). Therefore, we decided to investigate its role in AmyA transglycosylation and alcoholysis activities by replacing it with polar linear residues, like aspartic acid, glutamic acid, and glutamine. Based on the model (Fig. 3B) and on the multiple-sequence alignment shown in Fig. 4, we also decided to mutagenize Val259 to tryptophan. This position, located in proximity to subsite +2, shows a consensus tryptophan residue among CGTases that are natural transferases. Therefore, we decided to investigate the effect of the mutation V259W in AmyA on transglycosylation and alcoholysis reactions. Finally, we identified one aromatic residue in domain B, Phe179, which

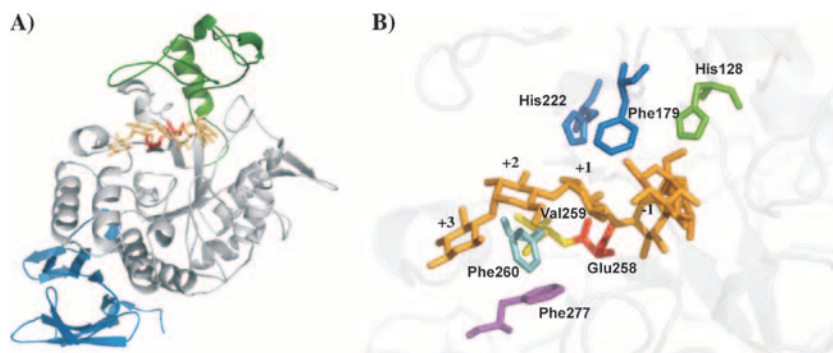


FIG. 3. (A) Homology model obtained for AmyA in which the three characteristic amylase domains are depicted in different colors. The catalytic domain A is shown in gray; domain B and domain C are shown in green and blue, respectively. (B) The acarbose inhibitor (orange) is located between domains A and B and is surrounded by various residues located within 4 Å, among them the catalytic residue Glu258 (red). Possible residues involved in substrate binding are indicated in stick format; some of the amino acids subjected to site-directed mutagenesis were His222 and Phe179, shown in blue, and Val259, shown in yellow.

points toward subsite -1. This residue is part of a cluster of contiguous aromatic residues. We figured out that even with the lack of accuracy of our model, any of these residues could have a role in placing and orienting the entrant acceptor for the second step of the reaction, so we decided to study the

effects of the mutations W177V, Y178V, and F179V on the transglycosidic and alcoholic activities of the enzyme.

**Enzyme activity.** All the specific activities for starch, measured for the wild-type enzyme and the mutants (except for V259W), were in the same order of magnitude, around 1,000

Enzyme	Region I	Region II	Region III	Region IV
		*	*	*
<i>T. maritima</i>	KVIMDLVINHT 129	DGFRIDAAKHI 223	VGEVFSGN 263	FNEFALM 280 FLENHDL 311
<i>A. oryzae</i>	YLMVDVYVANHM 123	DGLRIDTVKHKV 211	IGEVLDGD 235	LNYPYI 255 FVENHDM 298
<i>A. niger</i>	YLMVDVYVDHM 123	DGLRIDSVLEV 211	VGEIDNGN 235	LNYPYI 255 FIENHDM 298
<i>H. sapiens sal</i>	RIYVDVINHM 102	AGFRIDASKHM 202	YQEVLDLG 238	TEFKYG 259 FVDNHDN 301
<i>H. sapiens pan</i>	RIYVDVINHM 102	AGFRIDASKHM 202	YQEVLDLG 238	TEFKYG 259 FVDNHDN 301
Pig Panc	RIYVDVINHM 102	AGFRIDASKHM 202	YQEVLDLG 238	TEFKYG 259 FVDNHDN 301
<i>Tenebrio</i>	RIYVDVINHM 100	AGFRVDAAKHM 190	YQEVLDLG 227	LEFQFG 248 FVDNHDN 288 <b>α-Amylases</b>
<i>Alteromonas</i>	DIYVDLINHM 90	KGFRFDASKHV 179	FQEVLDQG 205	TEFKYS 226 FVDNHDN 265
<u>Barley</u>	<u>KALADIVINHR 93</u>	<u>DGWRPDPFKGY 184</u>	<u>VAEIVTSL 209</u>	<u>PDFFTK 249 FVDNHDN 286</u>
<i>B. lichen</i>	NVYGDVYVNHK 106	DGFRLDVAKHI 236	VAEYQND 266	FDVPLH 289 FVDNHDN 329
<i>B. amylo</i>	QVYGDVYVNHK 104	DGFRIDAAKHI 236	VAEYQND 266	FDVPLH 289 FVDNHDN 329
<i>B. stearo</i>	QVYADVYVDHK 107	DGFRLDVAKHI 239	VGEYWSYD 269	FDAPLH 292 FVDNHDN 332
<i>B. sub</i>	KVIYDAVINHT 103	DGFRPDAAKHI 180	YGEILQDS 213	TASNYG 232 WYESHDT 270
<i>B. circ1</i>	KVIIDFAPNHT 141	DGIRMDAVKHM 234	FGWEFLGV 262	LDFRFA 286 FIDNHDN 329
<i>B. circ2</i>	KVIIDFAPNHT 141	DGIRVDAVKHM 234	FGWEFLGS 262	LDFRFA 286 FIDNHDN 329
<i>B. specie</i>	KVIIDFAPNHT 141	DGIRVDAVKHM 234	FGWEFLGV 262	LDFRFA 286 FIDNHDN 329 <b>CGTases</b>
<i>B. stearo</i>	KVIIDFAPNHT 137	DGIRMDAVKHM 230	FGWEFLSE 257	LDFRFG 281 FIDNHDN 325
<u>Termo sulfu</u>	<u>KVIIDFAPNHT 142</u>	<u>DGIRLDVAKHM 235</u>	<u>FGWEFLGT 263</u>	<u>LDFRFS 283 FIDNHDN 330</u>
<i>Thermus sp</i>	RVMLDAVFNHC 248	DGWRLDVANEI 233	LGEIWHDA 362	MNYPLA 380 LLGSHDT 422
<i>B. lichen</i>	KIMLDVFNHI 252	DGWRLDVANEV 334	LGEIWHQA 363	MNYPPT 381 LLDSDHT 426 <b>Maltogenic.</b>
<i>B. stearo</i>	RVMLDAVFNHS 248	DGWRLDVANEV 333	LGEIWHDA 361	MNYPPT 380 LLGSHDT 425

FIG. 4. Multiple structural alignment around the four characteristic regions observed in members of glycoside hydrolase family 13. The catalytic residues conserved in all the sequences are marked with asterisks. Aromatic residues involved in transglycosylation activity and the residues that structurally interact with them are highlighted in gray. Two of the residues mutagenized are shown in boldface and underlined. From the top: *T. maritima*, *T. maritima* α-amylase (GenBank accession number CAA72194) (37); *A. oryzae*, *A. oryzae* α-amylase (PDB accession number 2TAA) (41); *A. niger*, *A. niger* α-amylase (PDB accession number 2AAA) (6); *H. sapiens sal*, *Homo sapiens* salivary α-amylase (PDB accession number 1JXK) (49); *H. sapiens pan*, *H. sapiens* pancreatic α-amylase (PDB accession number 1HNY) (53); Pig panc, *Sus scrofa* pancreatic α-amylase (PDB accession number 1HX0) (48); *Tenebrio*, *Tenebrio molitor* α-amylase (PDB accession number 1JAE) (58); *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas haloplanktis* α-amylase (PDB accession number 1G94) (1, 2); Barley, *Hordeum vulgare* α-amylase (PDB accession number 1AMY) (27); *B. lichen*, *B. licheniformis* α-amylase (PDB accession number 1VJS) (22); *B. amylo*, *Bacillus amyloliquefaciens* chimera α-amylase (PDB accession number 1E43) (8); *B. stearo*, *B. stearothersophilus* α-amylase (PDB accession number 1HVX) (60); *B. sub*, *Bacillus subtilis* 2633 α-amylase (PDB accession number 1BAG) (17); *B. circ1*, *Bacillus circulans* 251 cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) (PDB accession number 1CDG) (35); *B. circ2*, *B. circulans* 8 CGTase (PDB accession number 1CGT) (31); *B. specie*, *Bacillus* sp. strain 1011 CGTase (PDB accession number 1D7F) (23); *B. stearo*, *B. stearothersophilus* CGTase (PDB accession number 1CYG); *Termo sulfu*, *Thermoanaerobacter thermosulfurogenes* CGTase (PDB accession number 1A46) (68); *Thermus sp.*, *Thermus* sp. maltogenic amylase (PDB accession number 1SMA) (29); *B. lichen*, *B. licheniformis* maltogenic amylase (GenBank accession number CAA47612) (28); *B. stearo*, *B. stearothersophilus* maltogenic amylase (PDB accession number 1QHO) (13).

U/mg. After purification of the proteins by Ni<sup>2+</sup> affinity and anion-exchange chromatography, a certain amount of the unprocessed amylase was still present, as evidenced by the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels (data not shown). Nevertheless, in order to have uniform conditions for comparison, the protein concentrations were adjusted to have 4 U of activity per ml of reaction mixture.

In order to biochemically characterize mutants showing a higher alcoholysis/hydrolysis ratio, they were expressed in the cytoplasm by removing the signal peptide. Thus, the yields and purities of H222Q, H222E, and H222D mutants were improved, eliminating contamination with unprocessed peptide.

#### Product profile after starch hydrolysis with Amy mutants.

Although the wild-type AmyA and its mutants showed similar patterns of starch hydrolysis with G1 and G2 as the main products, their relative concentrations varied among the mutants, as shown in Fig. 1b. The mutants in domain B, W177V and Y178V, as well as the mutant H222Q, showed a G1/G2 ratio similar to that of the wild-type enzyme (Fig. 1). On the other hand, mutations of His222 to acidic residues showed a decrease in the G1/G2 ratio, especially mutant H222E, whose G1/G2 ratio decreased twofold. The V259W and F179V mutants also showed lower G1/G2 ratios and the presence of a larger product, G6, not detectable in the rest of the mutants (Fig. 1a). All the mutant and wild-type enzymes showed products that could be attributed to transglycosylation reactions different from  $\alpha$ -1,4. During the first minutes of the reaction, accumulation of oligosaccharides took place (data not shown). However, once a pseudoequilibrium was reached, the band corresponding to G3 seemed to disappear, giving rise to a product band with lower mobility present in all variants but H222E. This band had a different mobility than G3, as can be appreciated in Fig. 1a, lane 9, where a double band can be observed for the mutant V259W, showing that in reactions performed with this mutant, G3 was still present, in addition to the other transglycosylation reaction products observed with the other enzymes. Besides this product, all the variants showed the presence of a second, unexpected band that ran between G4 and G5. Mutants at His222 and mutants F179V and V259W also showed a product that seemed to have a lower mobility than G5. The presence of these bands suggests the production of transglycosylation products in addition to those usually found in  $\alpha$ -amylases. Further support for this hypothesis is shown in Fig. 2a, lanes 10 to 17, where glucoamylase was used to hydrolyze the final alcoholysis reaction products to methyl glucoside and glucose. As can be observed in the figure, besides the expected bands corresponding to the hydrolysis products, bands corresponding to the additional transglycosylation products were still present, indicating that they were not glucoamylase substrates. These species were produced more slowly, but since they were not substrates for  $\alpha$ -amylase, they accumulated at equilibrium.

**Alcoholysis reactions with Amy mutants.** With the exception of the mutants at position 222, the variants yielded a product profile similar to that of the wild-type enzyme (Fig. 2a). Therefore, the W177V, Y178V, and F179V (which was particularly unstable in the presence of alcohols) mutants were not further investigated. The alcoholysis products that can be unequivocally assigned are methyl glucoside and methyl maltoside, which have higher mobility in TLC than any hydrolysis prod-

TABLE 1. Characterization of wild-type and mutant  $\alpha$ -amylase alcoholysis reactions<sup>a</sup>

Enzyme	No. of alcoholysis events	No. of hydrolysis events	Alcoholysis/hydrolysis ratio	Efficiency of alcoholysis reaction (%)	Amt of methyl glucoside (mg/ml)
Wild type	80	239	0.33	25	7.5 $\pm$ 0.6
H222D	103	132	0.78	44	10.6 $\pm$ 4.0
H222E	85	169	0.51	34	9.7 $\pm$ 1.8
H222Q	121	177	0.68	41	12.5 $\pm$ 2.0

<sup>a</sup> Starch, 6%; methanol, 20%.

uct. However, the lack of methyl-saccharide standards of higher molecular weight and the possibility of overlapping of some alcoholysis and hydrolysis products precluded a direct evaluation of alcoholysis reaction yields. To overcome this limitation, the final products of the reaction were completely hydrolyzed with glucoamylase to generate glucose and methyl glucoside (a direct indicator of alcoholysis reactions). Figure 2a shows the product profiles of alcoholysis reactions of the wild-type enzyme and mutants before and after treatment with glucoamylase. His222 mutants showed a greater amount of methyl glucoside than the wild-type enzyme and the other mutants, as shown in Fig. 2a. The amounts of methyl glucoside generated for His222 mutants were quantified by HPLC (Table 1). From these results, it may be concluded that H222Q showed the highest yield of methyl glucoside. Mutant H222Q presented an increase in the alcoholysis events as a consequence of an increase in alcoholysis and a reduction in hydrolysis activity of almost 30%. The twofold increase in the alcoholysis/hydrolysis ratio resulted in approximately 80% increase in the amount of methyl glucoside produced by this mutant (Fig. 2c). Although mutant H222D showed the highest alcoholysis/hydrolysis ratio, its production of methyl glycosides was lower than that of the H222Q mutant. This can be attributed to loss of activity in the presence of methanol, as suggested by the presence of residual starch in the reaction, even though equal numbers of activity units were used for all assays (Fig. 2a, lane 4). The same seems to be true for the H222E mutant, although it had the lowest alcoholysis/hydrolysis ratio among the mutants.

**Alcoholysis reactions with butanol.** The ultimate goal is to generate alkyl glucosides with good surfactant properties, for which the use of higher-molecular-weight alcohols as acceptors is imperative. We decided to test the abilities of the wild type and mutants H222Q and H222E to carry out butanolysis. From previous experience (55), the yield of butanolysis was higher when the reaction was carried out in a single phase (buffer saturated with butanol) than when larger amounts of alcohol were used, probably due to an inefficient homogenization of the two phases. We therefore used a butanol-saturated buffer solution to carry out these reactions. Figure 5a shows the product profiles of the wild type and the different His222 mutants. As can be observed in Fig. 5c, mutant H222Q maintained a higher alcoholysis/hydrolysis ratio than the wild-type enzyme (twofold) and yielded 50% more butyl glucoside (Fig. 5b). However, the amount of butyl glucoside produced might have been limited by the availability of butanol in the reaction mixture relative to the methanolysis reactions. The instability of

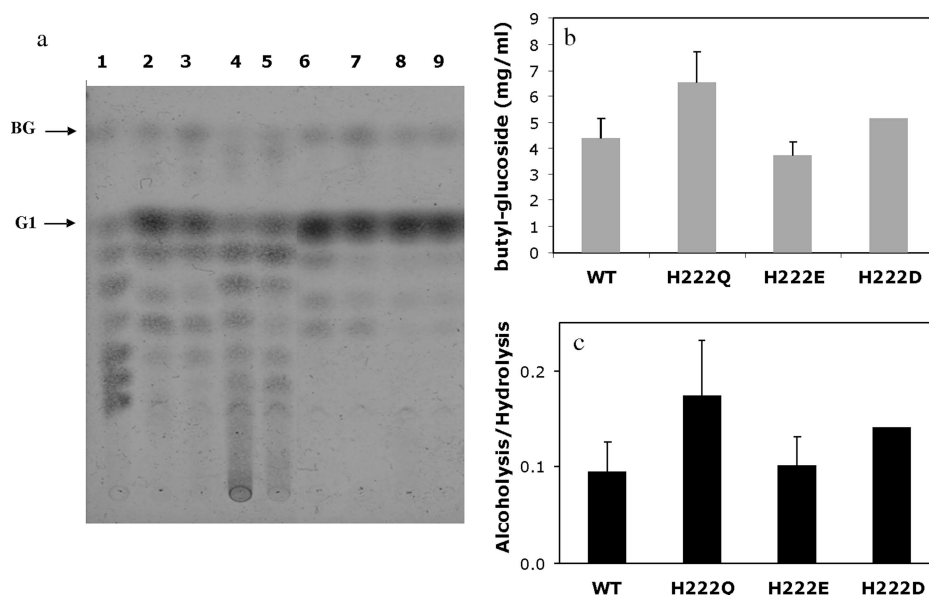


FIG. 5. (a) Alcoholysis reaction products obtained from 6% starch-8% butanol saturated with buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  buffer, pH 7) with 20 U/ml of the respective enzymes after 48 h of incubation at 85°C. Lane 1, standards: BG (butyl glucoside), G1, glucose. Lanes 2 to 5, butanolysis reaction with the wild type and H222Q, H222D, and H222E mutants, respectively; lanes 6 to 9, subsequent treatment of butanolysis reaction mixtures with *A. niger* glucoamylase of the wild type and H222Q, H222D, and H222E mutants, respectively. (b) Yields of butyl glucoside after 48 h of incubation at 85°C and their subsequent treatment with *A. niger* glucoamylase from the different variants. (c) Alcoholysis/hydrolysis ratios with the different variants. The error bars indicate standard deviations.

mutants H222E and H222D toward butanol was more prominent, as can be observed in Fig. 5a, lanes 4 and 5, yielding an amount of butyl glucoside similar to that of the wild-type enzyme.

**Transglycosylation activity.** In order to establish if reduction in hydrolysis events in mutants H222D and H222E was the result of a change in substrate specificity or a decrease in transglycosylation activity, we compared the hydrolysis/transglycosylation patterns in the enzymes using small oligosaccharides as substrates. When G3 was used as a substrate (Fig. 6a), the wild-type enzyme, H222D, and H222Q, after producing

some transglycosylation products, generated G1 and G2 as the predominant end species; however, H222E did not recognize G3 as a substrate, accepting G4 as the smallest substrate for activity (Fig. 6b), resulting in a product pattern very similar to the one obtained with H222D, accumulating different amounts of maltodextrins (data not shown). These results suggest that there is a loss of affinity binding to small oligosaccharides in H222E, rather than a loss in transglycosylation activity.

**Thermostability.** One of the main reasons to select *T. maritima*  $\alpha$ -amylase for alcoholysis was its high temperature sta-

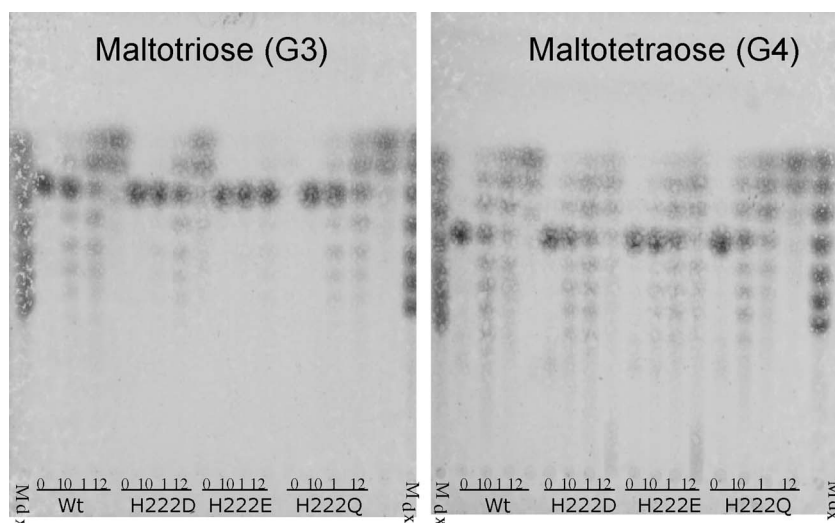


FIG. 6. Transglycosylation products obtained from maltotriose (a) and maltotetraose (b) using 4 U/ml of the wild type and mutants after 0 and 10 min and 1 and 12 h of incubation at 85°C. Lane 1 is the molecular marker, a mixture of oligosaccharides from glucose to maltoheptaose.

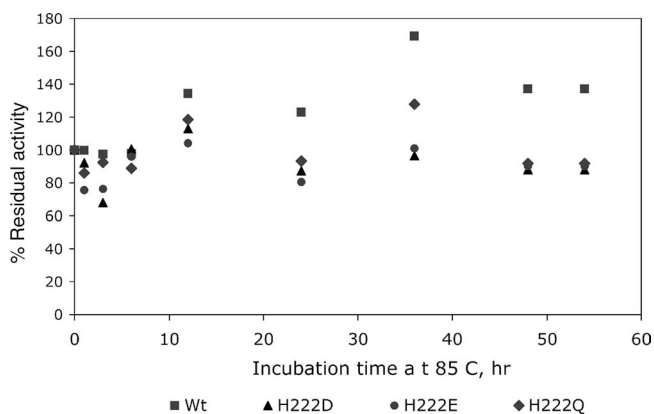


FIG. 7. Thermal inactivation of the wild type and mutants at His222 of  $\alpha$ -amylase from *T. maritima* after incubation at 85°C.

bility, a condition required for starch processing that may also be extended to stability in organic solvents. It was therefore important for industrial applications to demonstrate that the thermostability of AmyA was preserved in the alcoholic mutants. We measured the residual activity of the wild-type enzyme, as well as that in the H222D, H222E, and H222Q mutants, after incubation at 85°C. The wild-type AmyA was found to be stable for more than 30 h at 85°C, a property that was unaltered in the mutants. Although no activity loss existed after 30 h of incubation, extending the incubation time beyond this period was difficult due to solvent evaporation (Fig. 7); however for practical purposes, the half-lives of the enzyme and its mutants fulfilled the stability requirements of the industrial process.

## DISCUSSION

In contrast to bacillar  $\alpha$ -amylases from *B. licheniformis* and *B. stearothermophilus*, the saccharifying  $\alpha$ -amylase AmyA from *T. maritima* is capable of efficiently carrying out alcoholysis reactions by transferring starch hydrolysis products to methanol. These results are consistent with the previous conclusion that saccharifying  $\alpha$ -amylases are better transferases than liquefactant enzymes (54). Moreover, AmyA generates 3.7 and 11 times more alkyl glucosides than those observed with the saccharifying  $\alpha$ -amylases from *A. niger* and *A. oryzae*, respectively, under selected reaction conditions (55).

Among the family 13 glycoside hydrolases, CGTases, maltogenic amylases, and neopullulanases have an important transglycosylation activity. Even though they share a common fold and general mechanism (33), there are some differences among these enzymes. For example, CGTases and maltogenic amylases contain extra domains besides the canonical A, B, and C domains. Some differences can also be identified in the catalytic domain (24). Identification of these differences led us in the past to introduce transglycosylation activity into the liquefying  $\alpha$ -amylase from *B. stearothermophilus* through the replacement of Ala289 by phenylalanine or tyrosine (54). This replacement conformed to the observation of aromatic residues at that position in natural glycoside transferases (like CGTases), as well as in a conserved region among maltogenic glycoside hydrolases (10) and in saccharifying amylases of fun-

gal origin (54). It has been widely accepted that an aromatic residue at position 286 (*B. licheniformis* number) is a key condition for transglycosylation (34, 40, 45, 50, 54). An interesting observation is the conservation of a phenylalanine residue at position 277 in AmyA (equivalent to position 286 in *B. licheniformis* and 289 in *B. stearothermophilus*  $\alpha$ -amylases), in agreement with the importance of an aromatic residue at this position for transglycosylation activity. In fact, we have previously proposed that the effect of transglycosylation of aromatic residue 289 in *B. stearothermophilus* could not necessarily be due only to a change to a more hydrophobic environment in the active site, but also to a change in the constellation of the active site (54). When the mutant A289F of *B. stearothermophilus* amylase was modeled, a steric clash between this residue and Trp266 produced a twist in the tryptophan side chain. This residue, which is just two positions after the acid-base Glu264 residue, bridges the incoming nucleophilic water in the structure of barley  $\alpha$ -amylase (27), so that a change in its orientation could displace the water molecule, preventing it from being activated by Glu264, acting as a base in this step of the reaction. In fact, in *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylase, we found that the V286Y W263L double mutant counteracts the effect produced by the single mutation V286Y (50). From a multiple-sequence alignment, we found that aromatic residues already occupy the positions equivalent to Val286 and Trp263 in AmyA (Fig. 4); however, other transglycosidic enzymes (specifically, CGTases) contain the signature tryptophan-phenylalanine invariably after the acid-base glutamic acid residue (24). The importance of this aromatic dipeptide in CGTases for cyclizing reactions has been demonstrated by Fujiwara and coworkers (18). When these residues were replaced by the aliphatic valine-isoleucine pair, the formation of  $\alpha$ -cyclodextrins was completely abolished and liquefying activity decreased drastically. The phenylalanine is one of the two aromatic residues in subsite +2 that sandwich the incoming nonreducing end of the saccharide for the cyclization reaction and seems to also be important for the structural integrity of the active site through its hydrophobic interaction with the lysine residue three positions after the nucleophile aspartic residue at beta 4 (64). AmyA has a valine-phenylalanine dipeptide at these positions. The replacement of the valine residue by tryptophan decreased the specific activity and changed the product profile of the enzyme, leaving some longer products, like G5 and G6, in addition to the G1 and G2 main products. Interestingly, in the context of AmyA, this substitution, as well as the F179V mutation in domain B, abolished the formation of a product with mobility between G4 and G5 observed by TLC upon digestion with the wild type and mutants that was not a substrate for glucoamylase (this is shown in Fig. 2, where the alcoholysis reactions were treated with glucoamylase). Thus, mutations at Phe179 and Val259 seem to have removed at least one transglycosylation activity different from  $\alpha$ -1,4.

His222 is part of the second highly conserved region among glycoside hydrolases after the catalytic nucleophile (aspartate at beta 4) (Fig. 4). It is worth noting that a histidine residue is highly conserved among  $\alpha$ -amylases and CGTases, but maltogenic amylases, neopullulanases, and cyclodextrinases contain a glutamic acid at the equivalent position (33). The importance of this position in the catalytic process has been demonstrated in various enzymes. Mutagenesis of the equivalent residue



His269 to leucine in the *Bacillus* sp. strain TS-23  $\alpha$ -amylase completely inactivated the enzyme (11). In the case of *B. stearothermophilus*  $\alpha$ -amylase, the replacement of the equivalent His238 by aspartic acid generated an enzyme with a reduced hydrolysis rate and a modified final product profile (67) that could be the consequence of an increase in its transferase activity. In contrast, maltogenic *Thermus* amylase, an enzyme with an important transferase activity, contains a glutamic acid residue at the position equivalent to His222; when this residue was replaced by an uncharged or positively charged amino acid, like glutamine or histidine, its transferase activity was considerably reduced (10).

In AmyA, the change of His222 to linear residues, like aspartic acid, glutamine, and glutamic acid, increased its alcoholic activity; however, with the H222Q mutant, the increase in the amount of methyl glucoside obtained represents, to our knowledge, the best alcoholic  $\alpha$ -amylase reported so far. The lower yields observed for the H222D and H222E mutants suggest that the presence of the carboxylic group has a destabilizing effect in the presence of alcohols. A destabilizing effect should not be surprising when a potentially positively charged residue is replaced by a negatively charged residue. Based on the structure of the  $\alpha$ -amylase from *A. oryzae* (PDB entry 7TAA) (7) in the model generated by AmyA, the glucose located in subsite +1 interacts with His222 (His210 in *A. oryzae*) by means of hydrogen bonds. The common effect of increased alcoholysis and decreased hydrolysis observed upon mutation to the isosteric glutamic acid or glutamine residue could be attributed to the enhanced flexibility of these side chains compared to the imidazol ring, leaving more space to accommodate larger acceptor groups, favoring the entrance of alcohol over water. The presence of a charge can also alter the electrostatic potential of the active site. As previously suggested by Kim et al. (30), it is possible that the carboxylate group of the glutamic acid side chain helps to position the acceptor molecule in the proper orientation for the transfer reaction. However, the presence of the charge in the glutamic acid mutant was destabilizing in the presence of methanol, giving a lower yield in the alcoholysis reaction.

Exploration of new and more interesting activities from an industrial point of view requires robust enzymes capable of withstanding harsh conditions and mutagenesis. In this sense, thermophilic organisms are a good source of potential scaffolds for protein engineering. In this case, we relied on the correlation of thermal stability observed in thermophilic or hyperthermophilic enzymes with their stability in the presence of denaturing agents and organic solvents (12) to tolerate reaction conditions involving a high content of alcohol concentrations. The  $\alpha$ -amylase AmyA from *T. maritima* not only provided this key requirement, it turned out to have an important transferase activity that was further increased by site-directed mutagenesis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants IN214803-3 from PAPIIT and P49590-Q from CONACyT to G.S.-R.

We thank Leticia Olvera and Mary Olvera for providing a *T. maritima* library and Ricardo Ciria and the computer group under his supervision for their technical support.

#### REFERENCES

- Aghajari, N., G. Feller, C. Gerday, and R. Haser. 2002. Structural basis of alpha-amylase activation by chloride. *Protein Sci.* **11**:1435–1441.
- Aghajari, N., M. Roth, and R. Haser. 2002. Crystallographic evidence of a transglycosylation reaction: ternary complexes of a psychrophilic alpha-amylase. *Biochemistry* **41**:4273–4280.
- Allen, J. D., and J. A. Thoma. 1976. Subsite mapping of enzymes. Application of the depolymerase computer model to two alpha-amylases. *Biochem. J.* **159**:121–132.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
- Altschul, S. F., J. C. Wootton, E. M. Gertz, R. Agarwala, A. Morgulis, A. A. Schaffer, and Y. K. Yu. 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.* **272**:5101–5109.
- Brady, R. L., A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. J. Dodson, and G. G. Dodson. 1991. Solution of the structure of *Aspergillus niger* acid alpha-amylase by combined molecular replacement and multiple isomorphous replacement methods. *Acta Crystallogr. B* **47**:527–535.
- Brzozowski, A. M., and G. J. Davies. 1997. Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* **36**:10837–10845.
- Brzozowski, A. M., D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, H. Bisgaard-Frantzen, A. Svendsen, T. V. Borchert, Z. Dauter, K. S. Wilson, and G. J. Davies. 2000. Structural analysis of a chimeric bacterial alpha-amylase. High-resolution analysis of native and ligand complexes. *Biochemistry* **39**:9099–9107.
- Brzozowski, A. M., A. C. Pike, Z. Dauter, R. E. Hubbard, T. Bonn, O. Engstrom, L. Ohman, G. L. Greene, J. A. Gustafsson, and M. Carlquist. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**:753–758.
- Cha, H. J., H. G. Yoon, Y. W. Kim, H. S. Lee, J. W. Kim, K. S. Kweon, B. H. Oh, and K. H. Park. 1998. Molecular and enzymatic characterization of a maltogenic amylase that hydrolyzes and transglycosylates acarbose. *Eur. J. Biochem.* **253**:251–262.
- Chang, C. T., H. F. Lo, M. C. Chi, C. Y. Yao, W. H. Hsu, and L. L. Lin. 2003. Identification of essential histidine residues in a recombinant alpha-amylase of thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. strain TS-23. *Extremophiles* **7**:505–509.
- Cowan, D. A. 1997. Thermophilic proteins: stability and function in aqueous and organic solvents. *Comp. Biochem. Physiol. A* **118**:429–438.
- Dauter, Z., M. Dauter, A. M. Brzozowski, S. Christensen, T. V. Borchert, L. Beier, K. S. Wilson, and G. J. Davies. 1999. X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. *Biochemistry* **38**:8385–8392.
- del Río, G., E. Morett, and X. Soberón. 1997. Did cyclodextrin glycosyltransferases evolve from alpha-amylases? *FEBS Lett.* **416**:221–224.
- Fogarty, W. M. 1983. Microbial amylases, p. 1–92. In W. M. Fogarty (ed.), *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied Science Publishers Ltd., New York, NY.
- Friedberg, F. 1983. On the primary structure of amylases. *FEBS Lett.* **152**:139–140.
- Fujimoto, Z., K. Takase, N. Doui, M. Momma, T. Matsumoto, and H. Mizuno. 1998. Crystal structure of a catalytic-site mutant alpha-amylase from *Bacillus subtilis* complexed with maltopentaose. *J. Mol. Biol.* **277**:393–407.
- Fujiwara, S., H. Kakihara, K. Sakaguchi, and T. Imanaka. 1992. Analysis of mutations in cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* which affect cyclization characteristics and thermostability. *J. Bacteriol.* **174**:7478–7481.
- Guex, N., and M. C. Peitsch. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714–2723.
- Hinz, S. W., C. H. Doeswijk-Voragen, R. Schipperus, L. A. van den Broek, J. P. Vincken, and A. G. Voragen. 2006. Increasing the transglycosylation activity of alpha-galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 by site-directed mutagenesis. *Biotechnol. Bioeng.* **93**:122–131.
- Hoof, R. W., G. Vriend, C. Sander, and E. E. Abola. 1996. Errors in protein structures. *Nature* **381**:272.
- Hwang, K. Y., H. K. Song, C. Chang, J. Lee, S. Y. Lee, K. K. Kim, S. Choe, R. M. Sweet, and S. W. Suh. 1997. Crystal structure of thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* refined at 1.7 Å resolution. *Mol. Cells* **7**:251–258.
- Ishii, N., K. Haga, K. Yamane, and K. Harata. 2000. Crystal structure of alkaliphilic asparagine 233-replaced cyclodextrin glucanotransferase complexed with an inhibitor, acarbose, at 2.0 Å resolution. *J. Biochem.* **127**:383–391.
- Janecek, S., E. A. MacGregor, and B. Svensson. 1995. Characteristic differences in the primary structure allow discrimination of cyclodextrin glucanotransferases from alpha-amylases. *Biochem. J.* **305**:685–686.
- Janecek, S., B. Svensson, and B. Henrissat. 1997. Domain evolution in the alpha-amylase family. *J. Mol. Evol.* **45**:322–331.

26. Jespersen, H. M., E. A. MacGregor, B. Henrissat, M. R. Sierks, and B. Svensson. 1993. Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural features of the catalytic (beta/alpha)<sub>8</sub>-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes. *J. Protein Chem.* **12**:791–805.
27. Kadziola, A., J. Abe, B. Svensson, and R. Haser. 1994. Crystal and molecular structure of barley alpha-amylase. *J. Mol. Biol.* **239**:104–121.
28. Kim, I. C., J. H. Cha, J. R. Kim, S. Y. Jang, B. C. Seo, T. K. Cheong, D. S. Lee, Y. D. Choi, and K. H. Park. 1992. Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biol. Chem.* **267**:22108–22114.
29. Kim, J. S., S. S. Cha, H. J. Kim, T. J. Kim, N. C. Ha, S. T. Oh, H. S. Cho, M. J. Cho, M. J. Kim, H. S. Lee, J. W. Kim, K. Y. Choi, K. H. Park, and B. H. Oh. 1999. Crystal structure of a maltogenic amylase provides insights into a catalytic versatility. *J. Biol. Chem.* **274**:26279–26286.
30. Kim, T. J., C. S. Park, H. Y. Cho, S. S. Cha, J. S. Kim, S. B. Lee, T. W. Moon, J. W. Kim, B. H. Oh, and K. H. Park. 2000. Role of the glutamate 332 residue in the transglycosylation activity of *Thermus* maltogenic amylase. *Biochemistry* **39**:6773–6780.
31. Klein, C., and G. E. Schulz. 1991. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **217**:737–750.
32. Kondo, H., H. Nakatani, R. Matsuno, and K. Hiromi. 1980. Product distribution in amylase-catalyzed hydrolysis of amylose. Comparison of experimental results with theoretical predictions. *J. Biochem.* **87**:1053–1070.
33. Kuriki, T., and T. Imanaka. 1999. The concept of the alpha-amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J. Biosci. Bioeng.* **87**:557–565.
34. Kuriki, T., H. Kaneko, M. Yanase, H. Takata, J. Shimada, S. Handa, T. Takada, H. Umeyama, and S. Okada. 1996. Controlling substrate preference and transglycosylation activity of neopullulanase by manipulating steric constraint and hydrophobicity in active center. *J. Biol. Chem.* **271**:17321–17329.
35. Lawson, D. M., A. M. Brzozowski, S. Rety, C. Verma, and G. G. Dodson. 1994. Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling. *Protein Eng.* **7**:543–550.
36. Leemhuis, H., H. J. Rozeboom, M. Wilbrink, G. J. Euverink, B. W. Dijkstra, and L. Dijkhuizen. 2003. Conversion of cyclodextrin glycosyltransferase into a starch hydrolase by directed evolution: the role of alanine 230 in acceptor subsite +1. *Biochemistry* **42**:7518–7526.
37. Liebl, W., I. Stemplinger, and P. Ruile. 1997. Properties and gene structure of the *Thermotoga maritima* alpha-amylase AmyA, a putative lipoprotein of a hyperthermophilic bacterium. *J. Bacteriol.* **179**:941–948.
38. MacGregor, E. A., S. Janacek, and B. Svensson. 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1546**:1–20.
39. Matsubara, S. 1961. Studies on Taka-amylase A. VII. Transmaltosidation by Taka-amylase A. *J. Biochem.* **49**:226–231.
40. Matsui, I., S. Yoneda, K. Ishikawa, S. Miyairi, S. Fukui, H. Umeyama, and K. Honda. 1994. Roles of the aromatic residues conserved in the active center of *Saccharomyces* alpha-amylase for transglycosylation and hydrolysis activity. *Biochemistry* **33**:451–458.
41. Matsuura, Y., M. Kusunoki, W. Harada, and M. Kakudo. 1984. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J. Biochem.* **95**:697–702.
42. Moreno, A., G. Saab-Rincon, R. I. Santamaia, X. Soberon, and A. Lopez-Munguia. 2004. A more efficient starch degradation by the combination of hydrolase and transferase activities of alpha-amylase and cyclomaltodextrin glucanotransferase. *Starch* **56**:63–68.
43. Mosi, R., S. He, J. Uitdehaag, B. W. Dijkstra, and S. G. Withers. 1997. Trapping and characterization of the reaction intermediate in cyclodextrin glycosyltransferase by use of activated substrates and a mutant enzyme. *Biochemistry* **36**:9927–9934.
44. Nakajima, R., T. Imanaka, and S. Aiba. 1986. Comparison of amino acid sequences of eleven different  $\alpha$ -amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**:355–360.
45. Nakamura, A., K. Haga, and K. Yamane. 1994. The transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase is operated by a ping-pong mechanism. *FEBS Lett.* **337**:66–70.
46. Nielsen, J. E., and T. V. Borchert. 2000. Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim. Biophys. Acta* **1543**:253–274.
47. Pujadas, G., and J. Palau. 2001. Evolution of  $\alpha$ -amylases: architectural features and key residues in the stabilization of the (beta/alpha)<sub>8</sub> scaffold. *Mol. Biol. Evol.* **18**:38–54.
48. Qian, M., V. Nahoum, J. Bonicel, H. Bischoff, B. Henrissat, and F. Payan. 2001. Enzyme-catalyzed condensation reaction in a mammalian alpha-amylase. High-resolution structural analysis of an enzyme-inhibitor complex. *Biochemistry* **40**:7700–7709.
49. Ramasubbu, N., C. Ragunath, and P. J. Mishra. 2003. Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase. *J. Mol. Biol.* **325**:1061–1076.
50. Rivera, M. H., A. Lopez-Munguia, X. Soberon, and G. Saab-Rincon. 2003. Alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. *Protein Eng.* **16**:505–514.
51. Robyt, J. F., and D. French. 1967. Multiple attach hypothesis of alpha-amylase action: action of porcine pancreatic, human salivary, and *Aspergillus oryzae* alpha-amylases. *Arch. Biochem. Biophys.* **122**:8–16.
52. Rogers, J. C. 1985. Conserved amino acid sequence domains in alpha-amylases from plants, mammals, and bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**:470–476.
53. Rydberg, E. H., G. Sidhu, H. C. Vo, J. Hewitt, H. C. Cote, Y. Wang, S. Numao, R. T. MacGillivray, C. M. Overall, G. D. Brayer, and S. G. Withers. 1999. Cloning, mutagenesis, and structural analysis of human pancreatic alpha-amylase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Sci.* **8**:635–643.
54. Saab-Rincon, G., G. del-Rio, R. I. Santamaria, A. Lopez-Munguia, and X. Soberon. 1999. Introducing transglycosylation activity in a liquefying alpha-amylase. *FEBS Lett.* **453**:100–106.
55. Santamaria, R. I., G. Del Rio, G. Saab, M. E. Rodriguez, X. Soberon, and A. Lopez. 1999. Alcoholysis reactions from starch with alpha-amylases. *FEBS Lett.* **452**:346–350.
56. Sarkar, G., and S. S. Sommer. 1990. The “megaprimer” method of site-directed mutagenesis. *BioTechniques* **8**:404–407.
57. Sarney, D. B., and E. N. Vulfson. 1995. Application of enzymes to the synthesis of surfactants. *Trends Biotechnol.* **13**:164–172.
58. Strobl, S., K. Maskos, M. Betz, G. Wiegand, R. Huber, F. X. Gomis-Ruth, and R. Glockshuber. 1998. Crystal structure of yellow meal worm alpha-amylase at 1.64 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **278**:617–628.
59. Summer, J. B., and S. F. Howell. 1935. A method for determination of saccharase activity. *J. Biol. Chem.* **108**:51–54.
60. Suvd, D., Z. Fujimoto, K. Takase, M. Matsumura, and H. Mizuno. 2001. Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase: possible factors determining the thermostability. *J. Biochem.* **129**:461–468.
61. Svensson, B. 1988. Regional distant sequence homology between amylases,  $\alpha$ -glucosidases and transglucanoylases. *FEBS Lett.* **230**:72–76.
62. Uitdehaag, J. C. M., R. Mosi, K. H. Kalk, B. A. van der Veen, L. Dijkhuizen, S. G. Withers, and B. W. Dijkstra. 1999. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the  $\alpha$ -amylase family. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **6**:432–436.
63. van der Maarel, M. J., B. van der Veen, J. C. M. Uitdehaag, H. Leemhuis, and L. Dijkhuizen. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J. Biotechnol.* **94**:137–155.
64. van der Veen, B. A., H. Leemhuis, S. Kralj, J. C. M. Uitdehaag, B. W. Dijkstra, and L. Dijkhuizen. 2001. Hydrophobic amino acid residues in the acceptor binding site are main determinants for reaction mechanism and specificity of cyclodextrin-glycosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **276**:44557–44562.
65. van Rantwijk, F., M. Woudenberg-van Oosterom, and R. A. Sheldon. 1999. Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *J. Mol. Catal. B* **6**:511–532.
66. Vieille, C., and G. J. Zeikus. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**:1–43.
67. Vihinen, M., P. Ollikka, J. Niskanen, P. Meyer, I. Suominen, M. Karp, L. Holm, J. Knowles, and P. Mantsala. 1990. Site-directed mutagenesis of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: putative role of three conserved residues. *J. Biochem.* **107**:267–272.
68. Wind, R. D., R. M. Buitelaar, and L. Dijkhuizen. 1998. Engineering of factors determining alpha-amylase and cyclodextrin glycosyltransferase specificity in the cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermoanaerobacterium* EMI. *Eur. J. Biochem.* **253**:598–605.



## Transglycosylation reactions of *Thermotoga maritima* $\alpha$ -amylase

Moreno Alina, Damian-Almazo Juanita Yazmin, Miranda Alfonso, Saab-Rincon Gloria, Gonzalez Fernando, Lopez-Munguia Agustin\*

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM Apartado Postal 510-3, Av Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. CP 62240, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 June 2009

Received in revised form

30 September 2009

Accepted 4 December 2009

#### Keywords:

$\alpha$ -Amylase

*Thermotoga maritima*

Transglycosylation

Alcoholysis

Alkyl-glycosides

Neotrehalose

### ABSTRACT

The capacity of Amy A, a  $\alpha$ -amylase from the hyperthermophilic bacteria *Thermotoga maritima* to carry out transfer reactions in addition to hydrolysis was investigated. Amy A is a saccharifying enzyme that catalyzes the hydrolysis of internal  $\alpha$ -1,4 linkages of glucose polymers generating low molecular weight products (G1–G7); however, in the long term it is capable of producing glucose and maltose exclusively. It was shown that Amy A is able to transform maltose to higher molecular weight oligosaccharides like maltoheptaose, through a combination of transfer and hydrolysis reactions: the fact that the enzyme can use maltose to generate higher molecular weight products is an almost unique property among  $\alpha$ -amylases, with neotrehalose as one of the products of the transglycosylation activity. Amy A is also capable of efficiently performing alcoholysis reactions from starch and maltodextrins to methanol and butanol, generating alkyl-glycosides. This is the first report in the scientific literature concerning the synthesis of neotrehalose by an  $\alpha$ -amylase.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

$\alpha$ -Amylases ( $\alpha$ -1,4-D-glucan glucanhydrolases, E.C. 3.2.1.1) are enzymes that catalyze the hydrolysis of internal  $\alpha$ -1,4 linkages of starch molecules acting through a “retaining mechanism” [1] and belong to family 13 of glycosyl hydrolases (GH13).  $\alpha$ -Amylases are widely distributed in nature and have found multiple applications in industry, derived from their hydrolytic and transglucolytic nature, which have also made them an interesting subject of structure–function relationship studies.

These enzymes consist of three domains. Domain A is the central and catalytic domain, consisting of a  $(\beta/\alpha)_8$  barrel (TIM barrel); domain B is found in the loop connecting  $\beta$ -strand 3 to  $\alpha$ -helix 3 of the catalytic domain and has been implicated in substrate specificity; domain C is found at the C-terminal end of the protein and is apparently involved in starch binding [2,3]. In general,  $\alpha$ -amylases have five highly conserved regions that include the residues needed for catalysis [4–6]; the sequence similarities between amylases from different origins have been extensively studied [7].

$\alpha$ -Amylases are also classified as “liquefying” or “saccharifying” enzymes depending on the depolymerization degree obtained after extensive starch degradation, saccharifying  $\alpha$ -amylases, generally of fungal origin, achieving a higher degree of depolymerization and lower molecular weight products than liquefying  $\alpha$ -amylases, mainly of bacterial origin [8,9].

There are many reports in the literature concerning transglycosylation reactions carried out by transglycosidases, such as  $\beta$ -galactosidases [10,11],  $\beta$ -glucosidases [12,13] or  $\beta$ -xylosidases [14], among others. Nevertheless, reports dealing with  $\alpha$ -amylases are scarce.

Some  $\alpha$ -amylases have been investigated in terms of their capacity to carry out transglycosylation reactions both to their own starch hydrolysis products (malto-oligosaccharides or MOS) as well as to acceptors added to the reaction medium, such as phenolic compounds and alcohols, among others. For instance, Graber and Combes studied the transglycosylation reactions of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase from maltotetraose [15], Nishimura et al. reported the glucosylation of hydroquinone and kojic acid with the  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* X-23 [16] and Ohdan et al. used the same enzyme to transfer glycosyl residues from 4-nitrophenyl  $\alpha$ -D-maltotriose ( $G_3$ -PNP) to  $G_n$ -PNP [17]. Larsson et al. studied the synthesis of alkyl glucosides specifically from *A. oryzae*  $\alpha$ -amylase, using starch as the glucosyl donor [18], while Santamaría et al. [9] extensively studied alcoholysis reactions with starch and methanol using *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*  $\alpha$ -amylases (both bacterial liquefying enzymes), as well as *Aspergillus niger* and *A. oryzae*  $\alpha$ -amylases (both saccharifying fungal enzymes), and reported that while the saccharifying enzymes were capable of alcoholysis reactions, the liquefying  $\alpha$ -amylases were less effective for these reactions. Other approaches include the study of structural features implicated in  $\alpha$ -amylase specificity, such as the introduction of transglycosylation activity to liquefying bacterial  $\alpha$ -amylases from *B. stearothermophilus* [19] and *B. licheniformis* [20].

\* Corresponding author. Tel.: +52 777 329 16 00; fax: +52 777 317 23 88.  
E-mail address: [agustin@ibt.unam.mx](mailto:agustin@ibt.unam.mx) (A. Lopez-Munguia).

In general, starch acts as a protective agent, stabilizing  $\alpha$ -amylases to denaturation, but a general drawback exists in the fact that starch requires gelatinization and high temperature operation to reduce viscosity often incompatible with most reported amylases. Therefore, thermophilic enzymes are an interesting option as they would allow reaction temperatures closer to gelatinization and a lower operation viscosity in the reaction medium. Due to their temperature-stability profile, it is also expected that thermophilic  $\alpha$ -amylases will have higher stability in the presence of denaturing acceptors such as alcohols and higher transferase efficiencies when maltodextrins or oligosaccharides act as glucosyl donors.

Among thermophilic enzymes, several glycosyl-hydrolases from the hyperthermophilic bacteria *Thermotoga maritima* have been identified and characterized [21–23]. *T. maritima* grows at 90 °C and is one of the most thermophilic bacteria known until now [21]. From the gene expressed in *Escherichia coli*, Liebl et al. [24] first reported the properties of a *T. maritima* MSB8  $\alpha$ -amylase (Amy A), a 553 amino acid with a molecular mass of 64.7 kDa capable of producing low molecular weight products from starch, amylose and amylopectin at 80–85 °C. The highest activity was found at 85–90 °C and pH 7 and was dependent on the presence of Ca<sup>2+</sup>, and activity increased when NaCl was added to the reaction media.

In a previous paper, we reported the properties of *T. maritima*  $\alpha$ -amylase (Amy A) and site-directed mutants in hydrolysis and alcoholysis reactions from starch [25]. Nevertheless, considering the unusual properties and specificity of Amy A, in the present paper we further explore its transferase properties in the presence of different substrates such as single oligosaccharides, maltodextrins and alcohols, as well as the characterization of some transglucosidase products with potential application in different industrial sectors.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Gene cloning

The amy A gene from *T. maritima* (GenBank accession number CAA72194) was cloned into pET3a from *T. maritima* library using the oligonucleotides 5'-CGG AGG CAT ATG AAG GTT GTG AAG AAG CC-3' and 5'-CGA TCC AAG CTT CAC TTT TTG AAA ATG TAC GC-3' through NdeI and HindIII restriction sites.

*T. maritima* chromosomal DNA was kindly provided by Professor Enrique Morett from Institute of Biotechnology, UNAM. As expected, a product of 1.5 kb was obtained from chromosomal DNA by PCR reactions. After purification, the product was cloned through NdeI and HindIII restriction sites in the pET3a expression vector from Novagen. The ligated vectors were used to transform electro-competent XLBlue *E. coli* cells by electroporation and the resultant cells were plated in Luria Bertani (LB) medium containing 200  $\mu$ g/ml of ampicillin. Plasmid DNA was purified from 4 independent colonies using the high plasmid isolation kit (ROCHE) and DNA sequenced to assure the gene was complete and that the polymerase did not introduce any mutation.

### 2.2. Enzyme purification

After transformation, electro-competent BL21 DE3 *E. coli* cells were cultured in 1 l of LB medium containing 200  $\mu$ g of ampicillin at 37 °C. When OD (600 nm) of 0.4–0.5 was reached, cells were induced with 0.25 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and cultured for 4 additional hours at 30 °C. Cells were centrifuged down at 6000  $\times$  g and 4 °C during 15 min. The pellet was resuspended in 12 ml of 50 mM BIS-TRIS-HCl buffer at pH 7 containing 1 mM of both NaCl and CaCl<sub>2</sub>, heated at 70 °C for 30 min, centrifuged for 30 min at 6000  $\times$  g for 15 min at 4 °C and filtered through 0.2  $\mu$ m membranes. From this partially purified preparation Amy A was finally purified using an Äkta FPLC system equipped with UV detector and a fraction collector. A Superose HR12 size exclusion column was used for the separation, using the same BIS-TRIS-HCl buffer for elution at 0.3 ml/min. Fractions with high  $\alpha$ -amylase activity were pooled and protein purity was assured by PAGE-SDS electrophoresis stained with Coomassie. The stability of the enzyme was determined measuring the evolution of the residual activity during incubation at 85 °C.

### 2.3. Enzyme activity and protein concentration

Soluble starch, actually amylopectin produced by treating potato or corn starch with dilute hydrochloric acid, was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis,

MO, USA) (Sigma number S9765). G2–G7 were from Sigma-Aldrich, maltodextrins (Amidex, 20 DE) were supplied by Arancia Corn Products (Edomex, México). Maltodextrins were found to contain (w/w) glucose (3%), G2 (14.2%), G3 (20.5%), G4 (10.9%), G5 (15.9%), G6 (23.4%) and G7 (12.1%), as determined by HPLC.

The depolymerization of starch by Amy A was monitored following the formation of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid method as reported previously [20].

A unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to release 1  $\mu$ mol of glucose equivalents per minute. The reactions were carried out at 85 °C in a total volume of 10.5 ml of 50 mM BIS-TRIS-HCl buffer at pH 7 with 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 150 mM NaCl containing 1.2% starch. Unless otherwise stated, this buffer was used in all cases. The purified or partially purified enzyme was added at a final concentration of 0.5 U/ml. Protein concentration was determined by the Lowry method with bovine serum albumin as the standard protein [26].

### 2.4. Product profile analysis from starch and maltodextrins as Amy A substrates

Starch and maltodextrins were hydrolyzed using 0.5 U/ml of Amy A at 85 °C in all cases in a Thermomixer Compact (Eppendorf) in 1 ml of buffer containing 1.2, 2, 4 and 6% (w/v) starch and 2, 6 and 15% (w/v) maltodextrin concentrations.

After 24 h, the products generated were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and high pressure liquid chromatography (HPLC). The same product profile and the same amount of products were obtained when using either the purified enzyme or the partially purified cell extract before exclusion chromatography; therefore, the partially purified cell extracts at the indicated activity were used in the characterization of Amy A alternative reactions. No products were observed when the reaction medium was incubated at 85 °C during the same reaction time in the absence of enzyme.

### 2.5. Transglucosylation product analysis from maltose as Amy A substrate

Transglucosylation reactions from maltose as a sole substrate were carried out using 1 U/ml of the enzyme at 85 °C in 1 ml buffer with maltose concentrations of 6, 15 and 30% (w/v). Samples were taken periodically during 24 h and analyzed by TLC and HPLC.

### 2.6. Transglucosylation product analysis from G3 to G7 as Amy A substrates

Transglucosylation reactions using maltotriose (G3) to maltoheptaose (G7) as substrates were carried out with 1 U/ml of Amy A at 85 °C in 1 ml buffer with an initial oligosaccharide concentration of 2% in different reactions. Samples were taken after 10 min and 24 h of reaction and the products analyzed by TLC and HPLC. No products were observed when the reaction medium was incubated at 85 °C during the same reaction time in the absence of enzyme.

### 2.7. Identification, purification and quantification of neotrehalose from the transglucosylation reactions from oligosaccharides with Amy A

An unusual product later identified as neotrehalose was found in transglucosylation reactions with all Amy A substrates investigated (starch, maltodextrins and oligosaccharides). In general, we found that high molecular weight oligosaccharides are readily hydrolyzed by Amy A while transglucosylation reactions are more likely to occur from low molecular weight substrates, which are not readily hydrolyzed by the enzyme. Therefore, maltose proved to be the most adequate substrate for neotrehalose synthesis with Amy A. In order to identify this sugar, neotrehalose was produced in reactions containing 10 U/ml of Amy A and maltose 6% (w/v) at 85 °C in 1 ml buffer. The sugar was later purified in a preparative HPLC column as described in Section 2.12. NMR spectra were recorded on a Varian Unity NMR Spectrometer at 400 MHz for <sup>1</sup>H NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC, HSQC, and <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY and 100 MHz for <sup>13</sup>C NMR using D<sub>2</sub>O as solvent. NMR experiments are referenced to H<sub>2</sub>O and chemical shifts are reported in ppm ( $\delta$ ).

Neotrehalose and other disaccharides produced were quantified by HPLC as specifically described in Section 2.12, before and after partial hydrolysis with *A. niger* glucoamylase (see later).

### 2.8. Alcoholysis reactions with methanol

Alcoholysis reactions were carried out with 1 U/ml of  $\alpha$ -amylase at 85 °C in 1 ml buffer with either starch (6%, w/v) or maltodextrins (15%, w/v) as substrates and methanol as glucosyl acceptor at concentrations of 10, 20, 30 and 40% (v/v). The reaction was stopped after 24 h and the products analyzed by TLC and HPLC. No products were observed when the reaction medium was incubated in the presence of 30% (v/v) methanol at 85 °C during the same reaction time in the absence of enzyme.

### 2.9. Alcoholysis reactions with butanol

Alcoholysis reactions from starch (6%, w/v) as substrate and butanol (8%, v/v) as acceptor were carried out at 85 °C in 1 ml buffer containing 4 U/ml of Amy A. After 48 h of reaction, the products were analyzed by TLC; a reaction with glucoamylase

was also performed in order to reduce all the acceptor products to glucose and butyl-glucoside.

### 2.10. Glucoamylase reactions

The products obtained after transglucosylation reaction from maltose (6%, w/v) or alcoholysis reactions from starch and methanol or butanol were subjected to the action of *A. niger* glucoamylase (Sigma–Aldrich). Reactions were incubated at 40 °C for 5 h with 40 U/ml of the enzyme, which was directly added to the Amy A reaction medium after pH adjustment to 4. Samples were taken and analyzed by HPLC. Glucoamylase reduces all butyl-malto-oligosaccharides to glucose and butyl-glucoside, the smallest acceptor product, which was taken as a reference of the alcoholysis efficiency and rate.

### 2.11. Products analysis by thin layer chromatography (TLC)

TLC analysis was carried out in CCF Whatman silica gel 60 plates (10 cm × 10 cm and 200 μm) with a mobile phase consisting on (50:30:20) ethanol:butanol:water and revealed with an alcoholic solution of α-naphtol and sulphuric acid, followed by carbonization at 100 °C as reported previously [19].

### 2.12. HPLC analysis

Analysis of the reaction products was carried out by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Waters–Millipore chromatograph with a refraction index detector (Waters 410) equipped with an automatic injector model 717 plus and an aminated 4.6 mm × 250 mm Nova-Pack chromatographic column. An aqueous acetonitrile solution (70%, v/v) was used as the mobile phase at 0.8 ml/min for the quantification of all products except for neotrehalose, which was quantified with acetonitrile (80%) as the mobile phase at 1 ml/min flowrate. For neotrehalose purification, a 7.8 mm × 300 mm Bondapack NH<sub>2</sub> preparative column was used, at the same separation conditions.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Gene cloning, expression and enzyme purification

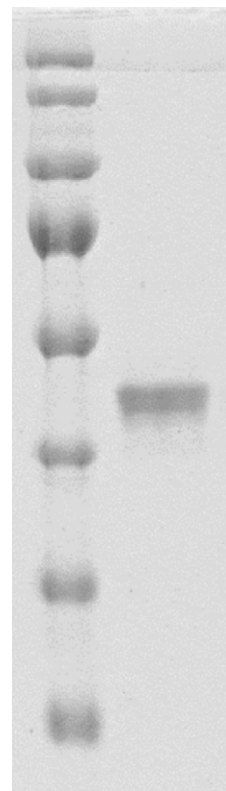
The purity of Amy A, prepared as described in Section 2 was confirmed by SDS-PAGE gel as shown in Fig. 1. The specific activity obtained was 18 μmol of glucose/min mg of protein. The enzyme dose used in the reactions was defined for each production batch in order to have the same amount of activity units per reaction volume. The purified enzyme retained 70% of the activity when stored for 48 h at 85 °C in the absence of starch.

### 3.2. Product profile of hydrolysis reactions with starch and maltodextrins

After 24 h of reaction with different concentrations of starch; maltose (G2) was the main product observed followed by glucose, G3, G4, G5 and G6.

However, after extensive hydrolysis (48 h) all oligosaccharides disappear with glucose and maltose as the exclusive products: Amy A can be classified as a saccharifying enzyme [24], and therefore capable to carry out transfer reactions. These results suggest two different steps in the starch degradation reaction: in the first step, the enzyme seems to primarily hydrolyze the substrate to low molecular weight oligosaccharides with the accumulation of maltose, while in the second step the enzyme transforms the low molecular weight products to glucose through transglucosylation reactions. As shown later, maltose can also be used as substrate for the different reactions catalyzed by the enzyme.

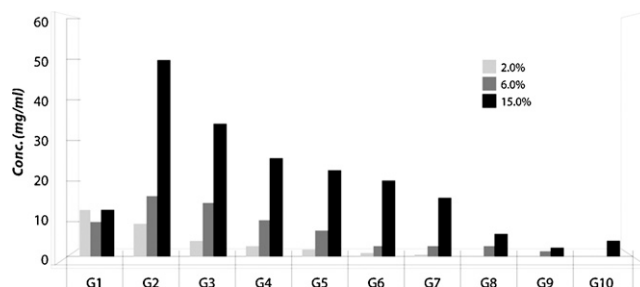
We also carried out reactions with maltodextrins. The product profile obtained from these reactions after 24 h is shown in Fig. 2 for various starch concentrations. At the lowest starch concentration (1.2%, w/v) glucose and maltose are the main reaction products. After extensive starch hydrolysis, glucose and maltose become the exclusive final reaction products even at high concentration of substrate (results not shown). The presence of larger products at high concentration of substrate, suggests that the reac-



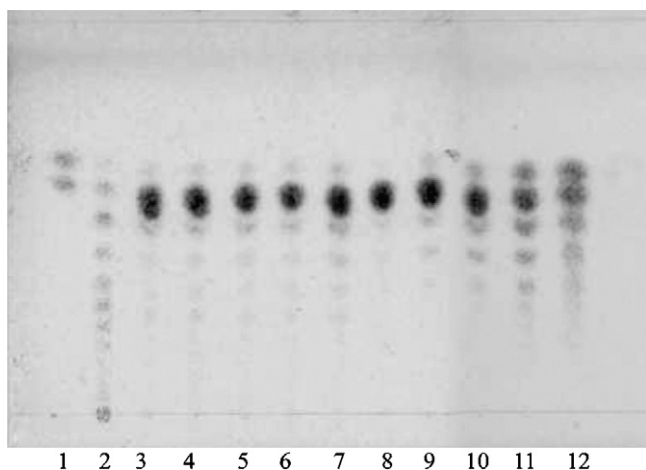
**Fig. 1.** SDS-PAGE electrophoresis gel of α-amylase from *Thermotoga maritima*. Lane 1: molecular weight standard Precision Plus (BioRad); 2: purified protein after size exclusion FPLC in Superose HR12 (Amersham).

tion has not reached equilibrium. After correcting for the initial concentration of glucose, maltose (G2), and maltotriose (G3) in the maltodextrin preparation at 150 mg/ml (3.3, 23.6 and 29.1 mg/ml, respectively), we observed an increase in G3 concentration after 24 h of reaction. This increase in G3 is either the result of the hydrolysis of higher molecular weight products present in the maltodextrins preparation, or the result of transfer reactions, for instance between two maltose molecules. Nevertheless, at this point it was not possible to establish the origin of the product G3. Therefore, we decided to explore the behavior of the enzyme when acting directly upon single oligosaccharides from G2 to G7 as substrates.

In preliminary studies with these oligosaccharides, we observed that Amy A was capable to transform faster the high molecular weight products as compared to the smaller ones; however, transfer reactions were not always easily observed and we were forced to monitor these reactions at short reaction times and low enzyme concentration.



**Fig. 2.** Product profile of Amy A action over maltodextrins (2, 6 and 15%, w/v) obtained after 24 h of reaction.

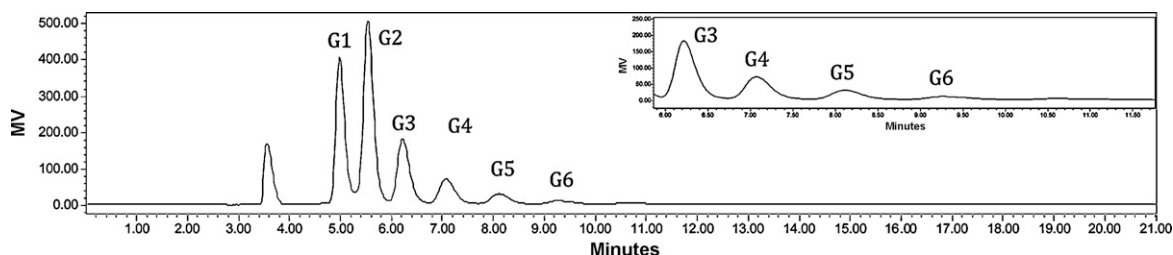


**Fig. 3.** Products observed in TLC when Amy A is incubated with 6% (w/v) of maltose—lane 1: glucose (upper stain) and maltose standards; 2: maltodextrin standards; 3: 10 min; 4: 20 min; 5: 30 min; 6: 40 min; 7: 50 min; 8: 60 min; 9: 3 h; 10: 5 h; 11: 12 h; 12: 24 h of reaction at 85 °C.

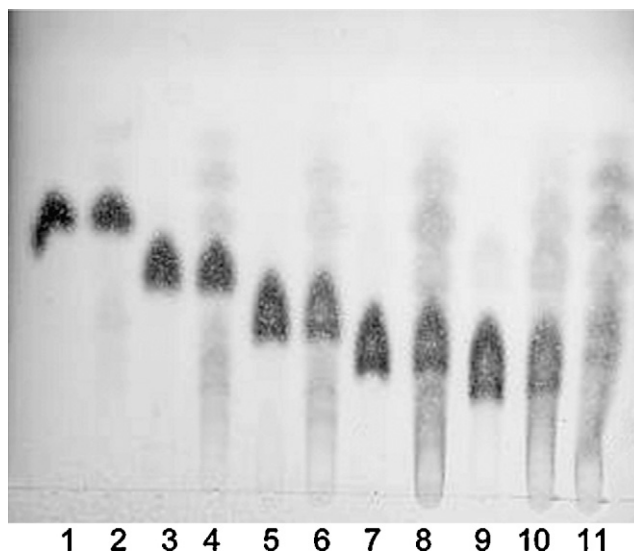
### 3.3. Transglucosylation reactions with maltose

In order to define if the enzyme is capable of using low molecular weight oligosaccharides as substrates for transglucosylation or hydrolysis, we carried out reactions with 6% (w/v) maltose and analyzed the products by TLC and HPLC. The results are shown in Fig. 3, where it is clear that Amy A is capable of using maltose as substrate to transfer glucosyl units to other oligosaccharides generating higher molecular weight products from G3 to G6 with the concomitant liberation of glucose. This is an unusual result, as most  $\alpha$ -amylases are not capable of using maltose as substrate. To the best of our knowledge, the only case reported is that of BSA<sub>m</sub> (Bacterial Saccharifying  $\alpha$ -Amylase) which is able to use maltose not only as substrate for transglucosylation, but also in condensation reactions [27].

A more systematic study was carried out observing the effect of increasing concentrations of maltose on Amy A specificity. Fig. 4 corresponds to the HPLC chromatogram obtained from the reaction with 6% (w/v) maltose after 24 h, where the accumulation of glucose and the presence of higher molecular weight products than maltose, can be readily observed. After quantification, we also found that glucose and G3 were the main reaction products from maltose, followed by G4. Accumulation of glucose from the transglucosylation reaction with maltose is observed as  $\alpha$ -amylase initially splits one molecule of maltose transferring a glucosyl unit to another maltose molecule and liberating glucose with the accumulation of maltotriose and glucose in the reaction medium. The production of G4 in the reaction may be the result not only of a transglucosylation reaction from G3 and G2, but also of a condensation of two maltose molecules. Its accumulation in the reaction is rather puzzling, since MOS are presumably good substrates for hydrolysis, therefore, as



**Fig. 4.** HPLC chromatogram showing the transglucosylation products obtained from 6% (w/v) maltose concentrations at 24 h with Amy A.



**Fig. 5.** Transglucosylation reaction products observed in TLC when G3 to G7 (2%, w/v) are used as substrates. Lane 1: G3, 0 min; 2: G3, 10 min; 3: G4, 0 min; 4: G4, 10 min; 5: G5, 0 min; 6: G5, 10 min; 7: G6, 0 min; 8: G6, 10 min; 9: G7, 0 min; 10: G7, 10 min; 11: maltodextrin standard.

showed later, new linkages may form from transglucosylation reactions.

At higher maltose concentrations (15 and 30%, w/v) and shorter reaction times (10–20 min), it is even possible to observe the presence of G7 and G8, which disappear from the reaction medium at longer reaction times (data not shown). Additionally, when exploring the transfer reactions of Amy A from maltose at these high concentrations, we did not observe the expected accumulation of glucose in the reaction medium in function of time, suggesting an inhibitory effect of maltose on Amy A at high concentrations.

### 3.4. Transglucosylation reactions with G3 to G7

Fig. 5 summarizes the initial reaction product profile obtained by TLC using G3 to G7 as single substrates, demonstrating that the enzyme is also capable of using these oligosaccharides as substrates for transglucosylation at short reaction times, followed by hydrolysis. In this figure, the transglucosylation from G3 is not as clear as with the higher molecular weight substrates (G4–G7) but is appreciated by HPLC (not shown). After 48 h of reaction and once equilibrium is reached, the final products observed in all cases are glucose and maltose in a 2:1 ratio, indicating that all type of oligosaccharides formed through transglucosylation are in the long term hydrolyzed to obtain G1 and G2. When glucose is incubated with the enzyme, no condensation products are observed.

G1 and G2 in the same proportion are therefore the final products, whatever the substrate is: starch, maltodextrins or MOS.

The products obtained in the reactions already described (as well as in the alcoholysis reactions) were subjected to the action

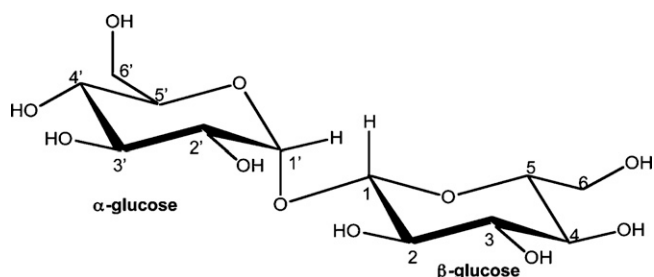


Fig. 6. Structure of neotrehalose.

of *A. niger* glucoamylase for analytical purpose. However, when products were analyzed by TLC, a disaccharide signal of unknown identity was observed. This product was separated by HPLC using a mobile phase of acetonitrile 80% (v/v). When comparing the elution time of the unknown sugar with maltose, isomaltose, nigerose, trehalose and neotrehalose used as standard, the signal seemed to correspond to neotrehalose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside), a disaccharide composed of two glucose molecules joined by a  $\alpha$ 1- $\beta$ 1 linkage, as shown in Fig. 6.

### 3.5. Identification, purification, NMR analysis and quantification of the disaccharide product

In order to corroborate that the unknown disaccharide was in fact neotrehalose, we carried out a transglucosylation reaction with Amy A and maltose (6%, w/v) with 10 U/ml of the enzyme. The compound of interest was purified by preparative HPLC as described in the previous section and analyzed by NMR. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum contained 12 signals (data not shown). In the  $^1\text{H}$  NMR spectrum, two anomeric protons were observed, one of them in orientation  $\beta$  was observed at 4.59 (1H, d,  $J=8.0$  Hz) and HSQC showed its attachment to the anomeric carbon at  $\delta$  103.06. The second anomeric proton was observed in  $\alpha$  orientation at 5.17 (1H, d,  $J=3.6$  Hz) and HSQC showed its attachment to the anomeric carbon at  $\delta$  100.36. This served as the starting point to get the spin system of both glucoses by COSY and TOCSY experiments. Once the  $^1\text{H}$  signals of both sugars had been assigned, the carbons to which each hydrogen was attached to were defined from HSQC. Based on the HMBC correlations, the bond between the sugars was determined to be ( $1' \rightarrow 1$ ) based on the long-range correlation between H-1' of the  $\alpha$ -glucose and the carbon at  $\delta$  103.06 of  $\beta$ -glucose. A second correlation was observed between H-1 of the  $\beta$ -glucose and the carbon at  $\delta$  100.36 of  $\alpha$ -glucose. From this result, it was deduced that the compound is neotrehalose. To confirm this result, we compared the isolated oligosaccharide with a neotrehalose standard by  $^1\text{H}$  NMR. The following NMR data were obtained;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\alpha$ -glucose,  $\delta$  5.17 (d, 1H,  $J=3.6$  Hz, H-1'),  $\delta$  3.54 (dd, 1H,  $J=3.6, 9.5$  Hz, H-2'),  $\delta$  3.69 (dd, 1H,  $J=8.4, 9.5$  Hz, H-3'),  $\delta$  3.89 (dd, 1H,  $J=9.5, 10.0$  Hz, H-4'),  $\delta$  3.40 (m, 1H, H-5'),  $\delta$  3.72 (m, 1H, H-6a'),  $\delta$  3.80 (m, 1H, H-6b');  $\beta$ -glucose,  $\delta$  4.59 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz, H-1),  $\delta$  3.37 (dd, 1H,  $J=8.0, 9.2$  Hz, H-2),  $\delta$  3.47 (dd, 1H,  $J=9.0, 9.2$  Hz, H-3),  $\delta$  3.43 (m, 1H, H-4),  $\delta$  3.40 (m, 1H, H-5),  $\delta$  3.72 (m, 1H, H-6a),  $\delta$  3.80 (m, 1H, H-6b);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\alpha$ -glucose,  $\delta$  100.36 (C-1'),  $\delta$  71.49 (C-2'),  $\delta$  72.85 (C-3'),  $\delta$  72.73 (C-4'),  $\delta$  69.42 (C-5'),  $\delta$  60.61 (C-6');  $\beta$ -glucose,  $\delta$  103.06 (C-1),  $\delta$  73.15 (C-2),  $\delta$  75.43 (C-3),  $\delta$  76.20 (C-4),  $\delta$  69.42 (C-5),  $\delta$  60.44 (C-6).

Once we confirmed that the disaccharide was in fact neotrehalose, we carried out a new reaction with 10 U/ml of Amy A and maltose 6% (w/v) and proceeded to its quantification by HPLC. After 48 h of reaction, neotrehalose was present in a concentration of 6.43 mg/ml, corresponding to a total reaction yield of 10% and the ratio maltose/neotrehalose turned out to be 1.42.

Table 1

Methyl-glucoside produced after Amy A reactions from starch and maltodextrins before glucoamylase digestion after 24 h of reaction.

Methanol (% v/v)	Methyl-glucoside (mg/ml) from starch (6%, w/v)	Methyl-glucoside (mg/ml) from maltodextrins (15%, w/v)
10	2.85	1.15
20	2.98	1.21
30	3.51	1.88
40	2.96	2.97
50	–	2.53

The fact that Amy A is capable of generating neotrehalose from different substrates makes this enzyme attractive given neotrehalose's high commercial value. Neotrehalose has several industrial applications due to its chemical stability, sweetness, energy-impacting ability, osmosis-regulating ability, moisture and viscosity retaining abilities, crystallization preventing ability, non-fermentability and non-cariogenicity.

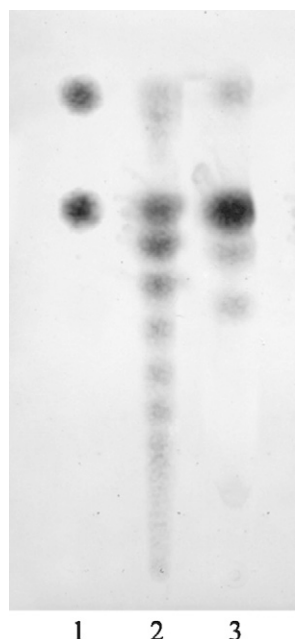
It is not the first time an  $\alpha$ -amylase is reported as a neotrehalose producer. In 1996, Shibuya et al. [28] obtained the patent of a process for the preparation of neotrehalose and its uses. Such preparation process consisted on the action of *B. subtilis* saccharifying  $\alpha$ -amylase from starch, maltodextrins and other amylaceous substances. Amy A equals the yield of neotrehalose reported by these authors (10–15%) with the advantage of a hyperthermophilic behavior, a wide substrate specificity and the possibility of coupling with a glucoamylase degradation in order to facilitate the concentration and purification of neotrehalose after the action of Amy A.

On the other hand, in spite of the previous reports, the generation of a  $\alpha$ 1- $\beta$ 1 linkage by an enzyme that carries out hydrolysis and transglucosylation reactions of substrates bearing primarily  $\alpha$ -1,4 linkages is worth mentioning. In 1996, Kato et al. published a series of papers describing a system for the production of trehalose involving two different enzymatic activities from the archaea *Sulfolobus solfataricus* KM1 [29–31]. The activity responsible for an intramolecular transglucosylation mechanism for the production of glucosyl-trehalose from a malto-oligosaccharide was that of a glycosyl transferase and the one responsible for the hydrolysis of this product to generate trehalose and the remaining oligosaccharide was assigned to an  $\alpha$ -amylase activity. In this mechanism, the enzyme captures glucose located in the reducing end of the substrate (a MOS) and then carries out a transfer reaction. For the formation of the  $\alpha$ -1,1 linkage in this case, glucose in the active site has to be distorted and accommodated so that it is the C1-OH the carbon that accepts the glycosyl moiety, resulting in a non-reducing molecule.

It is possible that the same mechanism is present in Amy A; however, the enzyme easily forms higher molecular weight products from the transfer reactions with the accumulation of glucose and maltose in the reaction medium, so that in the final steps of the reaction when enough glucose and maltose have accumulated, an intermolecular transfer for the formation of neotrehalose might take place. It is logical to suppose that accumulation of glucose favours this particular transglucosylation reaction.

### 3.6. Alcoholysis reactions with methanol

We carried out alcoholysis reactions with *T. maritima*  $\alpha$ -amylase using starch (6%) and methanol (10, 20, 30 and 40%) and analyzed them by TLC and HPLC. The production of methyl-glucoside (MG) and small amounts of methyl-maltoside were observed (Table 1). From the quantification of MG after 24 h of reaction by HPLC, we found only small differences in the quantity of free MG obtained when using methanol at 20–40% (v/v) (3.0–3.5 mg/ml before the



**Fig. 7.** TLC obtained from the alcoholysis reaction of Amy A with starch (6%) and butanol (8%) after 48 h. Lane 1: butyl-glucoside (upper stain) and glucose standards. 2: reaction products before glucoamylase action, 3: reaction products after glucoamylase action.

action of the glucoamylase). At this point, a good balance between product yield and stability of the enzyme was observed.

We also carried out alcoholysis reactions with 15% maltodextrins and (10–50%) methanol. The use of maltodextrins as substrates is attractive because of the possibility of handling much less viscous reaction medium than with starch. After 24 h and 40% methanol, it was possible to obtain almost the same amount of MG than the reaction with starch (3 mg/ml). At 50% (v/v) of methanol the enzyme loses stability. In Table 1 the methyl-glucoside concentration obtained in the reaction of Amy A from starch and maltodextrins before the glucoamylase treatment is shown.

When comparing the alcoholysis efficiency measured as the total methyl-glucoside produced from starch (6%, w/v) which includes digestion with glucoamylase, it was found that Amy A produced 7.5 mg/ml of MG, almost three times the maximum amount found for *A. niger*  $\alpha$ -amylase and almost eight times the production obtained for *A. oryzae*  $\alpha$ -amylase [9].

On the other hand, very little or no alcoholysis products were obtained when using maltodextrins as glucosyl donors with the same saccharifying  $\alpha$ -amylases mentioned, probably due to the instability of the enzymes in methanol and the lower enzyme protective effect of maltodextrins compared to starch. These results demonstrate the advantage of using Amy A for transglucosylation reactions from starch or maltodextrins over mesophilic saccharifying  $\alpha$ -amylases. Moreover, we have already accomplished the enhancement of the alcoholytic activity of Amy A acting specifically on starch [25] demonstrating that although the native enzyme is highly transglucosydic, the yield of specific products for different applications can be increased by protein engineering.

### 3.7. Alcoholysis reactions with butanol

To analyze if higher molecular weight alcohols can act as nucleophilic acceptors of Amy A in alcoholysis reactions, we carried out reactions with butanol (8%) and starch (6%). Fig. 7 is a TLC chromatogram that shows the production of butyl-glucoside (BG) after 48 h. It was found that the enzyme was capable of producing

4 mg/ml of BG, demonstrating the versatility of the enzyme in terms of acceptor alcohol molecules to generate alkyl-glycosides. The fact that Amy A is capable of generating alkyl-glycosides from alcohols with different molecular weight is extremely attractive given that these are amphiphilic compounds with surfactant properties and potential application in various kinds of industries such as foods, beverages, agriculture, cleaning, leathers, paper, textile, cosmetics and pharmaceuticals [32].

Therefore, we demonstrated that the enzyme is capable of using small oligosaccharides as substrates for glucosyl transfer as shown in the reactions where the enzyme acted on MOS (G2–G7) to generate higher molecular weight products. This is a capacity rarely seen in other saccharifying  $\alpha$ -amylases which for instance, are not capable of utilizing maltose. Amy A is a neotrehalose, a non-reducing disaccharide with interesting potential applications, forming  $\alpha$ -amylase. The enzyme was also capable of transferring glucosyl units to methanol and butanol obtaining alkyl-glucosides, molecules with surfactant properties and potential use in different industrial processes. The temperature stability of Amy A, allows alcoholysis reactions to take place in conditions where mesophilic  $\alpha$ -amylases are unstable, particularly when maltodextrins are used as substrate, as these molecules do not have the enzyme stabilizing effect observed with starch. Amy A has a high transfer capacity when compared to other saccharifying  $\alpha$ -amylases studied so far such as those from *A. niger* and *A. oryzae* as concluded from the amount of transglucosylation and alcoholysis products obtained in the same reaction conditions.

In conclusion, we demonstrated the versatility of Amy A in transglucosylation reactions and its capacity to form  $\alpha$ -1,  $\beta$ -1 linkages besides the commonly observed  $\alpha$ -1,4 bonds in  $\alpha$ -amylases.

### References

- [1] Sinnott M. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chem Rev* 1990;90:1171–202.
- [2] Nielsen J, Torben V, Borchet T. Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Biochim Biophys Acta* 2000;1543:253–74.
- [3] Van der Veen B, Uitdehaag J, Dijkstra B, Dijkhuizen L. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochim Biophys Acta* 2000;1543:336–60.
- [4] Janecek S. New conserved amino acid region of  $\alpha$ -amylases in the third loop of their ( $\beta/\alpha$ )<sub>5</sub>-barrel domains. *Biochem J* 1992;288:1069–75.
- [5] Nakajima R, Imanaka T, Aiba S. Comparison of amino acid sequences of eleven different  $\alpha$ -amylases. *Appl Microbiol Biotechnol* 1986;23:355–60.
- [6] Vihinen M, Mäntsälä P. Microbial amyolytic enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1989;24:329–418.
- [7] Janecek S. Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal  $\alpha$ -amylases. *Eur J Biochem* 1994;224:519–24.
- [8] Moreno A, Saab G, Santamaría RI, Soberón X, López-Munguía A. A more efficient starch degradation by the combination of hydrolase and transferase activities of  $\alpha$ -amylase and cyclomaltodextrin gluconotransferase. *Starch* 2004;56:63–8.
- [9] Santamaría RI, Del Río G, Saab G, Rodríguez ME, Soberón X, López-Munguía A. Alcoholysis reactions from starch with  $\alpha$ -amylases. *FEBS Lett* 1999;452:346–50.
- [10] Hart J, Kröger L, Falshaw A, Farkas E, Thiem J, Wi A. Enzyme-catalysed synthesis of galactosylated 1D- and 1L-*chiro*-inositol, 1D-pinitol, *myo*-inositol and selected derivatives using the  $\beta$ -galactosidase from the thermophile *Thermoplasma aerobacter* sp. Strain TP6-B1. *Carbohydr Res* 2004;339:1857–71.
- [11] Rabiou BA, Jay AJ, Gibson GR, Rastall RA. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidases from *Bifidobacterium* Species. *Appl Environ Microbiol* 2001;7:2526–30.
- [12] Hansson T, Kaper T, Van der Oost J, De vos W, Adlercreutz P. Improved oligosaccharide synthesis by protein engineering of  $\beta$ -glucosidase CelB from hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol Bioeng* 2001;73:203–10.
- [13] Hommalai G, Chaiyen P, Svasti J. Studies of the transglucosylation reactions of Cassava and Thai Rosewood  $\beta$ -glucosidases using 2-deoxy-2-fluoro-glycosyl-enzyme intermediates. *Arch Biochem Biophys* 2005;442:11–20.
- [14] Eneyskaya E, Ivanen D, Bobrov K, Isaeva-Ivanova L, Shabalin K, Savel'el A, et al. Biochemical and kinetic analysis of the GH3 Family  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus awamori* X-100. *Arch Biochem Biophys* 2007;457:225–34.
- [15] Graber M, Combes D. Action pattern of alpha-amylase from *Aspergillus oryzae* in concentrated media. *Biotechnol Bioeng* 1990;36:12–8.
- [16] Nishimura T, Kometani T, Takii H, Terada Y, Okada S. Purification and some properties of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* X-23 that glycosylates phenolic compounds such as hydroquinone. *J Ferm Bioeng* 1994;78:31–6.



- [17] Ohdan K, Kuriki T, Kaneko H, Shimada J, Takada T, Fujimoto Z, et al. Characteristics of two forms of  $\alpha$ -amylases and structural implication. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4652–8.
- [18] Larsson J, Svensson D, Adlercreutz P.  $\alpha$ -Amylase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *J Mol Catal B* 2005;37:84–7.
- [19] Saab-Rincón G, del Río G, Santamaría RI, López-Munguía A, Soberón X. Introducing transglycosylation activity in a liquefying  $\alpha$ -amylase. *FEBS Lett* 1999;453:100–6.
- [20] Rivera MH, López-Munguía A, Saab-Rincón G.  $\alpha$ -Amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. *Protein Eng* 2003;16:505–14.
- [21] Bibel M, Brettl C, Gossler U, Kriegshauser G, Liebl W. Isolation and analysis of genes for amylolytic enzymes of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiol Lett* 1998;158:9–15.
- [22] Chhabra S, Shockley K, Ward C, Kelly R. Regulation of endo-acting hydrolases in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* grown on glucan- and mannan-based polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:545–54.
- [23] Reeves R, Gibbs M, Morris D, Griffiths K, Saul D, Bergquist P. Sequencing and expression of additional xylanase genes from hyperthermophile *Thermotoga maritima* FjSS3B.1. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:1532–7.
- [24] Liebl W, Stemplinger I, Ruile P. Properties and gene structure of the *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -amylase Amy A, a putative lipoprotein of a hyperthermophilic bacterium. *J Bacteriol* 1997;179:941–8.
- [25] Damián-Almazo JY, Moreno A, López-Munguía A, Soberón X, González-Muñoz F, Saab-Rincón G. Enhancement of the alcoholytic activity of  $\alpha$ -amylase Amy A from *Thermotoga maritima* MSB8 (DSM 3109) by site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:5168–77.
- [26] Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal UL. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [27] Suganuma T, Ohnishi M, Hiromi K, Nagahama T. Elucidation of the subsite structure of bacterial saccharifying  $\alpha$ -amylase and its mode of degradation of maltose. *Carbohydr Res* 1996;282:171–80.
- [28] Shibuya T, Chaen H, Sakai S, Miyake T. Process for preparing neotrehalose, and its uses. Assignee: Kabushiki K, Hayashibara S, Kagaku K. United States Patent 5,578,469; 1996.
- [29] Kato M, Miura Y, Kettoku M, Shindo K, Iwamatsu A, Kobayashi K. Purification and characterization of new trehalose-producing enzymes isolated from the hyperthermophilic archaea, *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60:546–50.
- [30] Kato M, Miura Y, Kettoku M, Shindo K, Iwamatsu A, Kobayashi K. Reaction mechanism of a new glycosyltrehalose-producing enzyme isolated from the hyperthermophilic archaeum, *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60:921–4.
- [31] Kato M, Miura Y, Kettoku M, Shindo K, Iwamatsu A, Kobayashi K. Reaction mechanism of a new glycosyltrehalose-hydrolyzing enzyme isolated from the hyperthermophilic archaeum, *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Biosci Biotechnol Biochem* 1996;60:925–8.
- [32] Fiechter A. Biosurfactants: moving towards industrial application. *TIBTECH* 1992;10:208–17.