



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**DETERMINANTES DE LAS ACTIVIDADES HIDROLÍTICAS Y
TRANSGLICOSÍDICAS EN ENZIMAS DE LA FAMILIA DE LAS GLICOSIL
HIDROLASAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

ALEXEY LLOPIZ ARZUAGA

**Dra. GLORIA SAAB RINCÓN
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dr. AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

**Dr. GABRIEL DEL RÍO GUERRA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

Ciudad de México. Octubre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este proyecto de investigación se realizó en el Departamento de Ingeniería celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Gloria Saab Rincón. El programa de estudio corresponde al posgrado de Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

El comité tutorial estuvo conformado por:

Dra. Gloria Saab Rincón

Dr. Agustín López Munguía Canales

Dr. Gabriel del Rio Guerra

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Presidente: Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella

Secretario: Dr. Enrique Rudiño Piñera

Vocal: Dra. Lilian González Segura

Vocal: Dra. Romina Rodríguez Sanoja

Vocal: Dra. Alejandra Hernández Santoyo

Durante el desarrollo de la Tesis recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No de registro 958307). Igualmente recibí apoyos de proyectos de PAPIIT (IN226623) para la realización de este trabajo de investigación.

A mis padres y familia

Agradecimientos

A mi tutora la Dra. Gloria Saab por darme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio y por todas las cosas aprendidas durante este tiempo.

Muchas gracias a los Dres. Gabriel del Río Guerra (Departamento de Bioquímica y Biología estructural, Instituto de Fisiología, UNAM) y Agustín López-Munguía (Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM) por haber formado parte de mi comité tutorial. A todos los miembros del laboratorio, M.C. Jorge Luis Jimenez, Emma Arévalo, Rodrigo Arreola, Miguel Angel Davila, Ekaterina Jalomo, Fidel Ramirez, Jesús Manuel López, Francisco, Francisco Maya, Jossahandy, Leonardo, la Dra. Wendy Xolalpa, Dr. Humberto Flores y Dr. Xavier Soberón. A Dra. Kathy Juárez y Dr. José Alberto Hernández y a los miembros de su grupo de investigación.

A Dr. Lorenzo Segovia y Dr. Alejandro García-Rubio (Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM), a MSc Karel Estrada y MSc Jerome Verleyen (Unidad de Secuencia Masiva y Bioinformática), Juan Manuel Hurtado Ramírez, David Castañeda (Unidad de Cómputo Instituto de Biotecnología, UNAM), MSc. Pavel Andrei Montero y Dr. Gerardo Corzo (Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM) por su ayuda en el uso de recursos computacionales durante el doctorado, así como por la Discusión de distintos temas relacionados con el trabajo realizado durante este tiempo. A Jorge Arturo Yañez (Unidad de Síntesis y Secuenciación de Oligonucleótidos del IBT), y a Shirley Ainsworth y Omar Arriaga, por sus asistencia en temas de bibliotecología.

Un agradecimiento muy especial al estudiante de doctorado MSc. Marco Ramírez y a su tutora, la Dra. Carmen Nina Pastor (Centro de Investigación en Dinámica Celular, IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México) por su invaluable apoyo en las simulaciones moleculares, así como el análisis y comprensión de los fenómenos relacionados con el trabajo presentado en esta tesis.

A mis esposa Ivonne Ramirez muchas gracias por haberme comprendido y apoyado en todo este periodo. A mis padres Carlos y Magdalena, y a mis hermanos Arquímedes, Isabel y Gustavo, y a toda mi familia.

Abreviaturas

3D	estructura tridimensional
CA	cicloalternano
CBM	módulos de unión a carbohidratos
CD	dicroísmo circular
cGMP	glicomacropéptido de caseína
DM	dinámica molecular
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNS	ácido dinitrosalicílico
GBE	enzima ramificadora de glucógeno
GEI	intermediario glicosil-enzima
GH	glicosil hidrolasa
H/T	relación de hidrólisis y transglicosilación
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
K_m	constante de Michaelis-Menten
LB	Luria-Bertani
MSA	alineamientos múltiples de secuencia
MU-gal	4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

PDB	Banco de datos de estructuras de proteínas
QM/MM	mecánica cuántica/mecánica molecular
RMSD	desviación cuadrática media
RMSF	fluctuación cuadrática media
SDS	dodecilsulfato sódico
<i>Tm</i> GTasa	4- α -glucanotransferasa de <i>Thermotoga maritima</i>
V_{max}	velocidad máxima
WT	silvestre
Δf_{aa}	factor de enriquecimiento

Índice general

Índice de figuras.....	VIII
Índice de tablas.....	XV
Resumen.....	XVI
Abstract.....	XVIII
1. Introducción	1
1.1 Estructura de las glicosil hidrolasas de la familia GH 13.....	1
1.2 Aplicaciones de las glicosil hidrolasas	3
1.3 Mecanismo de reacción de las glicosil hidrolasas de la familia 13.....	3
1.4 ¿Cómo modificar las especificidades de reacción?	6
1.5 Las asas cercanas a la cavidad catalítica como determinantes de la especificidad de reacción	9
1.6 La 4-α-glucanotransferasa de <i>Thermotoga maritima</i> es una enzima modelo para la reacción de transglicosilación	11
1.7 Métodos para medir las reacciones catalizadas por las GH.....	12
2. Planteamiento del problema	14
3. Hipótesis.....	15
4. Objetivo General.....	15
5. Objetivos específicos	15
6. Materiales y métodos	15
6.1 Construcción de las mutantes de <i>TmGTasa</i>	15
6.2 Evaluación de la actividad transglicosídica	17
6.3 Expresión y purificación de las proteínas	18
6.4 Determinación de parámetros cinéticos	18
6.5 Ensayos de hidrólisis.....	19
6.6 Determinación de los valores de pKa de los residuos catalíticos.....	20
6.7 Dicroísmo circular	21
6.8 Simulaciones por dinámica molecular	21
7. Resultados.....	23
7.1 Mutantes de la <i>TmGTasa</i>	23
7.2 Construcción de las mutantes	28
7.3 Cambios de la especificidad de reacción en la <i>TmGTasa</i> por cambios en el dominio B	33
7.4 Cambios estructurales asociados con las mutaciones en el dominio B de la <i>TmGTasa</i>	34
7.5 Simulación por dinámica molecular.....	37
7.6 El asa más larga del dominio B funciona como una tapa del sitio activo.....	39

7.7	Perfiles de actividad a diferentes pH para las mutantes del dominio B.....	40
7.8	Dinámica de los residuos del sitio activo para las mutantes del dominio B.....	43
7.9	Cambios de actividad producto de las mutaciones en el dominio A de la <i>TmGTasa</i>	46
7.10	Determinación de la actividad en preparaciones purificadas de las enzimas obtenidas por modificación del dominio A.....	49
7.11	Cambios estructurales asociados con las mutaciones en el dominio A de la <i>TmGTasa</i>	51
7.12	Dinámica de los residuos del sitio activo para las mutantes del dominio A.....	54
8.	Discusión	58
9.	Conclusiones	68
10.	Perspectivas	68
11.	Referencias.....	68
12.	Publicación principal.....	80
13.	Otras publicaciones.....	81
14.	Anexos	83
	Anexo 1.....	83
	Anexo 2.....	84
	Anexo 3.....	85
	Anexo 4.....	86
	Anexo 5.....	86

Índice de figuras

Figura 1. Mapa topológico de los elementos de estructura secundaria (panel izquierdo) y la estructura tridimensional (panel derecho) de la *TmGTasa* (PDB ID 1LWJ), los que son representativos de la familia GH 13. Las α -hélices están representadas como cilindros y las hojas beta como flechas. Dominio A: verde y azul; dominio B: rojo y anaranjado; Dominio C: púrpura. Los sitios de modificación del dominio B están representados con una estrella (W131G) y un rectángulo (deleción) magentas, y los del dominio A con un rombo (S275G/W) y un círculo azul (Q5E). Los residuos catalíticos se presentan con un cuadrado (D186) y círculo (E216) púrpuras.

Figura 2. Mecanismo de reacción general para las glicosil hidrolasas de la familia GH13. La reacción se inicia por la activación del grupo glicosídico debido a la catálisis del residuo ácido-base de la enzima, lo que posibilita el ataque del nucleófilo al carbono anomérico en una reacción que se ha propuesto que puede implicar un mecanismo Sn2 o Sn1 en este paso se produce un intermediario covalente con la enzima (GEI). Posteriormente ocurre el ataque de un nucleófilo externo denominado aceptor que puede ser el agua (hidrólisis) u otro nucleófilo aceptor (transglicosilación), con lo que se regenera la enzima para otro ciclo catalítico.

Figura 3. Configuración esquemática del sitio activo de las glicosil hidrolasas.

Figura 4. Estructura de la enzima ramificadora de glucógeno (GBE) de *Thermococcus kodakarensis* (PDB ID 3N8T) perteneciente a la familia GH 57. Los residuos catalíticos (nucleófilo y ácido-base) se presentan en color anaranjado. El asa alargada y flexible con una Tyr en la punta se muestra en color azul.

Figura 5. Ecuación química de la reacción usada en la determinación de azúcares reductores por el método del DNS. (I) ácido 3,5-dinitrosalicílico, (II) D-glucosa, (III) ácido D-glucónico, (IV) ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.

Figura 6. Estrategias generales para la identificación de residuos relacionados con la especificidad de reacción en enzimas de la familia GH 13.

Figura 7. Valores de RMSD por residuos obtenidos del alineamiento estructural entre los Ca de la *TmGTasa* (PDB ID 1LWJ) y la AmyS de *T. petrophila* (PDB ID 5m99); el cálculo se realizó con el programa Coot (panel izquierdo). Estructura de la *TmGTasa* coloreada en función

de los valores de RMSD desde 0 Å (rojo) hasta 5 Å (azul); las regiones mostradas en amarillo no tuvieron equivalente en la estructura de la AmyS de *T. petrophila* (panel derecho).

Figura 8. Panel central: superposición estructural de la *TmGTasa* (PDB ID 1LWJ, verde) con la AmyS (PDB ID 5M99, gris). Panel izquierdo: modificaciones del dominio A en las posiciones 5 y 275 (azul) propuestas en función de los factores de enriquecimiento. En líneas punteadas se muestra la distancia (en Å) de estos residuos a los que conforman el sitio activo, el cual está delimitado por la acarbosa (amarilla) y por los residuos catalíticos (magenta). Panel derecho: región del asa protuberante del dominio B que se va a recortar que contiene el residuo W131 en su punta, el cual interacciona con la acarbosa junto con el W218. El lazo equivalente en AmyS se indica con una flecha roja, así como los residuos equivalentes a los Trp131 y 218.

Figura 9. Alineamiento múltiple de secuencia (MSA) de la *TmGTasa* con enzimas hidrolíticas (panel superior) y con enzimas transglicosídicas (panel inferior). Este grupo de enzimas fueron las mismas usadas para el análisis de la conservación de los contactos (Arreola-Barroso et al., 2021).

Figura 10. Vector pET22b(+)_AmyA usado para la clonación del gen de interés luego de la digestión con las enzimas de restricción correspondientes. (a) mapa del vector representado con el programa Snap Gene. (b) Purificación de pET22-AmyA para obtener el vector luego de la digestión con enzimas de restricción. Carril 1: lote 1 del vector purificado, 350 ng; carril 2: lote 2 del vector purificado, 350 ng; carril 3: marcador de masa molecular (1 kb DNA Ladder, Maestrogen Inc., Taiwán).

Figura 11. Electroforesis en geles de agarosa de la construcción de la variante W131G de la GTasa de *T. maritima*. (a) amplificación por PCR de los fragmentos 1 (F1) y 2 (F2) del gen. Carril 1: fragmento F1; carril 2: fragmento F2; carril 3: control negativo; carril 4: marcador de masa molecular. (b) Análisis del PCR de ensamblado de los fragmentos F1 y F2. carril 1: gen de la GTasa con la mutación W131G; carril 2: control negativo; carril 3: marcador de masa molecular. (c) Chequeo de la variante W131G-pET22b(+). Carril 1: plásmido purificado; carril 2: marcador de masa molecular.

Figura 12. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de las PCR de colonia correspondientes a siete colonias de la mutante W131G de la *TmGTasa*. (a) El templado fue obtenido directamente de las colonias y los oligonucleótidos usados fueron los

correspondientes a la región N-terminal y al T7 Rev. Carriles 1-7: colonias 1-7; carril 8: control positivo; carril 9: control negativo; carril 10: marcador de masa molecular. El número de pares de bases esperado para el amplicón es de 1440 bp. **(b)** Los vectores de la construcción de W131G fueron usados como templado. Los oligonucleótidos usados fueron los T7 Forw y Rev. Carril 1-3: productos de amplificación de las colonias 1-3; carril 4: control positivo; carril 5: control negativo; carril 6: marcador de masa molecular.

Figura 13. Electroforesis en geles de agarosa de los PCR para la obtención de los fragmentos (panel A) y del gen de la *TmGTasa* para la mutante con el asa 130s acortada (panel B). **(a)** carril 1, fragmento F1 de la *TmGTasa*, carril 2, fragmento F2 de la *TmGTasa*, carril 5, marcador de masa molecular. **(b)** carril 1, producto de la extensión por PCR de los fragmentos F1 y F2, carril 2, control positivo de amplificación con el vector pET2b(+)-*TmGTasa* como templado, carril 3, control negativo, carril 5, marcador de masa molecular.

Figura 14. Análisis de los PCR de los plásmidos correspondientes a las colonias la_1 y la_2 (construcción con el acortamiento del asa del dominio B) para la *TmGTasa* usando un oligonucleótido del N-terminal y otro interno. Carril 1: colonia la_1; carril 2: colonia la_2; carril 3: control positivo; carril 4: control negativo; carril 5: marcador de masa molecular.

Figura 15. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa del inserto de la región 2 sin purificar (carril 1) y purificado (carril 2). Carril 3: marcador de masa molecular de 1 kb.

Figura 16. Obtención de colonias con el plásmido que contiene las mutaciones en las posiciones 5 y 275 de la GTasa. **(a)** colonias obtenidas por la transformación con la ligación de R2-pET22b(+) (100 μ L) en *E. coli* MC1061. **(b)** PCR con los oligonucleótidos T7 Forward y Reverse de cuatro plásmidos escogidos al azar.

Figura 17. Ajuste de Michaelis-Menten para la reacción de transglicosilación de las variantes de *TmGTasa* en las que se mantuvo constante la concentración de almidón (0.93 %) y se varió la de maltosa. **(a)** WT (círculos rojos), W131G (cuadrados verdes), asa truncada (rombos azules), **(b)** ampliación de los gráficos para la mutante sencilla W131G y la variante con el asa recortada.

Figura 18. Caracterización estructural de las variantes de la *TmGTasa*. **(a)** espectro de CD para las especies de la *TmGTasa*. WT (roja), W131G (verde), y asa 130s recortada (azul) **(b)** análisis

por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de las proteínas purificadas. carril 1: marcador de masa molecular, carril 2: WT, carril 3: W131G y carril 4: variante asa 130s recortada. En cada uno de los casos se aplicaron 1.6 μ g de proteína.

Figura 19. Relación entre el masa molar (MW) y la movilidad (Rf) de las proteínas en un sistema de electroforesis en condiciones desnaturizantes.

Figura 20. Análisis densitométrico con el programa Image Lab del carril 3 de la Figura 18.

Figura 21. Determinación de la actividad enzimática de las variantes WT (rojo), W131G (verde) y del asa 130s acortada (azul) de la *TmGTasa* luego de diferentes tiempos de incubación a 70 °C.

Figura 22. Ajuste a un modelo cinético de primer orden de los valores de actividad enzimática de las variantes WT (rojo), W131G (verde) y del asa 130s acortada (azul) de la *TmGTasa* luego de diferentes tiempos de incubación a 70 °C.

Figura 23. (a) Distribución de los valores de RMSD de la proteína WT (rojo), W131G (verde), y del asa 130s recortada (azul), **(b)** estructuras representativas de los agrupamientos que contienen al menos al 98 % de la población conformacional para la WT (rojo), W131G (verde) y asa 130s recortada (azul; las zonas más lábiles de esta estructura se muestran en color rojo).

Figura 24. Fluctuación de la *TmGTasa* en intervalos de 100 ps de la simulación de 400 ns. Valores de RMSF para la WT **(a)**, W131G **(b)**, y asa 130s recortada **(c)**. En el lado derecho de cada una de las gráficas se muestran las representaciones estructurales basadas en los valores de RMSF para cada una de las formas de las proteínas. La superposición de la acarbosa (color cian) desde la estructura cristalográfica (PDB ID 1LWJ) delimita el sitio activo de estas variantes de la enzima. Todas las estructuras están coloreadas desde el N-terminal (rojo) al centro (verde) y terminando el C-terminal (azul).

Figura 25. Cambios conformaciones en las variantes de la *TmGTasa*. **(a)** estructura original del PDB 1LWJ **(b)** interacciones fundamentales en la proteína WT resultando en una conformación cerrada **(c)** Interacciones en la WT que resultan en una conformación abierta **(d)** mutante con el asa 130s recortada pierde la interacciones principales y culmina en el asa 130s desordenada **(e)** Interacción en la mutante W131G que permiten la obtención de una

conformación cerrada (f) la variante W131G pierde las interacciones presentes en la WT produciendo una conformación con mayor apertura.

Figura 26. Histograma de las distancias entre los carbonos alfa de los residuos 131 y 324 para la *TmGTasa* WT (rojo) y W131G (verde).

Figura 27. Dependencia del pH de la actividad transglucosídica de la *TmGTasa* WT (círculos rojos) y W131G (círculos verdes) ajustadas a dos valores de pKa ((a) y (c)) y a tres valores de pKa ((b) y (d))

Figura 28. Perfiles de actividad a diferentes pH para las variantes de la *TmGTasa*. (a) WT, (b) W131 G, y (c) asa 130s recortada. Los datos son presentados con el error correspondiente a una desviación estándar. Los valores obtenidos fueron ajustados a las ecuaciones 6 para las dos primeras y 4 para la variante del asa 130s recortada. Los paneles inferiores muestran los valores residuales de los valores experimentales y los obtenidos por el modelo ajustado.

Figura 29. Cambios en los valores de pKa a lo largo de la simulación DM. Distribución de los valores de pKa para los residuos (a) D186, (b) E216, para la especie WT (roja), W131G (verde), y del asa 130s recortada (azul). Estructuras representativas de la distribución del D186 con valores de pKa = 3.00 (c) y 10.00 (d) en la proteína WT. Las distancias entre átomos están representadas en líneas discontinuas.

Figura 30. Cambios en los valores de pKa a lo largo de la simulación DM (a) Distribución de los valores de pKa para los residuos H93 y (b) H94 para la especie WT (roja), W131G (verde), y del asa 130s recortada (azul) (c, d) Estructuras representativas de la distribución para la variante del asa 130s recortada para la H93 con valores de pKa = 4.00 y 6.50, respectivamente. Las distancias están representadas en líneas discontinuas.

Figura 31. Relación entre las especificidades hacia las reacciones de hidrólisis y transglucosilación de las variantes de la *TmGTasa* obtenidas por mutación en los residuos aminoacídicos Q5 y S275. El punto (1;1) corresponde a la enzima silvestre (WT). La actividad transglucosídica está medida como el cambio de absorbancia a 620 nm que experimenta el complejo del almidón y el Lugol luego de 15 min de reacción. La actividad hidrolítica fue medida en función de la cantidad de azúcares reductores a partir de la hidrólisis de almidón.

Figura 32. Actividad hidrolítica sobre el almidón 1 % de las variantes 43 (Q5E/S275G) y 57 (Q5E/S275W) purificadas por IMAC.

Figura 33. Curva de Michaelis-Menten para las variantes del dominio catalítico de la *TmGTasa* manteniendo constante la concentración de almidón (0.93 %) y variando la concentración de maltosa. (a) Q5E/S275G, $K_m=3.75\pm 0.89$ mM; $V_{max}=0.213\pm 0.009$ UA/min. (b) Q5E/S275W.

Figura 34. Estabilidad a 70 °C de las variantes de la *TmGTasa* en el dominio A. Q5ES275G (marrón), Q5ES275W (morado).

Figura 35. Ajuste a un modelo cinético de primer orden de los datos de estabilidad a 70 °C de las variantes de la *TmGTasa* en el dominio A. Q5ES275G (marrón), Q5ES275W (morado).

Figura 36. (a) Distribución de los valores de RMSD de la proteína WT (rojo), Q5E/S275W (morado), y Q5E/S275G (ocre), (b) estructuras representativas de los agrupamientos que contienen al menos al 99 % de la población conformacional para la Q5E/S275W (morado), Q5E/S275G (ocre).

Figura 37. Fluctuación de las variantes del dominio A de la *TmGTasa* en intervalos de 100 ps. Valores de RMSF para la variante WT (a) Q5E/S275G (b) y Q5E/S275GW (c). En los paneles derechos se muestran las representaciones estructurales basadas en los valores de RMSF para cada una de las dos variantes. Todas las estructuras están coloreadas desde el N-terminal (rojo) al centro (verde) y terminando el C-terminal (azul).

Figura 38. Histograma de las distancias entre los carbonos alfa de los residuos 131 y 324 para la *TmGTasa* WT (rojo), Q5E/S275W (morado) y Q5E/S275G (marrón).

Figura 39. Cambios en los valores de pKa a lo largo de la simulación DM (a) Distribución de los valores de pKa para los residuos D186, (b) E216, para las especies WT (rojo), Q5E/S275W (morado), Q5E/S275G (marrón).

Figura 40. (a) Estructura representativa de la distribución del D186 con valores de pKa = 2.20 para la variante Q5E/S275W. (b) Estructura representativa de la distribución del D186 con valores de pKa = 3.20 para la variante Q5E/S275G. (c) Estructura representativa de la distribución del D186 con valores de pKa = 11.00 para la variante Q5E/S275W. (d) Estructura representativa de la distribución del D186 con valores de pKa = 11.00 para la variante

Q5E/S275G. Las estructuras del panel superior corresponden con conformaciones catalíticamente competentes de acuerdo con los valores de los pKa de los residuos catalíticos. Las distancias entre los átomos correspondientes están representadas en líneas discontinuas.

Figura 41. Cambios en los valores de pKa del residuo H93 a lo largo de la simulación DM (a) Distribución de los valores de pKa, (b) Estructuras representativas de la disposición de los residuos catalíticos en conformaciones que pueden resultar catalíticamente relevantes para las especies WT (rojo), Q5E/S275W (morado), Q5E/S275G (marrón).

Figura 42. Distribución de los valores de pKa del residuo H94 a lo largo de la simulación DM para las variantes WT (rojo), Q5E/S275W (morado), Q5E/S275G (marrón).

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para las mutagénesis sitio-dirigidas de la *TmGTasa*.

Tabla 2. Parámetros enzimáticos para la reacción de transglicosilación y de hidrólisis de las variantes de la *TmGTasa*. Los valores son representados como promedio \pm desviación estándar resultado de tres réplicas experimentales. H representa a la reacción de hidrólisis y T la de transglicosilación.

Tabla 3. Valores de pKa de los residuos catalíticos de las variantes de la *TmGTasa* determinados por el ajuste de los perfiles de actividad vs pH a diferentes modelos matemáticos definidos en las Eqs. 4-6. Los valores de pKa en los extremos ácido y básico corresponden a los residuos nucleófilo (D186) y ácido/base (E216), respectivamente.

Tabla 4. Clasificación de las variantes obtenidas en la región 2 (posición 5 y 275) de la *TmGTasa* en función de sus actividades hidrolítica y transglicosídica relativas a la forma WT. *corresponden a la especie silvestre de la proteína. †También se detectó la señal correspondiente a S275.

Resumen

Las glicosil hidrolasas (GH) catalizan la ruptura de enlaces α -glicosídicos en polisacáridos como el almidón y el glucógeno. Estas enzimas participan tanto en reacciones de hidrólisis como de transglicosilación, pero en la actualidad no se comprenden completamente los factores asociados a que se favorezca una u otra reacción, debido a la complejidad de este fenómeno. En este trabajo proponemos dos estrategias basadas en la comparación de las estructuras de enzimas con preferencia hacia una reacción o la otra para tratar de comprender algunos de los determinantes estructurales asociados con la especificidad de reacción. La enzima modelo usada fue la 4- α -glucanotransferasa de *Thermotoga maritima* (*TmGTasa*), una enzima básicamente transglicosídica. En la primera estrategia se comparó la estructura 3D de esta GH con una amilasa hidrolítica de *Thermotoga petrophila* (*AmyS*). Este análisis permitió encontrar un asa protuberante que se extiende desde el dominio B solo en la enzima transglicosídica, y que posiciona a un residuo de W sobre el subsitio +2 del sitio activo. Basado en esta diferencia estructural se construyeron dos variantes, la W131G y otra en la que se acortó el asa protuberante del dominio B de la *TmGTasa* (120-124/128-131). Estas dos variantes tuvieron un incremento de la relación de hidrólisis/transglicosilación (H/T) de alrededor de 11 veces respecto a la forma silvestre (WT) de la *TmGTasa*. En una segunda estrategia se compararon estructuras de enzimas principalmente hidrolíticas con enzimas principalmente transglicosídicas y se consideró el enriquecimiento de residuos que se encuentran en contactos en la estructura 3D, el cual fue computado como factores de enriquecimientos (Δf_{aa}) para ambas actividades. Este análisis permitió la identificación de muchas posiciones a mutagenizar. En el presente estudio se seleccionaron dos de estas posiciones, la Q5E (cambio de Δf_{aa} desde +0.45 hasta -0.17) y la S275G (cambio de Δf_{aa} cambia desde +0.005 hasta -0.12). Las mutaciones se construyeron para poder explorar los aminoácidos con mayor factor de enriquecimiento, así como el aminoácido original, lo que generó una librería conformada por ocho variantes. En un tamizaje de alta eficiencia se observó que todas las variantes tenían una mejor relación H/T, en su mayoría por pérdida en actividad transglicosídica. Sin embargo, se identificó como la mejor variante a la doble mutante que tuvo un W en la posición 275 y el cambio Q5E, la cual tuvo una disminución de la transglicosilación de dos órdenes de magnitud unido a un incremento de alrededor de 4 veces en la capacidad de hidrólisis relativo a la variante WT. Esto muestra que el método es capaz de predecir posiciones que son relevantes para determinar la especificidad de función. Las simulaciones por dinámica molecular permitieron proponer un modelo para

explicar el cambio en la especificidad de reacción relacionado con las mutaciones tanto en el dominio B como en la variante construida a partir de factores de enriquecimiento.

Abstract

Glycoside hydrolases (GH) catalyze the rupture of α -glycosidic bonds located in polysaccharides such as starch and glycogen. These enzymes take place in both hydrolysis and transglycosylation reactions. Nevertheless, due to the complexity of the phenomena, to date are unknown the factors that favor one or another reaction. In this work we propose two strategies based on the comparison of the enzymes with preferences through hydrolysis or transglycosylation to understand the structural determinants linked to reaction specificity. The model enzyme is the 4- α -glucanotransferase isolated from *Thermotoga maritima* (*TmGTasa*), a mainly transglycosidic enzyme. The first strategy implied the comparison of the *TmGTasa*'s structure with the corresponding of a hydrolytic glycosidase, the *AmyS* from *Thermotoga petrophila*. The above resulted in the identification of a protruding loop with a Trp residue in the tip only in the transglycosidic enzyme; this loop is extended from domain B and complements the active site positioning an aromatic residue in the subsite +2. Based on this difference two variants of *TmGTasa* were constructed, a single mutant W131G, and a truncated loop that comprises the residues 120-124/128-131. Both variants with modified domain B had an increased hydrolysis/transglycosylation (H/T) around 11-fold relative to the wild type (WT) protein. The second approach implied the computation of enrichment of residues which are in contact in 3D structures in two subgroups conformed by either hydrolytic or transglycosidic enzymes. The values obtained were expressed as enrichment factor (Δf_{aa}). Based on this analysis was selected a library comprising eight variants that combine all options for Q5E (Δf_{aa} change from +0.45 to -0.17) and S275G (Δf_{aa} changed from +0.005 to -0.12). All variants had a H/T higher than WT protein but the mutant Q5E/S275W was associated with a two-order reduction in transglycosylation together with an increase of 4-fold of hydrolysis capacity relative to WT. The above shows the potential of the algorithm based on enrichment of 3D contact to predict the positions related to reaction specificity. Molecular dynamics (MD) simulation helps to propose a model to explain the reaction specificity changes related to mutations in both evaluated domains of *TmGTasa*.

1. Introducción

1.1 Estructura de las glicosil hidrolasas de la familia GH 13

Las glicosil hidrolasas (GH) catalizan la hidrólisis y/o el reordenamiento de los enlaces glicosídicos en varios azúcares, como el almidón y el glucógeno, polisacáridos que funcionan como reservorios de energía en las células. Entre los productos de estas enzimas se encuentran las dextrinas y los oligosacáridos. En la actualidad existen 174 familias en CAzy (<http://www.cazy.org/>) las que son clasificadas en concordancia con sus estructuras y especificidades. Incluso muchas de estas familias son divididas, tal como ocurre con la GH_13 que está conformada por 46 subfamilias. Igualmente, muchas de estas familias están agrupadas en 18 clanes (A-R), en los que se comparten diferentes plegamientos tales como β -propela (GH-B y C), β -propela-6 (GH-E), β -propela-5 (GH-J), $(\alpha/\alpha)_6$ (GH-G, L, M, O-Q), y el barril $(\beta/\alpha)_8$ (GH-A, D, H, K y R). Las glicosil hidrolasas son enzimas de especial interés debido a su amplia distribución en varios reinos de la vida como bacteria, archaea, fungi, plantae, y animalia (Da Lage et al., 2004; Egorova et al., 2021); en estos organismos forman parte de distintas vías metabólicas que son esenciales para su mantenimiento.

En el caso particular de las α -amilasas, estas son enzimas que pertenecen a diferentes familias de las glicosil hidrolasas (GH_13, 57 y 119). Estas GH por lo general son clasificadas dentro del mismo grupo con independencia de la especificidad de sustrato, como se sugiere en la clasificación propuesta por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB). Por el contrario, los elementos que se consideran son su estructura tridimensional y el mecanismo por el cual se produce la reacción (Kuriki & Imanaka, 1999). De tal manera, las α -amilasas han sido definidas en función de cuatro criterios: (1) que actúen sobre enlaces α -glicosídicos, (2) sus productos de hidrólisis o transglicosilación deben producir α -anómeros, (3) tienen cuatro regiones altamente conservadas -las que pueden llegar a siete (Heinrich et al., 1994; Janeček et al., 2014)- en su secuencia aminoacídica, (4) tienen una triada catalítica formada por D, E y D equivalentes a los D206, E230 y D297 de la TAKA amilasa (Kuriki & Imanaka, 1999; Nakajima et al., 1986). Estos residuos ácidos del sitio activo, al igual que otros que se localizan en su vecindad, se encuentran altamente conservados en la estructura de las glicosidasas (Heinrich et al., 1994). En especial las que conforman la familia GH_13, comparten tres dominios estructurales: (1) un dominio central A, que forma un barril $(\beta/\alpha)_8$, (2) un dominio B, que interrumpe al dominio A después de la tercera hebra beta, y (3) un dominio C (región C-terminal), el cual está conformado fundamentalmente por hebras beta

(Hwang et al., 1997; Swift et al., 1991) (Figura 1). Algunas de estas enzimas (EC 3.2.1.1) catalizan la hidrólisis de enlaces α -D-glicosídicos del almidón y otros azúcares semejantes, pero otras denominadas glucanotransferasas (EC 2.4.1.19), transfieren un segmento α -D-glucano a otro carbohidrato aceptor. Sin embargo, en las transformaciones catalizadas por varias glicosil hidrolasas, ambas reacciones pueden competir entre sí, y la extensión en la que ocurre depende de la naturaleza de cada enzima (L. T. Tran et al., 2019).

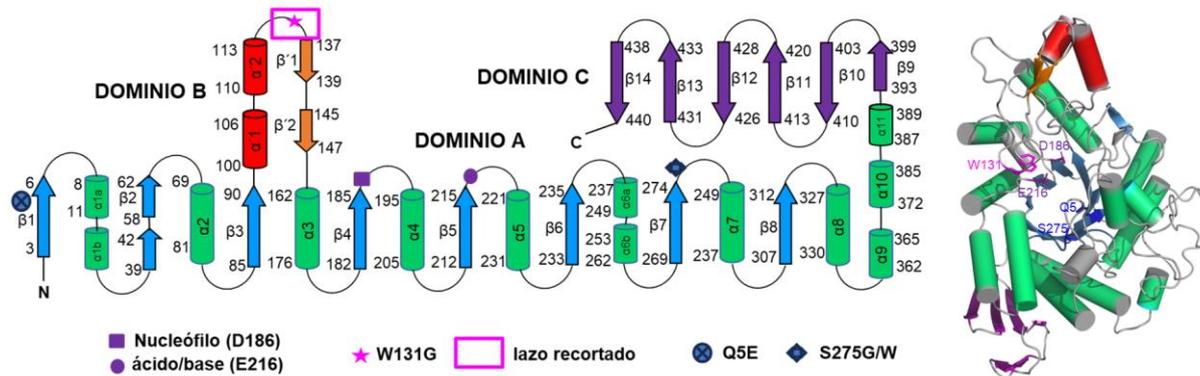


Figura 1. Mapa topológico de los elementos de estructura secundaria (panel izquierdo) y la estructura tridimensional (panel derecho) de la *TmGTasa* (PDB ID 1LWJ), los que son representativos de la familia GH 13. Las α -hélices están representadas como cilindros y las hojas beta como flechas. Dominio A: verde y azul; dominio B: rojo y anaranjado; Dominio C: púrpura. Los sitios de modificación del dominio B están representados con una estrella (W131G) y un rectángulo (delección) magentas, y los del dominio A con un rombo (S275G/W) y un círculo azul (Q5E). Los residuos catalíticos se presentan con un cuadrado (D186) y círculo (E216) púrpuras.

Las enzimas que componen la familia GH 13 se caracterizan por tener no solo diferentes especificidades de sustrato sino también de reacción; una de estas reacciones es la de hidrólisis, en la que el agua actúa como aceptor del carbohidrato que forma el complejo covalente con el residuo nucleofílico de la enzima, aunque el aceptor también puede ser otra molécula, siendo en estos casos la reacción de transglicosilación. En la gran mayoría de los casos una de las actividades o la global es la que se reporta, pero la otra actividad puede estar presente en mayor o menor medida. Se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales estas estructuras se inclinan a favorecer la hidrólisis o la transglicosilación. Sin embargo, debido a la complejidad de este fenómeno existen pocas estrategias generales que permitan el reconocimiento de los elementos estructurales que se asocian con la especificidad de reacción en las diferentes familias de GH de CAZy.

1.2 Aplicaciones de las glicosil hidrolasas

Las GHs son enzimas que tienen aplicaciones en diferentes ramas, tales como la industria alimenticia, de textiles, de detergentes, del papel (Cabrera & Blamey, 2018; Mehta & Satyanarayana, 2016; Vafina et al., 2018), en la síntesis enzimática (Dutt & Tyagi, 2021; Rivas et al., 2013; Wu et al., 2021; Xu et al., 2016), en la industria biofarmacéutica (Anisha, 2023; Feng et al., 2017; Ostapska et al., 2021; Rivas et al., 2013), y en la producción de bioetanol (Bahena-Molina et al., 2022; Beltagy et al., 2022). En especial las glicosidasas de organismos (hiper)termófilos tienen las siguientes ventajas al poder ser utilizadas a altas temperaturas, las que las convierten en candidatos apropiados para las distintas aplicaciones en las que están involucradas estas enzimas: (1) se reduce la desnaturalización de la enzima, (2) reduce la posibilidad de contaminaciones, y (3) disminuye la viscosidad del medio de reacción debido a la presencia de almidón lo que incrementa la difusión, lo que tributa a una mayor eficiencia en la biocatálisis (C. Li et al., 2014).

Durante el procesamiento del almidón para las diversas aplicaciones se usan distintas enzimas de forma secuencial hasta la obtención del producto de interés. Por esta razón es deseable el diseño de enzimas que actúen sobre ciertos sustratos y que catalicen la formación de productos con un grado de polimerización determinado, que los convierta en un sustrato adecuado para el resto de las enzimas que participan en estos procesos. La importancia de estas enzimas se puede evidenciar en su mercado, estimado en 1840.8 millones de dólares para el año 2023 y se proyecta que para el 2033 alcance un valor de 2692.5 millones de dólares (*Alpha amylase market*, s/f).

1.3 Mecanismo de reacción de las glicosil hidrolasas de la familia 13

En las GHs que conforman la familia GH13 el modo de acción implica un mecanismo clásico de Koshland con doble desplazamiento (*ping-pong*), en el que se retiene la configuración del carbono anomérico (Uitdehaag et al., 1999) (Figura 2). En el caso de estas enzimas, lo primero que ocurre es que un grupo ácido de la enzima cede un protón al oxígeno unido al carbono anomérico. Esta activación propicia la salida de esta porción de la molécula y el ataque concertado (mecanismo S_n^2) del carboxilato del residuo nucleófilo de la proteína al carbono anomérico para así formar un complejo covalente enzima-sustrato (GEI). En un segundo paso, este GEI es atacado ya sea por una molécula de agua u otro nucleófilo, los cuales son activados

por una base, la cual es el mismo ácido que perdió un protón en el primer paso; esto conlleva a reacciones de hidrólisis o transferencia, respectivamente.

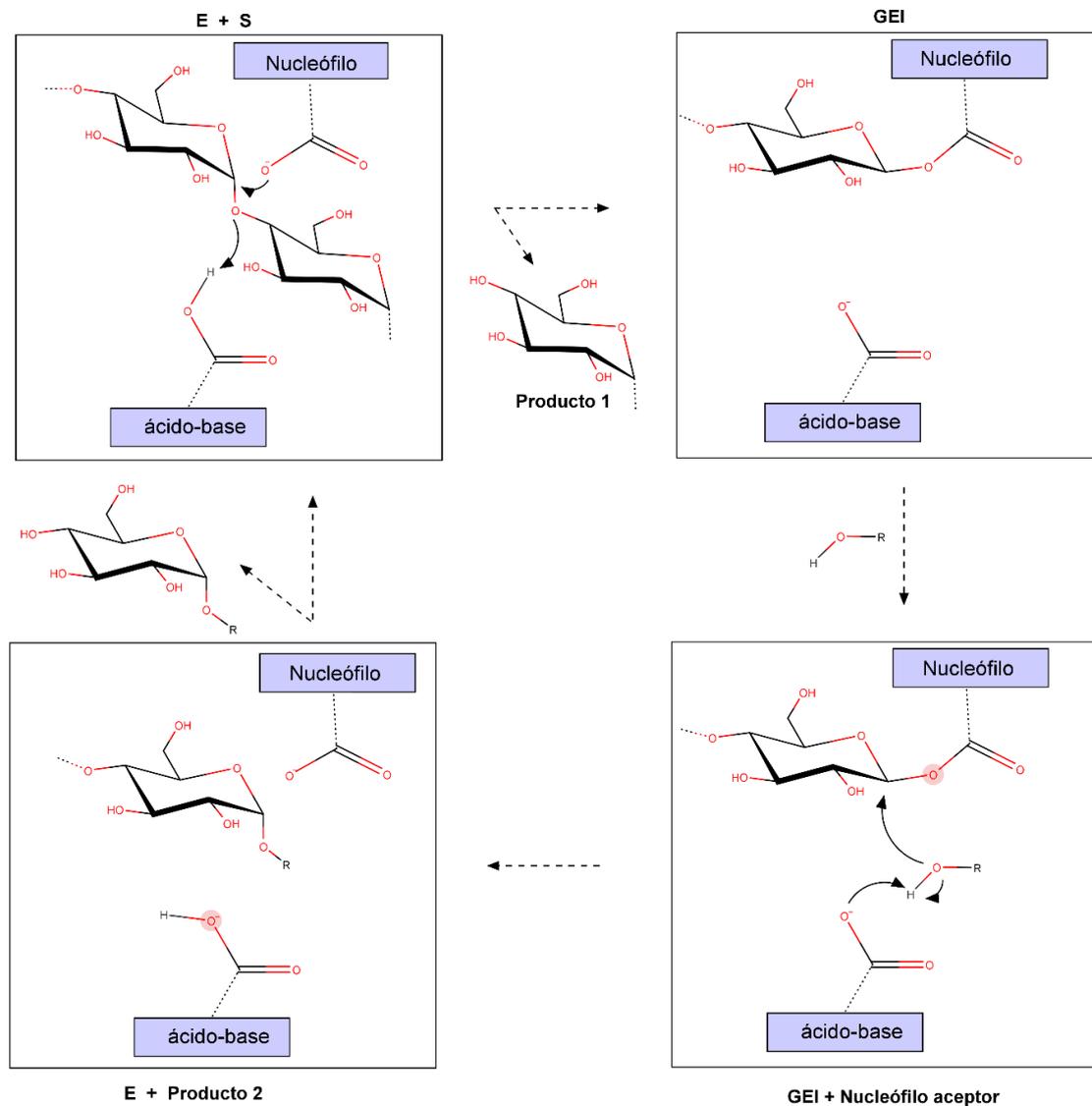


Figura 2. Mecanismo de reacción general para las glicosil hidrolasas de la familia GH13. La reacción se inicia por la activación del grupo glicosídico debido a la catálisis del residuo ácido-base de la enzima, lo que posibilita el ataque del nucleófilo al carbono anomérico en una reacción que se ha propuesto que puede implicar un mecanismo S_n^2 o S_n^1 en este paso se produce un intermediario covalente con la enzima (GEI). Posteriormente ocurre el ataque de un nucleófilo externo denominado aceptor que puede ser el agua (hidrólisis) u otro nucleófilo aceptor (transglicosilación), con lo que se regenera la enzima para otro ciclo catalítico.

Existe evidencia indirecta que apoya este mecanismo de reacción, las que se basa en el uso de sustratos análogos (fluorados) y activados (Braun et al., 1996; McCarter & Withers, 1996). Aunque una crítica que han recibido estos experimentos es que pudieran ser un artefacto y no

un reflejo de la reacción catalizada por estas enzimas. Sin embargo, para una endo-1,4- β -glucanasa de la familia GH5_5 se obtuvo la estructura cristalográfica del complejo covalente de la enzima mutante Y201F con el maltotriósido (G3). El azúcar de este complejo proviene de un sustrato en la que la parte sacarífica es natural debido a que no está modificada con un halógeno (CIPNP β -G3) (Collet et al., 2022). En esta variante de la endo-1,4- β -glucanasa el GEI fue estable por al menos 1 h, y luego comenzó a disminuir su señal. Sin embargo, no fueron mostradas las señales correspondientes a las masas bajas en el espectro para confirmar la formación del producto de reacción (G3), el que no se detectó en la medición por electroforesis de carbohidratos en geles de poliacrilamida (PACE) debido a la baja extensión de la reacción. Adicionalmente, cuando se comparan las estructuras de la transglucosilasa de *Cellvibrio japonicus* (CjAgd31B) libre y con el aducto covalente fluorado se observa que no hay perturbación en el posicionamiento de las aguas cristalográficas de estas estructuras, lo que apoya un mecanismo con la formación de un intermediario covalente (Larsbrink et al., 2012).

Por otra parte, otros autores han especulado que las amilasas también pueden llevar a cabo su acción catalítica mediante un mecanismo del tipo Sn^1 , en el que se forma un carbocatión (oxocarbenio) como intermediario de reacción (Kuriki & Imanaka, 1999). Para explicar la estereoselectividad de la reacción se ha propuesto que el agua es atrapada entre el residuo ácido-base y el estabilizador del estado de transición, sin llegar a regiones más internas de la cavidad catalítica donde se encuentra localizado el D que funciona como nucleófilo; esto propicia que el ataque del nucleófilo aceptor se produzca en la configuración alfa, y el producto formado mantenga la configuración original del carbono anomérico. Este mecanismo estaría en mayor correspondencia con el tipo de nucleófilo que funciona como aceptor, el cual en la mayoría de las veces es débil (ej. agua o azúcares). A pesar de esta propuesta de mecanismo basada en los principios de la química orgánica existen otros elementos que se deben considerar en las estructuras de las enzimas y en especial en los residuos que conforman el sitio activo. Por ejemplo, en la simulación por QM/MM en la α -amilasa pancreática humana se demostró que esta reacción ocurre por un mecanismo de sustitución bimolecular (Das et al., 2023) y no mediante la formación de un carbocatión como intermediario de reacción como ha sido sugerido (Kuriki & Imanaka, 1999).

Adicionalmente, al ser el sustrato un polímero de D-glucosa, se han observado varios subsitios en el sitio activo de las α -amilasas donde se une cada monosacárido. Estos se identifican en relación con el sitio de corte. Así, los que se encuentran hacia el extremo no reductor son

numerados de forma negativa, y los que están en el extremo reductor se numeran de forma positiva a partir del enlace glicosídico que se escindirá (Davies et al., 1997). En las reacciones catalizadas por las glicosil hidrolasas el extremo no reductor se mantiene en estos subsitios negativos al formar un intermediario covalente con el residuo ácido de la enzima que actúa como nucleófilo, mientras que los nucleófilos aceptores se sitúan en los subsitios positivos de la enzima (Figura 3).

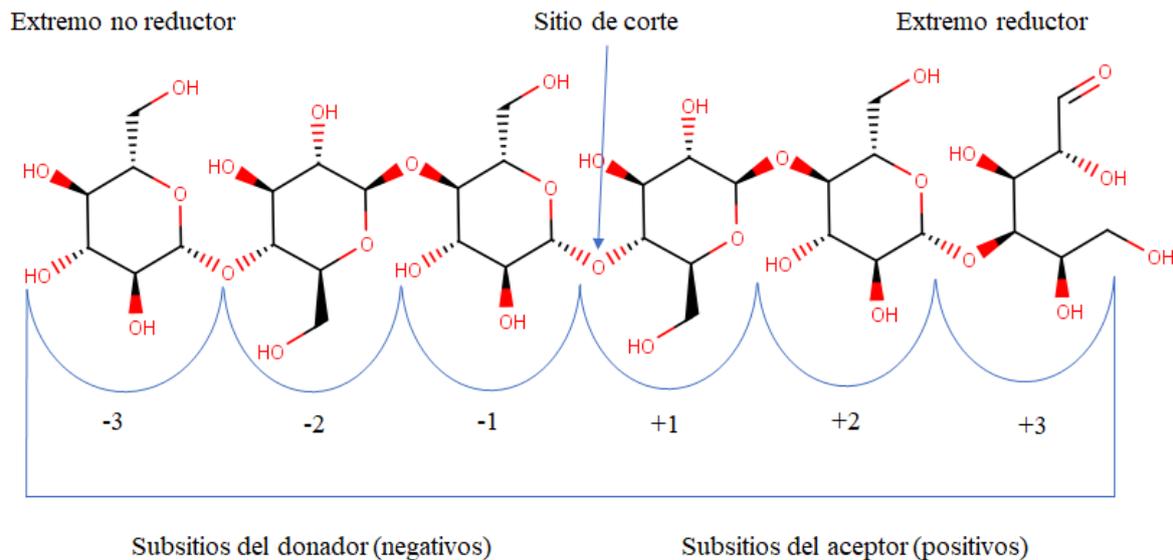


Figura 3. Configuración esquemática del sitio activo de las glicosil hidrolasas. Los subsitios negativos corresponden a la región donde se une el extremo no reductor del carbohidrato; en los subsitios positivos se une el extremo reductor del azúcar y el aceptor en las reacciones de transglicosilación. El sitio de corte es el enlace O-glicosídico ubicado entre los subsitios -1 y +1.

1.4 ¿Cómo modificar las especificidades de reacción?

En la literatura existen varios reportes de mutaciones que modifican la relación entre los productos de hidrólisis y transglicosilación para enzimas amilolíticas. Muchos de ellos van encaminados a la obtención de enzimas transglicosídicas a partir de una hidrolítica (Ara et al., 2021; Damián-Almazo et al., 2008; Hansson et al., 2001; Lundemo et al., 2017; Rivera et al., 2003; Saab-Rincón et al., 1999; P. L. Tran et al., 2014), mientras que otros se enfocan en modificar la actividad transglicosídica para obtener una enzima con mayor especificidad hacia la hidrólisis (Kelly et al., 2007; Leemhuis, 2003; Leemhuis et al., 2002, 2003; Xiang et al., 2021). Los resultados deseados en estos casos estarían encaminados en aumentar la actividad emergente con la reducción de la actividad original de la enzima. Sin embargo, en muchos casos se observa una disminución de ambas actividades, siendo afectada en mayor medida la

que se desea eliminar en la enzima. Por lo anterior, la relación de dichas actividades aumenta en relación con la enzima silvestre.

A pesar de que se ha trabajado en la identificación de los elementos estructurales que permitan el diseño de una enzima a la medida, en la actualidad no se comprenden completamente los mecanismos asociados a la especificidad de reacción, lo que se relaciona con la complejidad de este fenómeno. Algunas ideas se asocian con la presencia de canales de agua desde la superficie de la proteína hasta el sitio activo. El cambio de residuos aminoacídicos que se encuentran en estos canales provoca un incremento de la relación de T/H para la β -glucosidasa de *Thermus thermophilus* (Teze et al., 2013); en esta glucosidasa de la familia GH1 se pudo identificar este fenómeno que parece ser general dentro de la familia mediante la combinación del intercambio de los isótopos D/H y simulación por DM. En este sentido, varios algoritmos que permiten la identificación de canales dentro de las estructuras de las proteínas pudieran ser herramientas que ayuden en la localización de las regiones por las que se transportan las moléculas de agua catalíticas desde el exterior de la proteína. Otro de los elementos que se asocian a la especificidad de reacción de las GHs son los cambios en la dinámica de los residuos catalíticos (David et al., 2019; Lundemo et al., 2017). De forma general se propone que el posicionamiento de una molécula de agua catalítica es más dependiente de la estática del residuo ácido-base, por lo que en los casos en los que aumenta la dinámica conformacional de este residuo se favorece la reacción de transglucosilación sobre la hidrólisis. También se ha reportado que la inserción/delección de regiones móviles puede asociarse con las diferencias en los perfiles de T/H. En el caso de la enzima Amyrel (Feller et al., 2021) o LDAmly (Hámori et al., 2022) se ha identificado que la ausencia de un asa que circunda el sitio activo regula la especificidad de reacción. La universalidad de este determinante estructural ha sido demostrada mediante la construcción de variantes que comprenden la delección de esta región en las amilasas de páncreas, de *D. melanogaster* (Feller et al., 2021) y salival humana (Ramasubbu et al., 2003), lo que correlacionó con el aumento de los productos de transglucosilación de estas enzimas que se caracterizan por ser enzimas hidrolíticas. Adicionalmente, en la CGTasa (Tabium), enzima fundamentalmente transglucosídica aparece una delección al comparar con la G2 amilasa, una enzima hidrolítica proveniente de *Bacillus stearothermophilus*. Cuando la secuencia de cinco residuos aminoacídicos de la enzima hidrolítica es insertada en la GTasa los eventos de hidrólisis/ciclización cambian desde 0.23 (WT) hasta 1, y los de hidrólisis/endoactividad desde 0.24 (WT) hasta 49. Sin embargo, se debe resaltar que este cambio de especificidad fue producto de la disminución de ambas actividades de la enzima,

siendo la más afectada la transglicosilación. Por ejemplo, respecto a la forma WT de esta enzima la hidrólisis disminuyó en un 74 % a la vez que la ciclización, desproporción y endoactividad se redujeron en al menos un 99 % (Leemhuis, 2003).

Estos mecanismos están relacionados con la capacidad que tienen estas familias de enzimas para permitir el acceso de agua a la cavidad catalítica, el posicionamiento del residuo ácido-base y otros del sitio activo, la dinámica estructural de la enzima alrededor del sitio catalítico, así como las propiedades electrostáticas alrededor de los residuos catalíticos. Algunos acercamientos para tratar de explicar estructuralmente la especificidad de reacción de algunas GHs se basan en simulaciones por dinámica molecular (DM) (David et al., 2019; Geronimo et al., 2018; Lundemo et al., 2017) o la combinación de la mecánica cuántica con la mecánica molecular (QM/MM) (Guo et al., 2022; Jitonnorn et al., 2018). De este modo, estas herramientas bioinformáticas pueden ayudar a comprender el papel de la dinámica de la proteína en la especificidad de reacción.

Las estrategias para cambiar la especificidad de reacción han estado enfocadas a la identificación de aminoácidos mediante el alineamiento de pocas secuencias de enzimas con preferencia por una u otra actividad, sobre todo en regiones cercanas al sitio catalítico, las que coinciden con algunas de las regiones conservadas en la familia de GH. Entre estas se encuentran: (1) la modificación de los subsitios negativos la cual resulta en la disminución de la estabilización del estado de transición en mayor medida para la reacción de hidrólisis, (2) aumento de la afinidad en los subsitios del aceptor generalmente por la sustitución por aminoácidos aromáticos/hidrofóbicos. Sin embargo, estos acercamientos no consideran los residuos que no forman parte del sitio activo, los que se ha visto que también juegan un papel importante en su actividad biológica (Holm et al., 1990). Una estrategia que busca sistematizar la búsqueda de diferencias estructurales a las que se les pudiera atribuir la especificidad de reacción se fundamenta en la coevolución de residuos distribuidos de forma preferencial en enzimas hidrolíticas o transglicosídicas (Arreola-Barroso et al., 2021). Esta preferencia se cuantifica como la frecuencia de los aminoácidos que se encuentran en un par en contacto, denominado factor de enriquecimiento (Δf_{aa}), en cada grupo de enzima. Con el cúmulo de secuencias y estructuras cristalográficas reportadas de esta familia de proteínas, así como su caracterización en cuanto al tipo de productos que forman, se pretende identificar el perfil de residuos en pares de contactos que determinen ya sea la actividad hidrolítica o la transglicosídica. Esta estrategia sólo se puede utilizar en el dominio A, que es conservado en

esta familia de enzimas. Sin embargo, el dominio B (mucho menos conservado), también ha sido implicado en determinar la preferencia por el aceptor (Seo et al., 2016, 2019). Por lo anterior, también se debe trabajar en la localización de sitios en este dominio que puedan estar relacionados con la especificidad de reacción, como ha sido propuesto previamente (Leemhuis, 2003; Light et al., 2017).

1.5 Las asas cercanas a la cavidad catalítica como determinantes de la especificidad de reacción

Las actividades enzimáticas para los miembros de la familia GH13 por lo general se asocian al dominio catalítico, el cual tiene un plegamiento del tipo barril TIM. Sin embargo, existen evidencias de que otros dominios de la proteína también se pueden relacionar con la acción catalítica de estas proteínas. En el caso del dominio B se ha encontrado que la construcción de quimeras que comparten el dominio B de otras enzimas homólogas tiene un efecto en la especificidad de reacción (Seo et al., 2016).

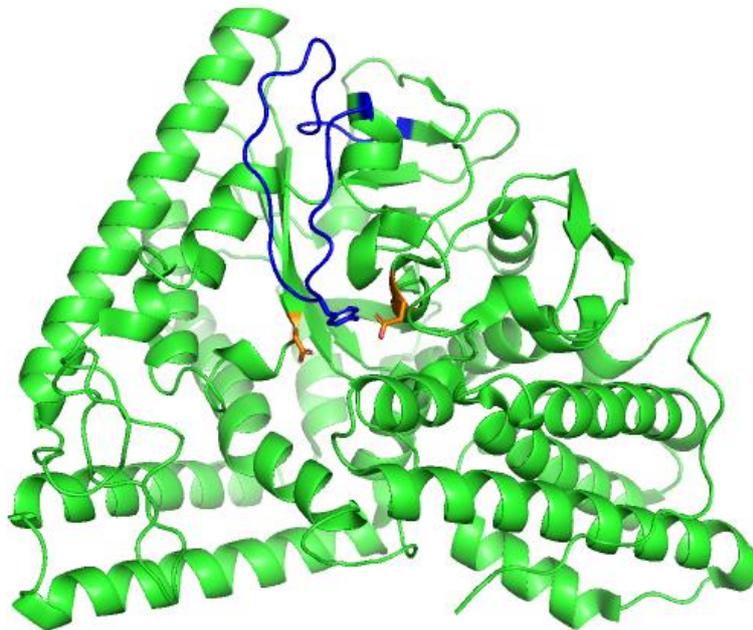


Figura 4. Estructura de la enzima ramificadora de glucógeno (GBE) de *Thermococcus kodakarensis* (PDB ID 3N8T) perteneciente a la familia GH 57. Los residuos catalíticos (nucleófilo y ácido-base) se presentan en color anaranjado. El asa alargada y flexible con una Tyr en la punta se muestra en color azul.

De igual manera los módulos de unión a carbohidratos (CBM) facilitan la canalización y posicionamiento de los carbohidratos hacia el sitio activo de la enzima. Una estrategia evolutiva parece estar relacionada con la inserción/delección de asas con un residuo aromático

en las inmediaciones del sitio activo de la enzima, como fue reportado para varias enzimas ramificadoras de glucógeno (GBEs) (Xiang et al., 2021) (Figura 4). Al parecer estos elementos estructurales flexibles con un residuo aromático/hidrofóbico en su punta pueden regular la entrada de agua al sitio activo, y con ello los eventos de hidrólisis y transglicosilación.

Para la identificación de las regiones relacionadas con la funcionalidad de las GHs es importante tener acceso a un cúmulo de secuencias de una misma familia para la realización de alineamientos múltiples de secuencia (MSA). Estos hallazgos también podrían ser encontrados con las estructuras tridimensionales de las proteínas o con modelos construidos a partir de la aplicación de diferentes algoritmos de predicción de la estructura 3D como pueden ser Swiss-model (Bienert et al., 2017; Schwede, 2003; Waterhouse et al., 2018) o AlphaFold (Jumper et al., 2021). En la familia GH57 se ha demostrado que la presencia de lazos protuberantes provenientes del dominio B de la proteína y que contienen una Y en su punta pueden ser determinantes estructurales para la reacción de transglicosilación (Xiang et al., 2021). De forma semejante ocurre en la 4- α -GTasa (familia GH 77) de *Corynebacterium glutamicum*, la que contiene un lazo que se extiende desde los residuos 414-422 y que contiene en su punta un residuo de Y (418) que resulta vital para las actividades transglicosídicas (desproporción, ciclización y acoplamiento) (Tumhom et al., 2017). De igual manera ocurre en la enzima formadora de cicloalternano (CA), la cual contiene un W en la punta de un asa, el cual es importante para la especificidad de reacción (Light et al., 2017).

En la transglucosilasa de *Cellvibrio japonicus* (CjAgd31B) perteneciente a la familia GH31 también se ha identificado el residuo Y376, el que se extiende desde una región móvil de la inserción 1, la cual coincide espacialmente con el dominio B de la familia GH 13 (Larsbrink et al., 2012). El efecto en la especificidad de reacción también puede estar relacionado con la composición aminoacídica de un asa cercana a la entrada del sitio activo. Esto fue demostrado en una sialidasa (hidrolítica) de *Trypanosoma rangeli* (familia GH33), la que se comparó con la trans-sialidasa (transglicosídica) del patógeno *Trypanosoma cruzi*. El alineamiento de las secuencias de ambas proteínas en regiones que no estuvieran alejadas más de 14 Å del sitio activo permitió la identificación de un asa que comprende los aminoácidos 192-203, que al ser sustituido por el equivalente de la enzima transglicosídica cambió la especificidad de reacción de esta hidrolasa. En especial se observó una reducción de la hidrólisis en alrededor de un 80 % mientras que la transglicosilación se incrementó 2.6 veces respecto a la forma Tr6 (contiene las mutaciones S120Y, G249Y, Q284P, M96V, A98P y I37L) de la proteína; en esta reacción

se utilizó glicomacropéptido de caseína (cGMP) como donador de ácido siálico y 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido (MU-gal) como nucleófilo aceptor (Jers et al., 2014). Cuando esta inserción se combinó con otras mutaciones previamente reportadas (T39A, F59N y D285G) se tuvo un cambio de la relación T/H desde 2.53 hasta 4.48, aunque no fue a expensas de un aumento notable de la actividad transglicosídica. Solo para la mutante denominada TrSA_{15mut} (la que contiene el asa intercambiada con la trans-sialidasa de *T. cruzi*) se obtuvo un incremento de la actividad transglicosídica desde 2.3 (Tr6) hasta 8.6 pmol 3'SL/(min· μ g de proteína). Sin embargo, en este último caso se usó como aceptor la D-lactosa, lo que puede modificar la extensión de la transglicosilación debido a su diferencia estructural con el MU-gal (Nyffenegger et al., 2017). No obstante, la comparación de las estructuras tridimensionales de estas dos proteínas mostró solo pequeños cambios en la cadena principal de estas asas. Los autores proponen que es probable que el tamaño del asa y su dinámica pudieran no jugar un papel tan importante en la especificidad de reacción como lo hacen las cadenas laterales de los residuos que lo conforman. La modificación más notable que observaron en la comparación estructural fue la aparición de tres cargas positivas de los residuos de K, característicos de la proteína más transglicosídica (Jers et al., 2014).

En otra glicosidasa de la familia GH 31 (*CjAgd31B*) también se identificó un par de residuos aromáticos, las Y179 y Y376, que se posicionan sobre el subsitio +2; estos aminoácidos se localizan en el dominio N-terminal y en la inserción 1, respectivamente. Específicamente en el caso de Y179 se encuentra en la punta de un asa que se extiende desde el residuo 174 al 190 (Larsbrink et al., 2012). Aunque no se discute el papel de este par de residuos aromáticos en la especificidad de reacción, es posible que su disposición pueda estar influenciando el posicionamiento adecuado del agua para la reacción de deglicosilación y así la preferencia de la transglicosilación sobre la hidrólisis observada en esta glicosidasa. Igualmente, y debido a que se encuentra formando parte de los subsitios +2/+3 es posible que puedan estar involucrados en la interacción π - π con los carbohidratos que actúan como aceptores.

1.6 La 4- α -glucanotransferasa de *Thermotoga maritima* es una enzima modelo para la reacción de transglicosilación

La enzima modelo usada en este trabajo fue la 4- α -glucanotransferasa de la bacteria hipertermófila *Thermotoga maritima* (*TmGTasa*) (Liebl et al., 1992). Esta proteína de 441 residuos aminoacídicos (53 kDa) ha sido previamente cristalizada en presencia y ausencia del

inhibidor competitivo acarboxa, el que delimita el sitio activo de la enzima (Roujeinikova et al., 2001, 2002). Esta GH, aunque pertenece a la familia GH 13 de CAzy no ha sido incluida en ninguna subfamilia. Un elemento estructural fundamental de esta enzima es que solamente contiene los tres dominios básicos que caracterizan a esta familia (Figura 1); de tal modo resulta interesante el hecho de que no necesita de dominios extras para llevar a cabo la reacción de transglicosilación, que se basa en la transferencia de unidades de glucosa desde el almidón al C-4 de los carbohidratos aceptores que al menos contengan dos unidades monosacáridicas preferiblemente unidas por enlaces α -glicosídicos (Huber & Liebl, 1994). La degradación del almidón solo se produce en una extensión mínima cuando no se tienen azúcares que actúen como aceptores (Liebl et al., 1992). Esta enzima también cataliza reacciones de desproporción de oligomaltósidos; sin embargo, estas transformaciones por lo general ocurren al cabo de varias horas. (Huber & Liebl, 1994; Liebl et al., 1992).

1.7 Métodos para medir las reacciones catalizadas por las GH

La transglicosilación e hidrólisis ocurren de forma paralela en transformaciones que son catalizadas por las GHs. Para la determinación de velocidad de las reacciones en las que están involucradas las GHs se usan diferentes métodos que permiten la cuantificación de los reaccionantes o de los productos que se generan durante la reacción. En los casos en las que una de las actividades es predominante en la enzima, esta es la que se determina usando tiempos de reacción cortos. Para la amilasa de *Bacillus licheniformis* (BLA) que es fundamentalmente hidrolítica, la reacción con el sustrato malto-octaósido (G8) ha sido analizada por cromatografía líquida de alta resolución (HPAEC).

En el caso de las reacciones de transglicosidación, la medición es compleja debido a la gama de productos que se pueden producir, los cuales solo podrían ser cuantificados a través de HPLC, un método largo y costoso. En el caso de la *TmGTasa* debido a su dependencia de un aceptor de al menos dos unidades de D-glucosa para consumir el almidón, en el grupo de Liebl se desarrolló un ensayo para la determinación de la actividad transglicosídica de esta enzima. Esta técnica se basa en la cuantificación del complejo de color azul entre el yodo y el almidón restante luego de 15 min de reacción mediante la medición de la absorbancia a 620 nm (Ono et al., 1953; Rundle et al., 1944; Saenger, 1984). La dependencia entre la absorbancia a 620 nm y la concentración de almidón permite la cuantificación de este sustrato en un amplio rango de concentraciones (Cochran et al., 2008). En este intervalo de tiempo la hidrólisis realizada por

la enzima es despreciable si se compara con la reacción de transglicosilación (Liebl et al., 1992; Park et al., 2007). Sin embargo, los tiempos en los que se realizan las mediciones deben ser considerados con precaución debido a que durante la reacción de transglicosidación se pueden formar productos con diferentes grados de polimerización que también pueden formar complejo con yodo absorbiendo en esta región del espectro (Bailey & Whelan, 1961; John et al., 1983; Thoma & French, 1960; Vetter & Thorn, 1992). En el caso de la amilosa de *D. geothermalis* la reacción se produjo con sacarosa como sustrato. Debido a que este disacárido es no reductor, los productos de la hidrólisis obtenidos luego de 10 min de reacción se midieron por el método del DNS. En cambio, la reacción de polimerización (transglicosilación) fue analizada luego de 24 h de reacción a partir de la formación de complejos con especies de yodo (Seo et al., 2019).

Por otra parte, la medición de la reacción de hidrólisis se puede llevar a cabo mediante el método del DNS que se basa en la oxidación de los grupos aldehídos presentes en los azúcares. Esta reacción se produce con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Figura 5) en condiciones alcalinas (Miller, 1959; Saqib & Whitney, 2011). La formación del compuesto (IV) produce un cambio en el máximo del espectro de absorción desde 350 nm (Basha et al., 2022) a 540 nm (Dangkulwanich et al., 2018). Esta técnica tiene la ventaja de que se puede usar en placas de 96 pozos, por lo que permite el análisis de un mayor número de muestras de forma simultánea (Gonçalves et al., 2010; Xia et al., 2015). Su uso para la determinación de los productos de reacción que implican a GH como catalizadores es ampliamente extendido dentro de la literatura (Govindasamy et al., 1992; Hashim et al., 2005; Zuo et al., 2022). Estos métodos globales para la determinación de la extensión de cada una de las reacciones constituyen una ventaja para los cribados de ambas actividades debido a la complejidad de las reacciones de transglicosilación en las que pueden estar actuando diferentes sustratos como donadores y aceptores en dependencia de la extensión de la reacción. Sin embargo, luego de la identificación de las variantes con especificidades de reacción modificadas en el sentido del favorecimiento de la relación H/T es necesaria la caracterización con técnicas que permitan la comprensión de las complejidades inherentes a este tipo de reacciones.

Otra técnica que se usa en la determinación de los productos obtenidos en reacciones en las que están involucradas las amilasas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En este caso se emplea la modalidad de intercambio aniónico (Jung et al., 2011; Qin et al., 2017; Seo et al., 2019), fase normal (Kelly et al., 2008; Mészáros et al., 2022) o exclusión molecular.

También existen métodos colorimétricos directos basados en la liberación de cromóforos como el p-nitrofenol (pNF), pero estos solo se pueden emplear con enzimas que sean exoglicosidasas (Bissaro et al., 2014). Adicionalmente se ha reportado para la α -L-arabinofuranosidasa de *T. xylanilyticus* el monitoreo de las reacciones mediante RMN (Bissaro et al., 2014).

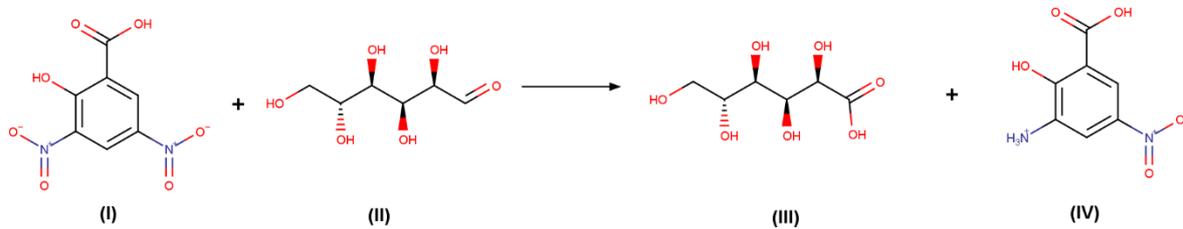


Figura 5. Ecuación química de la reacción usada en la determinación de azúcares reductores por el método del DNS. (I) ácido 3,5-dinitrosalicílico, (II) D-glucosa, (III) ácido D-glucónico, (IV) ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.

Cuando se quiere analizar de forma semicuantitativa los productos obtenidos por la acción de una GH, una técnica ampliamente usada es la cromatografía en capa fina, las que pueden ser reveladas con naftol-H₂SO₄ o autoradiografía (Hashim et al., 2005; Huber & Liebl, 1994; Park et al., 2007; P. L. Tran et al., 2014). En este caso no sólo se logra una estimación de la cantidad sino también de la composición ya que la técnica permite resolver oligosacáridos de 2-9 unidades de monosacárido con frecuencia se utilizan sustratos no poliméricos que pueden ir en el rango de 3-9 unidades de glucosa.

2. Planteamiento del problema

Las glicosil hidrolasas son enzimas que participan en diversos procesos metabólicos que se producen en los sistemas biológicos. Adicionalmente tienen distintas aplicaciones industriales y biomédicas. Esta versatilidad está directamente relacionada con las reacciones en las que participan como catalizadores. Sin embargo, existen diferentes especificidades en las reacciones en las que están involucradas estas enzimas; en algunos casos son preferencialmente hidrolíticas o transglicosídicas, pero en otras enzimas ambas reacciones están en competencia. Adicionalmente, existe una limitación en la información disponible en relación con la especificidad de reacción debido a que no siempre son caracterizadas y reportadas de manera independiente. Independientemente del perfil de productos obtenidos por cada una de estas enzimas, éstas guardan una elevada similitud en sus estructuras terciarias en dependencia de la familia en las que son agrupadas. Sin embargo, no se conocen los determinantes estructurales

que favorecen una u otra reacción. En este trabajo se planteó investigar algunos elementos de la estructura en enzimas de la familia GH 13 que pudieran estar gobernando la especificidad de reacción de estas enzimas, utilizando como modelo a la glicosil transferasa de *Thermotoga maritima* (*TmGTasa*).

3. Hipótesis

La especificidad de reacción de las glicosil hidrolasas está relacionada con la disposición preferencial de residuos claves de las secuencias aminoacídicas de estas enzimas, y estos patrones pueden ser identificados por la comparación de las estructuras tridimensionales de proteínas de una misma familia.

4. Objetivo General

Demostrar la capacidad predictiva de las estrategias basadas en perfiles de pares de aminoácidos en contacto y del análisis estructural del dominio B para identificar posiciones relevantes para la especificidad de las reacciones de hidrólisis y transglicosilación.

5. Objetivos específicos

- Identificar diferencias de residuos provenientes del dominio B que interaccionen directamente con el sitio catalítico y mutarlos para cambiar la especificidad de reacción de la GTasa de *T. maritima*.
- Identificar algunos de los pares de contactos más relevantes para evaluar su efecto en la determinación de la especificidad de reacción usando como modelo a la GTasa de *T. maritima*.
- Expresar y purificar las enzimas mutantes obtenidas.
- Determinar las actividades hidrolíticas y transglicosídicas de las proteínas de interés.

6. Materiales y métodos

6.1 Construcción de las mutantes de *TmGTasa*

El gen *mgtA* de *Thermotoga maritima* (Número de acceso en GenBank AAD35451.1), fue previamente clonado en el plásmido pET22b(+) (Arreola-Barroso et al., 2021), el cual fue usado como templado para construir las variantes de los dominios A y B de la *TmGTasa*. Los

genes mutantes fueron construidos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el par de oligonucleótidos correspondientes para cada mutación (Tabla 1). El primer fragmento fue construido usando como templado el gen de la *mgtA* contenido en el plásmido pET22b(+) y los oligonucleótidos T7_Fw para a la posición 5'- que contiene el sitio de restricción de *NdeI* y el oligonucleótido respectivo 3'- que contiene la mutación que se desea introducir en el gen. La segunda parte del gen fue construida usando como templado el mismo plásmido y el oligonucleótido 5'- que contiene la mutación; en el extremo 3'- se usó el oligonucleótido *XhoI_term_Rv*, que contiene el sitio de restricción de la enzima *XhoI*. Los productos amplificados fueron separados y posteriormente purificados en un gel de agarosa al 1 % usando el kit *High Pure PCR Extraction Purification kit* (Roche Diagnostics GmbH, Alemania).

Los genes mutados fueron finalmente construidos por superposición mediante PCR usando como templado los productos de PCR previamente purificados, y los oligonucleótidos T7_Fw como 5'-primer y *XhoI_Term_Rv* como 3'-primer. Después los productos de PCR obtenidos por extensión fueron purificados en un gel de agarosa al 1 % y posteriormente digeridos con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. Las variantes del dominio A fueron obtenidas con el mismo procedimiento con la única diferencia que se usaron los oligonucleótidos Q5_Fw y S275_Rv para obtener el primer fragmento del gen, y que para el segundo fragmento el oligonucleótido del extremo 5'- fue el S275_Fw y el del 3'- fue *XhoI_Term_Rv* (Tabla 1). Finalmente, los productos de la digestión fueron ligados con el fragmento del vector pET22b(+) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción y purificado. Para esta reacción se usó la T4 DNA ligasa siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific, E.U.A). El plásmido usado contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para la adición de una etiqueta de 6-His en el extremo C-terminal de la proteína de interés, la que permite la purificación de las proteínas obtenidas por cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC). Los plásmidos obtenidos luego de la reacción de ligación fueron electroporados en células electro-competentes de *E. coli* MC1061. Posteriormente, las células transformadas se dejaron recuperar en medio SOC sin antibióticos durante 1 h. Finalmente, estos cultivos fueron sembrados en placas de LB sólido conteniendo ampicilina 200 µg/mL e incubados a 37 °C por 12 h.

Todos los plásmidos fueron purificados con el kit *High Pure Plasmid Isolation kit* (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Los genes de la *mgtA* fueron secuenciados para corroborar las mutaciones introducidas. La cuantificación del DNA fue mediante la medición de la

absorbancia a 260 nm en un equipo *NanoDrop* modelo 2000 (Thermo Fisher Scientific, E.U.A). El diseño de los oligonucleótidos se realizó con el programa SnapGene (GSL Biotech LLC, USA).

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para las mutagénesis sitio-dirigidas de la *TmGTasa*.

Mutante	Fragmento	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
W131G	F1	T7_Fw	CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG ATA GGC TAT CAG
		W131G_Rv	CTT TTC TCC ATC CCC CTC TCT TCT TTC GTC C
	F2	W131G_Fw	G GAC GAA AGA AGA GAG GGG GAT GGA GAA AAG
		XhoI_Term_Rv	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Asa 130s recortada	F1	T7_Fw	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGATAG GCTATCAG
		SL_Rv	GATCTTTTCTCCATCTTCGTCCAGTGCCCA TACGTAGTAATCTCTGTAG
	F2	SL_Fw	CTACAGAGATTACTACGTATGGGCACTGG ACGAAGATGGAGAAAAGATC
		XhoI_Term_Rv	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Q5E/S275 A/G/W	F1	Q5_Fw	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGATAG GCTAT <u>S</u> AGATCTACGTG
		S275_Rv	GTCGTGATT <u>C</u> SMAGTAAAATTCACCGGG
	F2	S275_Fw	CCCGGTGAATTTTACT <u>K</u> SGAATCACGAC
		XhoI_Term_Rv	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

6.2 Evaluación de la actividad transglicosídica

La actividad transglicosídica se midió como fue reportado anteriormente (Liebl et al., 1992) con cambios menores. Para los ensayos de actividad enzimática se usaron 90 µL de almidón 0.05 %, maltosa 0.05 % en Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5. Las reacciones se llevaron a cabo durante 15 min a 70 °C y comenzaron con la adición de 10 µL de los extractos crudos obtenidos por la ruptura en fosfato de sodio 100 mM, lisozima 0.75 mg/mL, DNAsa 20 µg/mL a pH 8.0, incubando por 1 h a 37 °C en una incubadora a 200 rpm (Excella E25, New Brunswick

Scientific, Eppendorf, Alemania). Posteriormente se mezclaron con igual volumen de una solución de I₂/KI al 0.02 % y se midió la absorbancia a 620 nm en un lector de placas Sapphire 2 (TECAN, EUA).

6.3 Expresión y purificación de las proteínas

Los genes de las proteínas clonados en el vector pET22b(+) se transformaron en células quimio-competentes de *E. coli* BL21 y se crecieron durante 16 h a 37°C en LB líquido con ampicilina 200 µg/mL. Cuando la absorbancia a 600 nm alcanzó el valor de 0.5 se le añadió IPTG a una concentración de 0.25 mM y se dejó crecer a 20 °C durante 16 h adicionales. Las células se obtuvieron por centrifugación a 1507 g durante 30 min a 4 °C (3500 rpm, rotor F 34-6-38, Eppendorf, Alemania). La biomasa se resuspendió en NaCl 300 mM, Na₂HPO₄ 50 mM, pH 7.7 (*Tampón A*) y la ruptura de las células se realizó por medio de 10 ciclos de 0.5 min con 1 min de reposo entre cada uno (Branson Sonifier 450, Emerson Inc., E.U.A). El material insoluble se separó por centrifugación a 1507 g (3500 rpm, rotor F 34-6-38) durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se calentó a 70 °C durante 1 h y las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación a 1507 g (3500 rpm, rotor F 34-6-38) durante 30 min a 4 °C. El material soluble obtenido se aplicó en 2 mL de una matriz de Ni Sepharose (GE Healthcare, EUA) previamente equilibrada con tampón A. Posteriormente se lavó con imidazol 15 mM en *Tampón A*, y la elución de la proteína se realizó con NaP_i 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM pH 7.7 (*Tampón C*). El monitoreo del proceso de purificación se realizó mediante la medición de la absorbancia a 280 nm (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, EUA) como medida de las proteínas totales. La pureza de las preparaciones fue analizada por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970), los que fueron teñidos con azul brillante de coomassie R-250 para la visualización de las proteínas.

6.4 Determinación de parámetros cinéticos

La actividad transglucosídica se midió por el método reportado anteriormente (Bai et al., 2015; Liebl et al., 1992) con cambios menores. Las reacciones se iniciaron por la adición de 3 µg (10 µL) de la enzima en 90 µL de una mezcla que contenía 0.9 % de almidón y concentraciones de maltosa en el rango 1.2-20.5 mM en Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.0. Las reacciones se llevaron a cabo a 70 °C y en cada caso se midieron las velocidades iniciales. En todos los casos, las reacciones se detuvieron por la adición de 20 µL de una solución de NaOH 0.4 M.

Posteriormente, cada alícuota fue neutralizada con igual volumen de HCl 0.4 M. Finalmente cada muestra fue diluida 25 veces antes de la adición de igual volumen de una solución de I₂/KI 0.02 % y se midió la absorbancia a 620 nm en un lector de placas Sapphire 2 (TECAN, EUA). Las unidades de actividad de esta enzima fueron arbitrariamente definidas como la cantidad de proteína que causa un cambio de una unidad de absorbancia por unidad de tiempo en las condiciones de reacción descritas anteriormente.

La ley cinética para este tipo de mecanismo de doble desplazamiento (*ping-pong*) (Leskovac, 2004) viene dada por la ecuación:

$$v = \frac{v_{\max}[A][B]}{K_{m,B}[A] + K_{m,A}[B] + [A][B]} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Al mantener la concentración del primer sustrato (A, almidón 1 %) constante y al variar la concentración del segundo sustrato (maltosa, B), la Ecuación 1 toma la forma siguiente:

$$v = \frac{\frac{v_{\max}}{K_{m,A} + 1} [B]}{\frac{K_{m,B}}{K_{m,A} + 1} + [B]} \quad (\text{Ecuación 2})$$

De tal modo, la variación de la concentración de la maltosa permitirá la obtención de las constantes de Michaelis-Menten y velocidades máximas aparentes:

$$v_{\max}^* = \frac{v_{\max}}{\frac{K_{m,A}}{[A]} + 1} \quad (\text{Ecuación 3a})$$

$$K_{m,B}^* = \frac{K_{m,B}}{\frac{K_{m,A}}{[A]} + 1} \quad (\text{Ecuación 3b})$$

6.5 Ensayos de hidrólisis

La reacción de hidrólisis se inició por la adición de 3 µg de la enzima a una solución conformada por almidón 1 % en Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0, la que se mantuvo a 70 °C durante 12 h. Los azúcares reductores fueron medidos por el método del DNS (Miller,

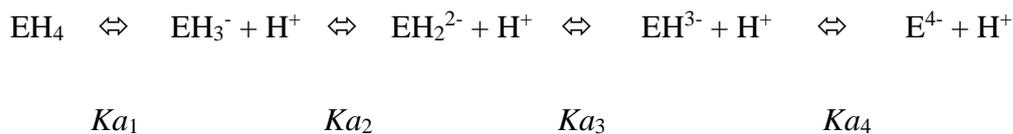
1959). En todos los casos la absorbancia se midió en un lector de placas Sapphire 2 (TECAN, EUA). Para la realización de la curva patrón se usó una solución estándar de glucosa. Los resultados se expresaron como equivalentes de glucosa por unidad de volumen. Cada uno de los valores de absorbancia a 540 nm fueron sustraídos del blanco correspondiente. Para esta reacción, la unidad de actividad hidrolítica igualmente fue definida como la cantidad de glucosa que se libera por cada minuto por miligramo de proteína.

6.6 Determinación de los valores de pKa de los residuos catalíticos

Las actividades enzimáticas en un rango de pH desde 3.0 a 11.0 fue medida a 70 °C en una mezcla de citrato 100 mM, fosfato 100 mM y glicina 100 mM ajustados a los valores de pH correspondientes en cada caso. Los ensayos fueron realizados mediante la medición de los cambios de absorbancia a 620 nm luego de 15 min de reacción, como ha sido descrito anteriormente (Roujeinikova et al., 2002)(Roujeinikova et al., 2002)(Roujeinikova et al., 2002). Los datos fueron ajustados a una ecuación que considera dos grupos ionizables.

$$Actividad\ relativa = \frac{1}{1 + 10^{pK_1 - pH} + 10^{pH - pK_2}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

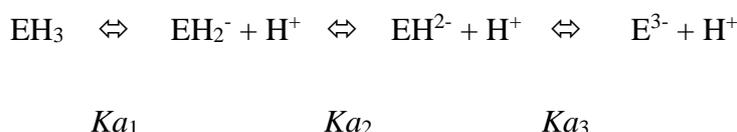
Debido a que las enzimas silvestre y la mutante sencilla (W131G) mostraron una tendencia que implicaba más residuos ionizables también se ajustó al modelo siguiente:



Donde las especies EH_3^- , EH_2^{2-} , y EH^- , son consideradas con una actividad relativa x , y , y z , respectivamente. En concordancia con este modelo, la enzima silvestre fue ajustada con la ecuación siguiente:

$$Actividad\ relativa = \frac{x \frac{[H^+]}{K_{a2}} + y + z \frac{K_{a3}}{[H^+]}}{\frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + 1 + \frac{K_{a3}}{[H^+]} + \frac{K_{a3}K_{a4}}{[H^+]^2}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

De igual manera ambas variantes (WT y W131G) fueron analizadas en función del modelo siguiente:



Donde las especies EH_2^- , EH^{2-} , son las asociadas con las actividades relativas x y y , respectivamente. Derivado de este modelo el perfil de actividad a diferentes pH fue ajustado a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad relativa} = \frac{x + y \frac{[H^+]}{K_{a2}}}{\frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + 1 + \frac{K_{a3}}{[H^+]}} \quad (\text{Ecuación 6})$$

6.7 Dicroísmo circular

Los espectros de CD fueron registrados en un espectropolarímetro Jasco J-710 (Jasco, E.U.A) equipado con un controlador de temperatura Peltier y usando un paso óptico de 1.00 mm. Se tomaron tres escaneos y posteriormente se promediaron entre las longitudes de onda de 190 a 260 nm para cada una de las muestras que tuvieron concentraciones desde 0.02–0.3 mg/mL de *TmGTasa*. El tampón usado fue Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0.

6.8 Simulaciones por dinámica molecular

Las coordenadas atómicas de la *TmGTasa* (PDB ID: 1LWJ) (Roujeinikova et al., 2002) fueron obtenidas del PDB (*RCSB Protein Data Bank*, s/f). Las estructuras fueron visualizadas y analizadas con UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004), VMD (Humphrey et al., 1996), Pymol (Schrödinger, Inc., E.U.A) y Coot (Emsley et al., 2010; Emsley & Cowtan, 2004). La variante con el asa 130s recortada fue modelada en el servidor *Swiss-Model* (Waterhouse et al., 2018) usando como referencia la estructura cristalográfica de la *TmGTasa* (PDB ID 1LWJ) (Roujeinikova et al., 2002). La calidad del modelo resultante fue evaluada con la herramienta “*Structure Assessment*” disponible en el servidor *Swiss-Model* (Swiss-Model, s/f). El modelo de la mutante simple (W131G) y la protonación del D186 (nucleófilo) se realizó en el servidor CHARMM-GUI (Brooks et al., 2009; Jo et al., 2008; Lee et al., 2016). El campo de fuerza

charmm36m (Brooks et al., 2009) fue usado para la minimización de energía y las simulaciones de dinámica molecular (DM). La minimización se realizó con CHARMM47 (Hynninen & Crowley, 2014) con 50 pasos descendientes para los hidrógenos, seguidos de 100 pasos de un gradiente de minimización conjugado para toda la proteína. Posteriormente, la hidratación se realizó con el modelo de aguas explícitas TIP3P en una caja cúbica con 15 Å de distancia desde los bordes de la superficie de la proteína.

Los sistemas se neutralizaron con la adición de NaCl hasta alcanzar una fuerza iónica de 150 mM. Las correcciones para los residuos aromáticos (WYF) y la repartición de masas para los átomos de hidrógeno fueron considerados (Hynninen & Crowley, 2014). Antes de la producción de la dinámica molecular se realizó una minimización (no restringida) de 5000 pasos usando el algoritmo “*steepest descent*”, seguido de un equilibrio de 1 ns del solvente en un ensamble NVT (número de partículas, volumen y temperatura constante). Posteriormente, se realizó una simulación sin restricciones durante 1 ns en condiciones NPT (número de partículas, presión y temperatura constantes) para el sistema completo. La temperatura de la simulación fue de 343 K y la presión de 1 atm. Las interacciones de van der Waals fueron calculadas con un valor de corte de 12 Å con una función de cambio basada en el campo de fuerza. Las interacciones electrostáticas fueron calculadas por el método de Ewald (Hynninen & Crowley, 2014) con un tamaño de malla de 12 Å. El algoritmo de LINCS (Hess et al., 1997) fue usado para restringir la distancia de los enlaces con hidrógeno. La simulación fue realizada con un paso de 4 fs. La temperatura constante fue controlada por el termostato de Nose-Hoover y la presión por el barómetro de Parrinello-Rahaman con una compresibilidad de $4.5e-5$. Las simulaciones fueron corridas con GROMACS (*GROningen MACHine for Chemical Simulation*) versión 2020.4 (James et al., 2015) como tres réplicas independientes cada una de 400 ns.

Los valores de pK_a fueron calculados con el programa PROPKA 3.5.0 usando las cargas por defecto (PARSE) (H. Li et al., 2005) para el último marco de cada 100 ps de la simulación. El análisis de las simulaciones se realizó con las herramientas propias de GROMACS (RMSF, RMSD, agrupamiento). Los valores de RMSF se determinaron sobre los carbonos alfas respecto a la estructura promedio de este intervalo de tiempo. Los valores de RMSD también se determinaron sobre los carbonos alfas, pero con respecto a la estructura inicial de cada corrida. Los agrupamientos se realizaron con un valor de corte de 2 Å sobre los carbonos alfa. Los cálculos de puentes de hidrógeno se realizaron con un valor de corte sobre los átomos pesados de 3.4 Å y sin restricción de ángulos. Los contactos sobre los carbonos alfa de los

átomos del asa que sobresale del dominio B y los del resto de la proteína fueron calculados con CHARMM47 usando un valor de corte de 6 Å.

7. Resultados

7.1 Mutantes de la *TmGTasa*

La *TmGTasa* de la familia 13 de las glicosil hidrolasas (GH 13) es la proteína modelo usada en este trabajo. Esta tiene la capacidad de estar involucrada en la degradación del almidón, aunque para que la reacción ocurra en una extensión apreciable el medio debe contener un nucleófilo aceptor con al menos dos unidades de glucosa (Liebl et al., 1992). Adicionalmente, esta enzima se caracteriza por ser estable ante los cambios de temperatura y pH, presentando su actividad óptima entre los 60-70 °C y alrededor de la zona de pH neutro. También es una proteína que ha sido cristalizada con resoluciones de alrededor de 2.5 Å, en ausencia y presencia del inhibidor competitivo acarboxa, el cual delimita su sitio activo (Roujeinikova et al., 2001, 2002). No solo han sido determinadas las estructuras tridimensionales de la *TmGTasa*, sino también de otras amilasas con especificidades similares o diferentes. Tal es al caso de la amilasa de *T. petrophila*, que se obtuvo con una resolución de 2 Å (Hameed et al., 2017), y que es usada como referencia de una estructura hidrolítica.

En este trabajo se analizaron las estructuras de dos enzimas que pertenecen a la familia GH13, la *TmGTasa* (transglicosílica) y la α -amilasa de *T. petrophila* (enzima hidrolítica) (Figura 6, panel superior). Al comparar sus secuencias se encontró que solo tienen un 33.56 % de identidad de secuencia; sin embargo, sus plegamientos son más conservados, sobre todo en la región que comprende el dominio catalítico (Figura 8, panel central). La superposición de las estructuras 3D se realizó con el algoritmo *matchmaker* implementado en el programa Chimera. Este método se basa en un alineamiento entre las secuencias de las dos proteínas que se comparan, y posteriormente ajusta los pares de residuos usando alguno de los átomos que los conforman, generalmente el carbono alfa (Calfa) (Meng et al., 2006). El valor de RMSD entre los carbonos alfas superpuestos en la *TmGTasa* y AmyS resultó de 0.997 Å, pero entre todos los pares de Calfa este valor se incrementó hasta 4.831 Å.

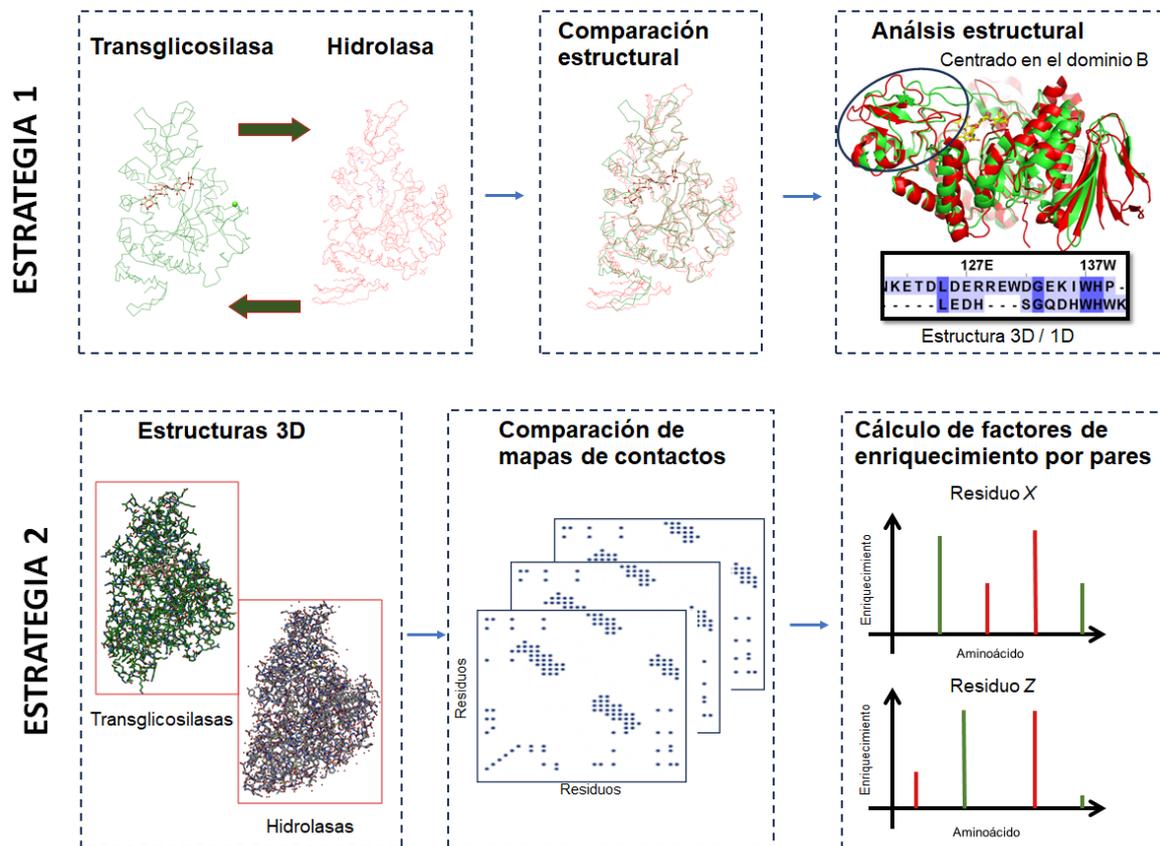


Figura 6. Estrategias generales para la identificación de residuos relacionados con la especificidad de reacción en enzimas de la familia GH 13. Panel superior: La estrategia 1 implica la comparación estructural de la *TmGTasa* con una enzima hidrolítica. El análisis estará centrado en el dominio B (encerrado con líneas azules), el que es más diverso en términos estructurales. Panel inferior: La estrategia 2 contemplará la comparación de dos subfamilias con diferentes especificidades de reacción para la identificación de residuos en contacto en la estructura 3D que estén asociados a la preferencia hacia las reacciones de hidrólisis o transglucosilación.

La distribución de los valores de RMSD a lo largo de los residuos superpuestos en ambas proteínas indica que estos pueden ser cercanos a los 5 Å en algunas regiones. Aunque como promedio el RMSD oscila alrededor de 1 Å, en las regiones que comprenden los residuos entre 100-150 y de 200-250 y alrededor de 325 esta desviación puede alcanzar los valores máximos (entre 2- 5 Å) (Figura 7, panel izquierdo). Sin embargo, las regiones con menor RMSD están presentes en la mayor parte de la estructura de la proteína, sobre todo la región que comprende el dominio catalítico (Figura 7, panel derecho).

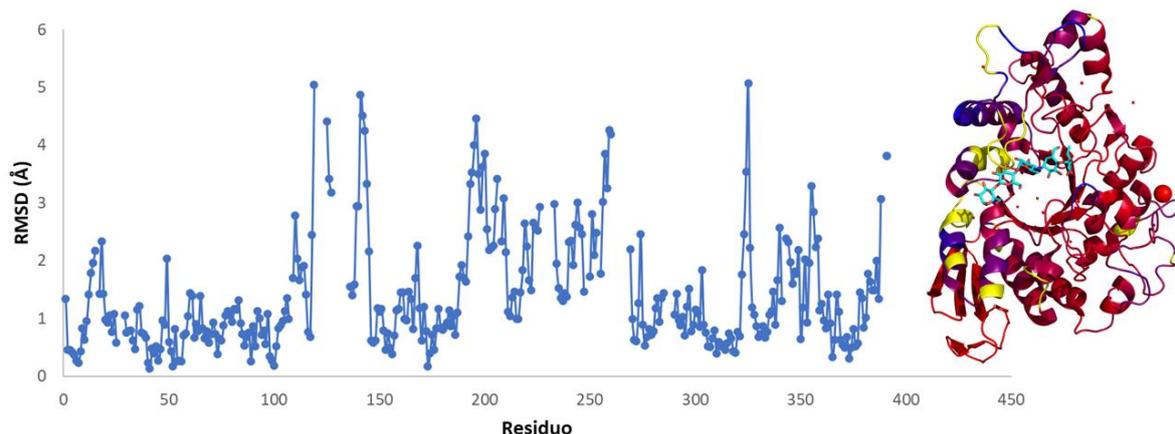


Figura 7. Valores de RMSD por residuos obtenidos del alineamiento estructural entre los Ca de la *TmGTasa* (PDB ID 1LWJ) y la AmyS de *T. petrophila* (PDB ID 5m99); el cálculo se realizó con el programa *Coot* (panel izquierdo). Estructura de la *TmGTasa* coloreada en función de los valores de RMSD desde 0 Å (rojo) hasta 5 Å (azul); las regiones mostradas en amarillo no tuvieron equivalente en la estructura de la AmyS de *T. petrophila* (panel derecho).

La primera estrategia se centró en la búsqueda de diferencias estructurales en el dominio B de la proteína a nivel de tipo de estructura secundaria, extensión y secuencia aminoacídica, además de su relación con el sitio catalítico (Figura 6, panel superior). Este análisis permitió la identificación de una región en la *TmGTasa* que comprende un asa protuberante que se extiende desde el dominio B hacia las inmediaciones del sitio activo de la enzima; este elemento estructural es un asa que comprende los residuos 116-137 (denominada asa 130s) posiciona el W131 hacia los subsitios positivos de la enzima; de esta forma funciona como una especie de tapa que controla el flujo de los sustratos hacia el sitio activo de la enzima (Figura 8, panel derecho). Este elemento estructural recuerda la configuración de otras transglicosidasas (Light et al., 2017; Xiang et al., 2021). En función de esta diferencia, se decidió sustituir el W131 por una G para evaluar su efecto en la especificidad de reacción de esta GH. Adicionalmente, se construyó una variante en la que se acortó el asa protuberante de la *TmGTasa* (delección de los residuos N120-D124 y R129-W131) para que fuese más parecido al equivalente en la enzima hidrolítica AmyS (Figura 8, panel central y derecho).

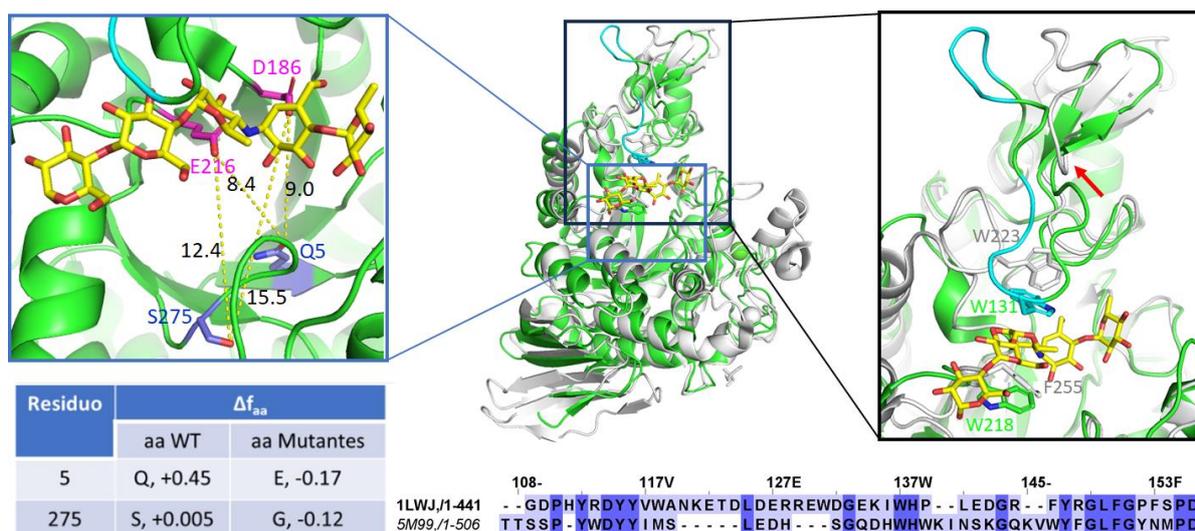


Figura 8. Panel central: superposición estructural de la *TmGTasa* (PDB ID 1LWJ, verde) con la *AmyS* (PDB ID 5M99, gris). Panel izquierdo: modificaciones del dominio A en las posiciones 5 y 275 (azul) propuestas en función de los factores de enriquecimiento. En líneas punteadas se muestra la distancia (en Å) de estos residuos a los que conforman el sitio activo, el cual está delimitado por la acarbosa (amarilla) y por los residuos catalíticos (magenta). Panel derecho: región del asa protuberante del dominio B que se va a recortar que contiene el residuo W131 en su punta, el cual interactúa con la acarbosa junto con el W218. El lazo equivalente en *AmyS* se indica con una flecha roja, así como los residuos equivalentes a los Trp131 y 218.

Para identificar la distribución de este asa protuberante extendido desde el dominio B entre miembros de la familia GH 13 se realizó un alineamiento múltiple de secuencia (MSA) entre proteínas previamente reportadas con una preferencia hacia la hidrólisis o la transglicosilación (Arreola-Barroso et al., 2021). En el caso de las enzimas hidrolíticas existen varios (aproximadamente 25 estructuras) miembros que al parecer presentan una delección en esta región de la estructura, la que no parece estar presente en el caso de las transglicosídicas (Figura 9).

Hidrolasas

1LWJ	108	G	DPHYRDYYWANKETD	DERREWDGEK
1AVA	115	RLDWGPHMICRDDR	YADGTGNP
1EA9	257	NGEKSKYKDFHIRSL	PLEVVDG
1G94	102	..SFGNKSFP..IYSPQD	FHES	CT
1GCV	131	AGQGFWRNDCADPGNY	PDCDDG
1HT6	116	RLDWGPHMICRDDTKY	SDGTANL
1HX0	118	YCNPGNREFPAVPYSA	WDFNDGK	CKTA
1J0H	261	NGESSKYKDFHIHEFPL	QTEP
1JAE	112	SADHDGMNYPVYPYSGD	FHS
1J11	288	ESQSSPWYNYTYFTWPD	SYAS
1M7X	246	YEHSDPREGYHQDWN	TLINYGR
1MWO	128	WTDFSKVASGKYTANY	LDFHPN
1QHO	150	YNNGTYMGNYFDDATK	GYFHHNG	DIS
1SMA	261	NGAASRYKDFHIREFPL	QTEP
1SMD	118	YFNPGSRDFPAVPYSG	WDFNDGK	CKTG
1UA7	116	NWTHGN
1UD2	150	YSDFKWRWFHFGVDW	DQRYQEN	HIFRFAN
1VJS	150	YSDFKWRWYHFDGTDW	DESRKLN	RIYKFG
1WPC	152	HSSFKWRWYHFDGVDW	DQSRRLNNRIYKFRG
1WZA	120	DKNSEYRDYYWAGPDT	DTKETK	LDGGR
2D20	258	KGEQSRYKDWFFIEDFP	VSKTS
2DIE	152	HSNFKWRWYHFDGTDW	DQSRQLQNKIYKFRG
2GJP	152	YSDFKWRWYHFDGVDW	DQSRQFNRIYKFRG
2YA0	302	TPRTSFGGRLGTTTHMT	KRLLIDS	SIKYLVD
2ZE0	117	SRDNPKRWDYIWRDGK	DGREGPNWESIFGG
3BC9	272	YSNFTWNGQCFDGTDD	DYSKES	GKYLFE
3BH4	148	YSDFKWRWYHFDGADW	DESRKIS	RIFKFRG
3DC0	116	NWTHGN
3EDJ	237	PDWINYGGKFVPTQHHR	VAVQDP
3VGF	206	YFSQKYKTPWGLTFNF	DDEAESDE
3WN6	116	RLDWGPHMICRDD	.PYGDGTGNP
3WY2	119	NRTNPKADWFVWADPK	PDGTPPNWLSIFGG
4AEE	362	FLSPPPKEIIVLMLKY	IDGEECRSRELYKLD
4AEF	324	KGESSFKNFYRIKFPV	VSKFLQILHSKSS
4E20	132	KDWFHPKKEIFDWNQ	TQLENG
4GKL	113	...KHPEWFLRDENGN	PTRKVP
4UZU	151	YSSFKWRWYHFDGVDW	DESRKLS	RIYKFRG
5A2B	165	KDWFHEKKDIFNWANQ	QEVENG
5H06	174	DGWRLDQAYQVPTA	WTAIRASVDEASKSVTY	VNSKGEAVNPLG
6A0J	156	NEADSAYVWVFSVEGFP	VTAHP
6B56	177	GAAGYNAAEWFQVSD	ETAIVKGLLKFTLDWSN	APSPILVVSTGKKAEDN	PDGTGTDNAKYL
7TAA	137	FKPFSSQDYFHPFCFI	QNYEDQT

Transferasas

1LWJ	70	REFKEMIEAFHDSG	IKVVL	DLPIHHTGFLHTWFQK	ALKGDPHYRDYYWANKETD	DERREWDGEKIWHPLE
1CDG	116	ADFQNLIAAAHAKN	IKVVIDFAPNHTS	PASSDQPSFAENGR	LYDNGTLLGGYTND	TQNLFHHNGGDTFSTTE
1CGT	116	ADFQNLITTAHAKG	IKVVIDFAPNHTS	PAMETDTSFAENGR	LYDNGTLVGGYTND	TNGYFHHNGGSDFSLE
1CYG	112	SDFQRLVDAAHAKG	IKVVIDFAPNHTS	PASETNPSYMENGR	LYDNGTLLGGYTND	ANNYFHHNGGTTFSSE
1GJU	120	FKMMLLLPFVKS	LADAIYLLPVS	RMSDLFKKGDAPSP	YSVKNPMELDERYHDPL	LEPFKVDDEEFKAFVEAC
1LWJ	70	REFKEMIEAFHDSG	IKVVL	DLPIHHTGFLHTWFQK	ALKGDPHYRDYYWANKETD	DERREWDGEKIWHPLE
1V3M	116	QDFKNLIDTAHAHN	IKVVIDFAPNHTS	PASSDDPSFAENGR	LYDNGNLLGGYTND	TQNLFHHYGGDTFSTIE
2VR5	99	FNPKNVLIDPYAKA	INGSVIWDAVFGYK	IGDQDQDLTYDERD	SGEYVP..KSVV	INPYFEWDDDEFIKGKK
3BMV	117	TDFQNLINTAHAHN	IKVVIDFAPNHTS	PASETDPTYAENGR	LYDNGTLLGGYTND	TNGYFHHYGGDTFSSYE
4JCL	116	ADFQNLIDTAHAHN	IKVVIDFAPNHTS	PADRDNPGFAENGM	YDNGSLLGAYSND	TAGLFHHNGGDTFSTIE
4JCM	141	DDFSRLIETAHAHD	IKVVIDFVPNHTS	PVD.....	IEDGALYDNGTLLGHYSTD	ANNYFYNYGGSDFS

Figura 9. Alineamiento múltiple de secuencia (MSA) de la *TmGTasa* con enzimas hidrolíticas (panel superior) y con enzimas transglicosídicas (panel inferior). Este grupo de enzimas fueron las mismas usadas para el análisis de la conservación de los contactos (Arreola-Barroso et al., 2021). En cada uno de los MSA se encerró en un recuadro azul las regiones que comprenden el asa 130s donde se encuentra el residuo W131, la que parece ser una

delección en algunas de las enzimas hidrolíticas. En el caso de las transglicosidasas se resaltan en negrita los residuos con mayor nivel de conservación.

Otras variantes fueron concebidas a partir de una segunda estrategia que contempló los perfiles de los residuos aminoacídicos en residuos en contacto en el dominio A, el cual se basa en el cálculo de un parámetro denominado factor de enriquecimiento (Δf_{aa}) (Arreola-Barroso et al., 2021). Para este estudio se consideraron 41 enzimas hidrolíticas y 37 transglicosídicas (Figura 6, panel inferior). Entre los elementos considerados para la elección de los sitios a modificar se encuentran que: (1) las diferencias en los factores de enriquecimiento sean de al menos 0.2, (2) que los residuos se encuentren distantes de los residuos catalíticos, y (3) preferencialmente que se encuentren localizados en regiones flexibles a la entrada del sitio activo. A partir de este análisis se identificaron los residuos Q5 y S275, los cuales de acuerdo con la frecuencia encontrada en enzimas hidrolíticas deberían ser cambiados a E (Δf_{aa} desde +0.45 a -0.17) y G (Δf_{aa} desde +0.005 a -0.12), respectivamente. Estos residuos se encuentran alrededor de 10 Å alejados del sitio activo de la enzima, el cual está delimitado por el inhibidor competitivo acarbosa y los residuos catalíticos (Figura 8, panel izquierdo). En función de los Δf_{aa} en el dominio catalítico, se planteó la construcción de variantes combinatorias del par Q5-S275 (8 variantes incluyendo la combinación con las formas silvestres en cada una de las posiciones) que se encuentran en contacto en la estructura 3D y que muestran un perfil de aminoácidos diferente en hidrolasas y transferasas. Esto se relaciona con que en la posición 5 existen las posibilidades de encontrar los residuos Q y E; en la posición 275 es posible encontrar cuatro residuos aminoacídicos: G, W, A y G.

7.2 Construcción de las mutantes

El gen de la 4- α -glucanotransferasa de *Thermotoga maritima* (*TmGTasa*) fue el usado como templado en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). Este se encuentra entre los sitios de corte de las enzimas de restricción NdeI y XhoI. Por ello se procedió a la purificación del vector pET22b(+)_AmyA (contiene el gen de la amilasa de *T. maritima*) para la ligación con los genes mutados de la *TmGTasa* (Figura 10). Tal como ocurre en el caso de plásmidos de *E. coli*, este vector produce varias bandas al ser analizado por electroforesis en geles de agarosa, lo que corresponde con la forma superenrollada de este DNA.

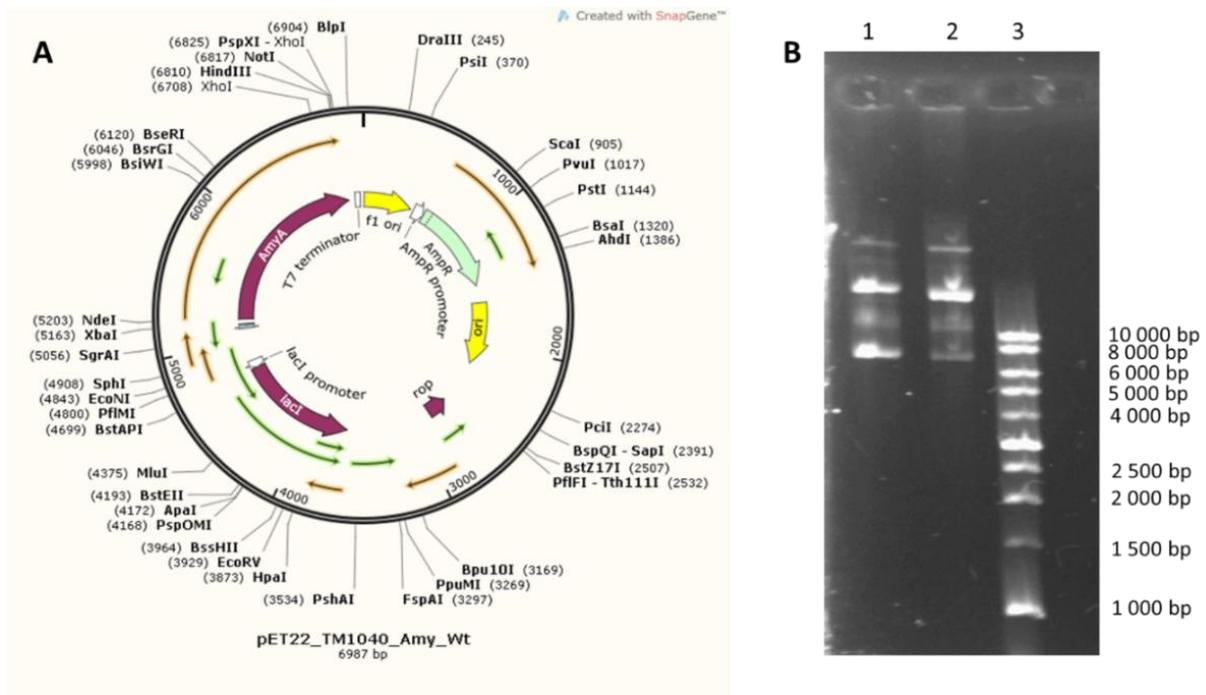


Figura 10. Vector pET22b(+)_{AmyA} usado para la clonación del gen de interés luego de la digestión con las enzimas de restricción correspondientes. (a) mapa del vector representado con el programa Snap Gene. (b) Purificación de pET22-AmyA para obtener el vector luego de la digestión con enzimas de restricción. Carril 1: lote 1 del vector purificado, 350 ng; carril 2: lote 2 del vector purificado, 350 ng; carril 3: marcador de masa molecular (1 kb DNA Ladder, Maestrogen Inc., Taiwán).

Las mutantes de la *TmGTasa* construida en este trabajo fueron las correspondientes a las Estrategias 1 y 2 mencionadas en acápite 6.1, las que incluyen: (1) la modificación del dominio B (sustitución del W131 por G y acortamiento del asa que contiene este W131) y (2) el cambio de residuos aminoacídicos en las posiciones 5 y 275. El procedimiento empleado para introducir este cambio en el gen implica la amplificación del gen en dos fragmentos con la mutación W131G, los que posteriormente se extenderán mediante PCR (Anexo 3).

La generación de los fragmentos F1 y F2 coincidieron con el número de pares de bases esperado en ambos casos (Figura 11a). Finalmente, la extensión de los dos fragmentos para la obtención del gen completo dio un producto con una talla correspondiente al gen de la *TmGTasa*, en este caso con la mutación W131G (Figura 11b).

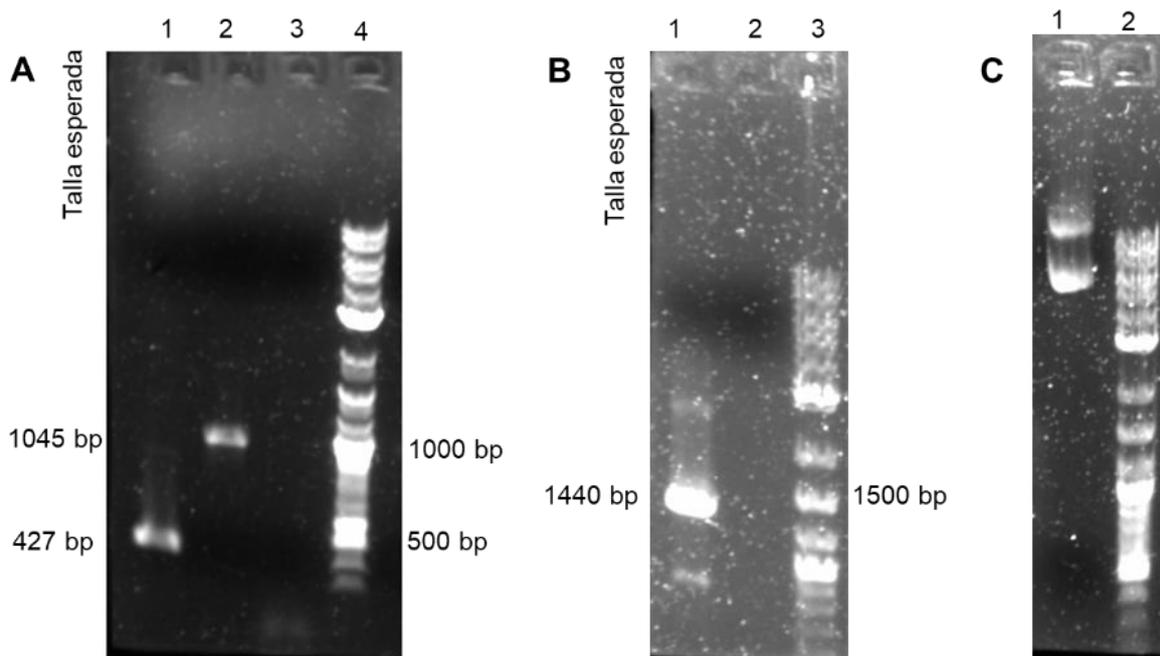


Figura 11. Electroforesis en gels de agarosa de la construcción de la variante W131G de la GTasa de *T. maritima*. (a) amplificación por PCR de los fragmentos 1 (F1) y 2 (F2) del gen. Carril 1: fragmento F1; carril 2: fragmento F2; carril 3: control negativo; carril 4: marcador de masa molecular. (b) Análisis del PCR de ensamblado de los fragmentos F1 y F2. carril 1: gen de la GTasa con la mutación W131G; carril 2: control negativo; carril 3: marcador de masa molecular. (c) Chequeo de la variante W131G-pET22b(+). Carril 1: plásmido purificado; carril 2: marcador de masa molecular.

La presencia del gen en las construcciones genéticas fue detectada mediante la realización de PCR de colonias usando el DNA plasmídico como templado. En todas las colonias evaluadas se detectó la presencia del gen ya fuese con el uso de un oligonucleótido propio del gen y el DNA proveniente de cada colonia (Figura 12a) o de ambos oligonucleótidos universales (T7s) usando los plásmidos purificados (Figura 12b). Adicionalmente el plásmido con el gen (tamaño esperado: 6690 bp) fue purificado y su perfil electroforético corresponde con el esperado para este tipo de moléculas en su forma superenrollada (Figura 11c). La mutación realizada fue corroborada por secuenciación DNA plasmídico de una clona seleccionada.

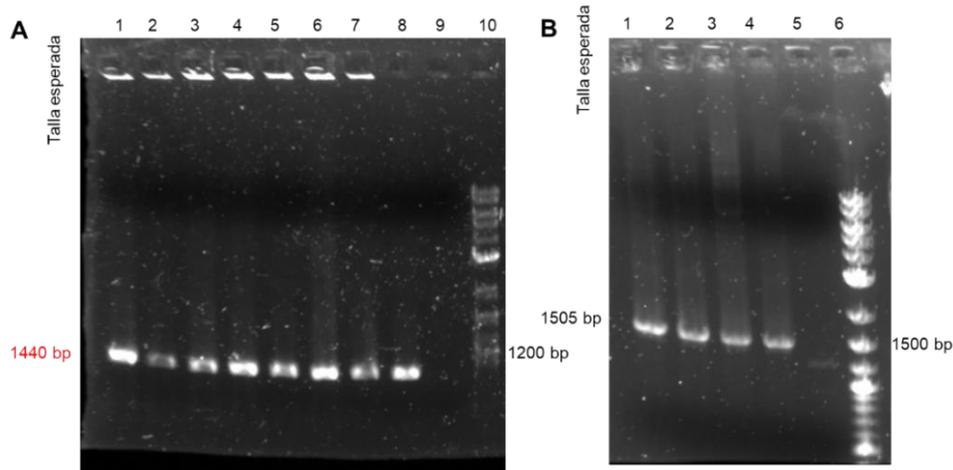


Figura 12. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de las PCR de colonia correspondientes a siete colonias de la mutante W131G de la *TmGTasa*. **(a)** El templado fue obtenido directamente de las colonias y los oligonucleótidos usados fueron los correspondientes a la región N-terminal y al T7 Rev. Carriles 1-7: colonias 1-7; carril 8: control positivo; carril 9: control negativo; carril 10: marcador de masa molecular. El número de pares de bases esperado para el amplicón es de 1440 bp. **(b)** Los vectores de la construcción de W131G fueron usados como templado. Los oligonucleótidos usados fueron los T7 Forw y Rev. Carril 1-3: productos de amplificación de las colonias 1-3; carril 4: control positivo; carril 5: control negativo; carril 6: marcador de masa molecular.

La construcción de la mutante de la *TmGTasa* con el asa acortada se realizó de forma semejante al procedimiento usado para la mutante simple (W131G). De igual manera fueron obtenidos los dos fragmentos (Figura 13a) que posterior a su extensión por PCR dio un producto con la talla esperada para el gen de la *TmGTasa* (Figura 13b).

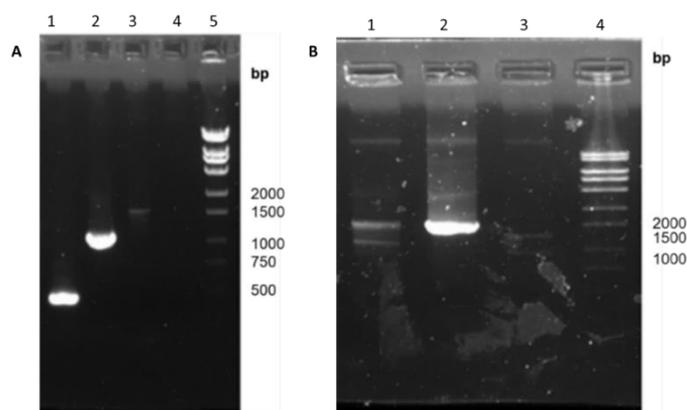


Figura 13. Electroforesis en geles de agarosa de los PCR para la obtención de los fragmentos (panel A) y del gen de la *TmGTasa* para la mutante con el asa 130s acortada (panel B). **(a)** carril 1, fragmento F1 de la *TmGTasa*, carril 2, fragmento F2 de la *TmGTasa*, carril 5, marcador de masa molecular. **(b)** carril 1, producto de la extensión

por PCR de los fragmentos F1 y F2, carril 2, control positivo de amplificación con el vector pET2b(+)*TmGTasa* como templado, carril 3, control negativo, carril 5, marcador de masa molecular.

Luego de la ligación del gen y la transformación en *E. coli* se identificaron dos colonias (la_1 y la_2) que contenían la construcción deseada (Figura 14).

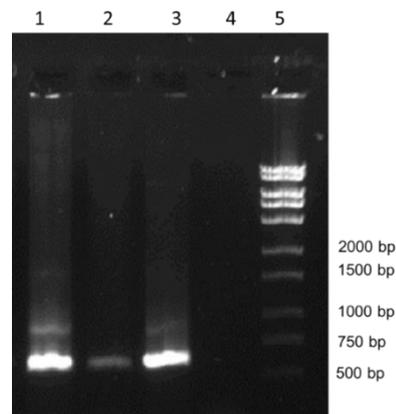


Figura 14. Análisis de los PCR de los plásmidos correspondientes a las colonias la_1 y la_2 (construcción con el acortamiento del asa del dominio B) para la *TmGTasa* usando un oligonucleótido del N-terminal y otro interno. Carril 1: colonia la_1; carril 2: colonia la_2; carril 3: control positivo; carril 4: control negativo; carril 5: marcador de masa molecular.

En la construcción de la variante Q5E/S275G/A/W se procedió a la obtención de dos fragmentos por PCR, los cuales posteriormente fueron extendidos por esta misma técnica para la obtención del gen completo (Figura 15). Luego de la ligación se transformó en *E. coli*, se realizó un cultivo en medio sólido por 16 h (Figura 16a). De alrededor de 80 colonias obtenidas fueron analizadas cuatro por PCR para identificar la presencia del gen de interés (Figura 16b).

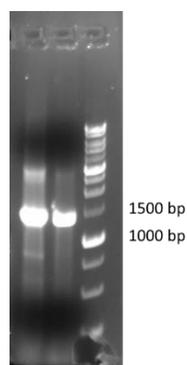


Figura 15. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa del inserto de la región 2 sin purificar (carril 1) y purificado (carril 2). Carril 3: marcador de masa molecular de 1 kb.

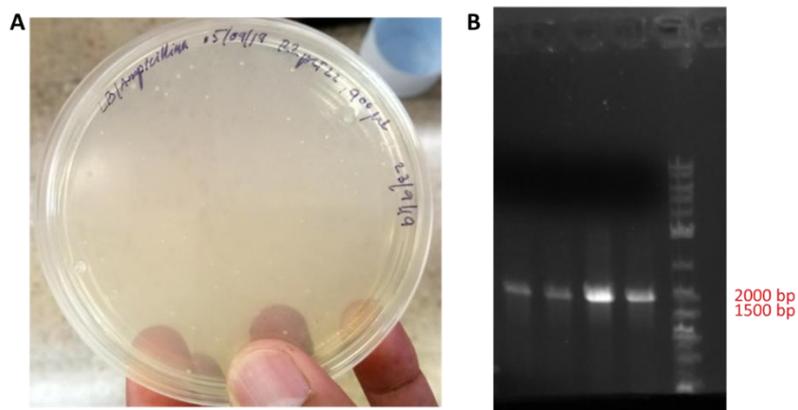


Figura 16. Obtención de colonias con el plásmido que contiene las mutaciones en las posiciones 5 y 275 de la GTasa. (a) colonias obtenidas por la transformación con la ligación de R2-pET22b(+) (100 μ L) en *E. coli* MC1061. (b) PCR con los oligonucleótidos T7 *Forward* y *Reverse* de cuatro plásmidos escogidos al azar.

7.3 Cambios de la especificidad de reacción en la *Tm*GTasa por cambios en el dominio B

El efecto de las mutaciones del dominio B en la especificidad de reacción fue analizada mediante la determinación de las actividades transglucosídica e hidrolítica. En el caso de la reacción de transglucosilación esta se midió por medio de la formación de un complejo entre el yodo yodurado con el almidón que no tomó parte en la reacción. El análisis cinético con concentraciones distintas de maltosa, manteniendo constante la concentración de almidón permitió la determinación de la K_m para la maltosa y la V_{max} para la reacción de pseudo primer orden. Estas curvas indican que hubo una reducción de la V_{max} de alrededor de 10 veces en las variantes respecto a la forma silvestre (WT) de la proteína (Figura 17). Por otro lado, los valores de K_m se redujeron en alrededor de un 50 % respecto al valor de la WT (Tabla 2, Figura 17). Aunque la diferencia entre las K_m fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) sus valores solo se modificaron discretamente manteniéndose en el mismo orden de magnitud.

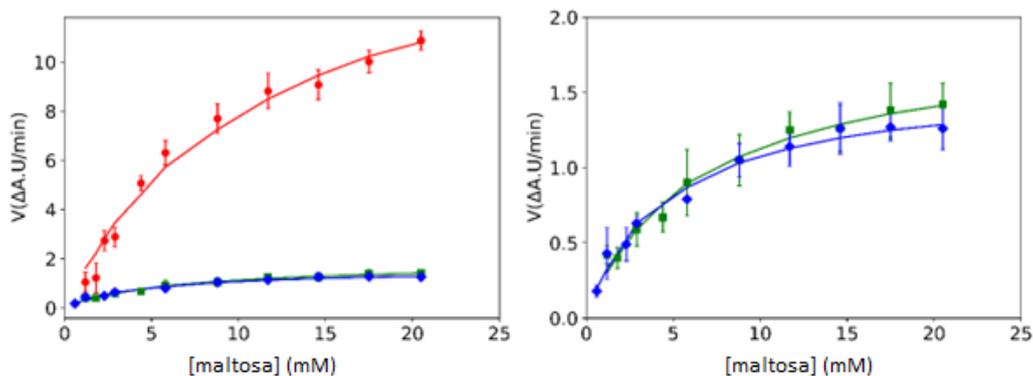


Figura 17. Ajuste de Michaelis-Menten para la reacción de transglicosilación de las variantes de *TmGTasa* en las que se mantuvo constante la concentración de almidón (0.93 %) y se varió la de maltosa. (a) WT (círculos rojos), W131G (cuadrados verdes), asa truncada (rombos azules), (b) ampliación de los gráficos para la mutante sencilla W131G y la variante con el asa recortada. Los valores se muestran como el promedio \pm error producto de tres réplicas independientes.

La reacción de hidrólisis, medida como la aparición de azúcares reductores, mostró un discreto aumento de 20 % y 7 % para las variantes del asa 130s recortada y W131G, respectivamente. En el caso de la mutante sencilla hubo una elevada dispersión, por lo que el valor promedio obtenido no tuvo una diferencia estadísticamente significativa respecto de la WT. Sin embargo, y principalmente debido a la reducción de la actividad transglicosídica (alrededor de 90 %), para ambas mutantes se obtuvo un incremento de la relación de H/T de alrededor de 11 veces, comparado con la forma WT (Tabla 2). Este resultado indica la contribución del W131 en la estabilización del estado de transición de esta enzima.

Tabla 2. Parámetros enzimáticos para la reacción de transglicosilación y de hidrólisis de las variantes de la *TmGTasa*. Los valores son representados como promedio \pm desviación estándar resultado de tres réplicas experimentales. H representa a la reacción de hidrólisis y T la de transglicosilación.

Proteína	H Glucosa/L·min·mg Enzima)	(Eq T (U/(min mg enzima))) ^a	K_m^T (mM)	V_{max}^T / K_m^T (U/(min mM maltosa mg enzima)	H/T	Incremento H/T (relativa a la WT)
WT	$(2.52 \pm 0.58) \cdot 10^{-4}$	5723 \pm 423	11.9 \pm 1.8	400 \pm 90	$4.4 \cdot 10^{-8}$	
Asa recortada	$(3.09 \pm 0.58) \cdot 10^{-4}$	615 \pm 34	4.7 \pm 1.0	130 \pm 35	$5.0 \cdot 10^{-7}$	11.4
W131G	$(2.71 \pm 1.4) \cdot 10^{-4}$	530 \pm 54	6.3 \pm 1.5	84 \pm 29	$5.1 \cdot 10^{-7}$	11.6

7.4 Cambios estructurales asociados con las mutaciones en el dominio B de la *TmGTasa*

Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que la W131G podía ser una variante menos estable de la enzima debido a la dispersión de su actividad. Por esta razón decidimos estudiar la estabilidad de las tres variantes por diroísmo circular (CD) y electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Los espectros de CD fueron similares para las tres especies en la región alrededor de los 222 nm, la que es un indicativo de las estructuras helicoidales. Sin embargo, en el caso de la sustitución W131G se observó un aumento de la

señal en los alrededores de los 210 nm lo que pudiera indicar la conversión hacia hojas beta y la agregación en esta variante de la proteína (Figura 18a).

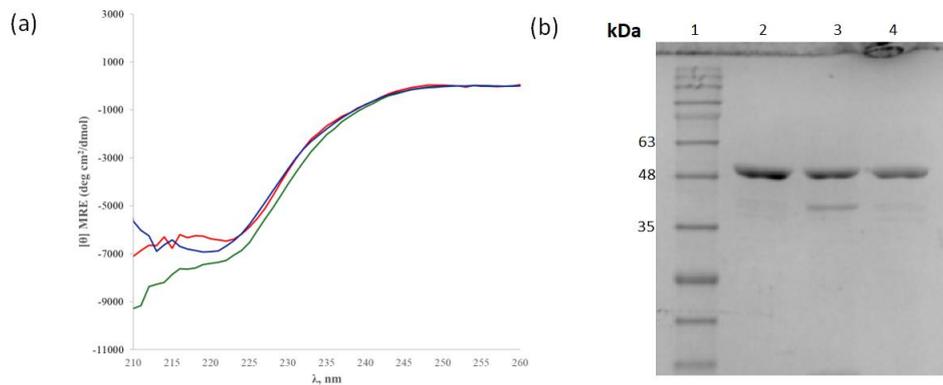


Figura 18. Caracterización estructural de las variantes de la *TmGTasa*. **(a)** espectro de CD para las especies de la *TmGTasa*. WT (roja), W131G (verde), y asa 130s recortada (azul) **(b)** análisis por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de las proteínas purificadas. carril 1: marcador de masa molecular, carril 2: WT, carril 3: W131G y carril 4: variante asa 130s recortada. En cada uno de los casos se aplicaron 1.6 µg de proteína.

En el análisis por SDS-PAGE, aunque la forma WT y del asa 130s acortada de la proteína mostraron una banda única, la W131G tuvo una degradación con una diferencia de talla de aproximadamente 9 kDa de acuerdo con su R_f (Figura 18 y Figura 19). El análisis de densitometría de las bandas observadas en el gel muestra que esta degradación con una masa molar aparente de 41 kDa correspondió a un 17 % en la preparación recién purificada de la enzima con la mutación sencilla (Figura 20).

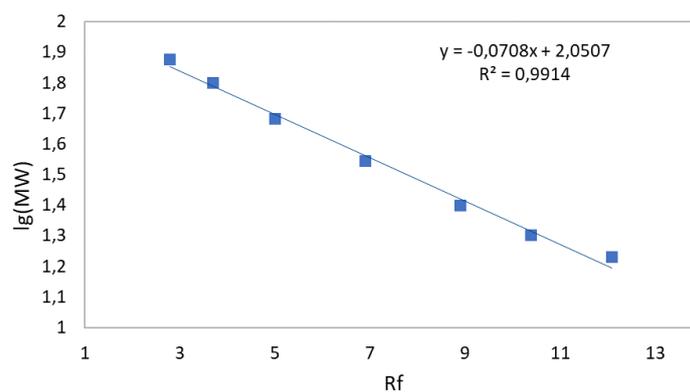


Figura 19. Relación entre el masa molar (MW) y la movilidad (R_f) de las proteínas en un sistema de electroforesis en condiciones desnaturalizantes. La calibración se realizó con las proteínas que conforman el marcador de masa molar.

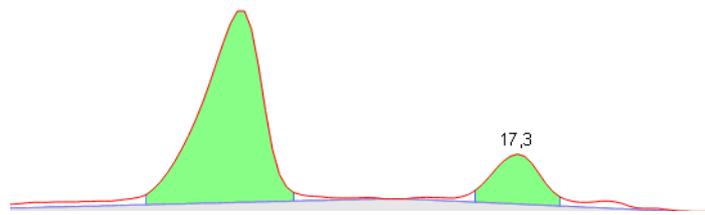


Figura 20. Análisis densitométrico con el programa Image Lab del carril 3 de la Figura 18.

Debido a la posible degradación o pérdida de actividad producto de las mutaciones en las dos variantes de la *TmGTasa* se realizó un estudio de sus estabildades a 70 °C. Al cabo de este tiempo se mantuvo más del 50 % de la actividad y la velocidad con que disminuyó la actividad en el tiempo fue similar en las tres proteínas (Figura 21). Sin embargo, en el caso de la proteína con el asa 130s recortada, a las 6 h se incrementó la actividad, la que posteriormente disminuyó a la misma velocidad con que estaba ocurriendo esta pérdida de actividad hasta las 4 h de incubación (Figura 21).

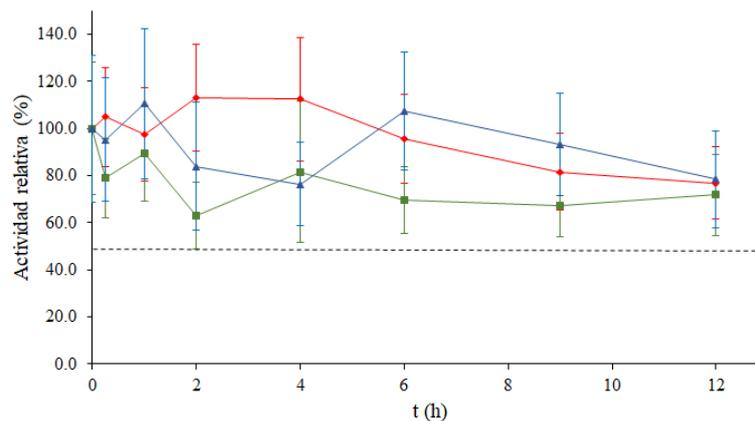


Figura 21. Determinación de la actividad enzimática de las variantes WT (rojo), W131G (verde) y del asa 130s acortada (azul) de la *TmGTasa* luego de diferentes tiempos de incubación a 70 °C.

Los valores de la actividad relativa en el tiempo en el estudio preliminar de estabilidad térmica no permitieron el cálculo de los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) de cada una de las variantes del dominio B de la *TmGTasa*. Esto fue debido a que no hubo un comportamiento lineal cuando se ajustaron los datos a un modelo cinético de primer orden (Figura 22).

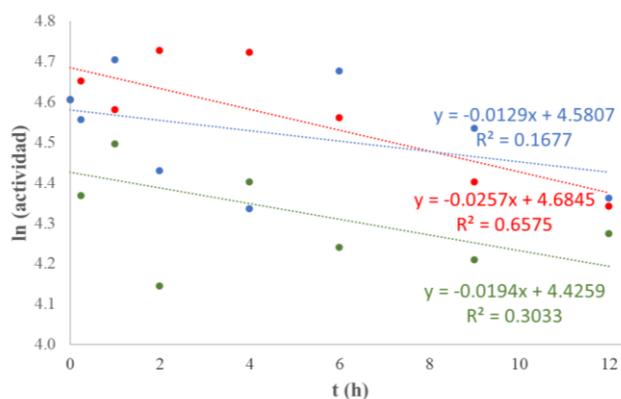


Figura 22. Ajuste a un modelo cinético de primer orden de los valores de actividad enzimática de las variantes WT (rojo), W131G (verde) y del asa 130s acortada (azul) de la *TmGTasa* luego de diferentes tiempos de incubación a 70 °C.

7.5 Simulación por dinámica molecular

En base a las diferencias en la especificidad de reacción observadas en las variantes de las *TmGTasa* respecto a la forma WT de la *TmGTasa* decidimos estudiar el efecto de las mutaciones realizadas en la dinámica de la proteína. Para ello se corrieron tres réplicas independientes de 400 ns y se calcularon distintos parámetros indicativos de la flexibilidad y dinámica de la proteína, entre los que se encuentran: el RMSD, RMSF y la distancias entre residuos que se encuentran en la entrada al sitio catalítico. Adicionalmente se calcularon los valores de *pKa* durante la simulación para distintos residuos que conforman el sitio catalítico para considerar el efecto del entorno en el que se ubican estos durante la catálisis.

Los valores de RMSD durante la simulación por DM indican que la proteína silvestre se estabilizó más cercana a las estructuras iniciales. Por el contrario, ambas mutantes se desviaron en mayor medida de sus estructuras iniciales, sobre todo en el caso de la variante del asa 130s recortada (Figura 23a). Estos resultados coincidieron con los obtenidos del algoritmo de agrupamiento usado, con un valor de corte de 2 Å sobre los carbonos alfa, en el que el 99.98 % de las conformaciones de la WT pueden ser representados con una única estructura (Figura 23b, panel izquierdo). En el mismo sentido, la variante W131G también puede ser representada con una sola estructura que cubre el 99.44 % de la población conformacional (Figura 23b, panel intermedio). Sin embargo, para la variante del asa 130s recortada se experimentaron cambios mayores durante la simulación, lo que se comprueba con la distribución del RMSD (Figura 23a) y las doce estructuras necesarias del agrupamiento para la representación del 98 % de la población (Figura 23b, panel de la derecha).

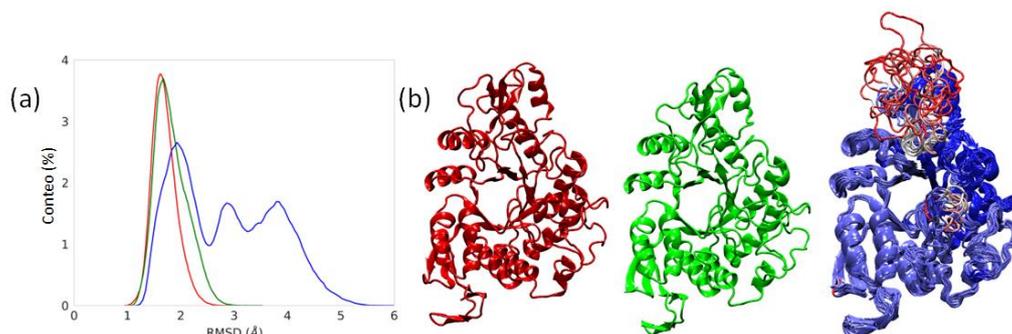


Figura 23. (a) Distribución de los valores de RMSD de la proteína WT (rojo), W131G (verde), y del asa 130s recortada (azul), (b) estructuras representativas de los agrupamientos que contienen al menos al 98 % de la población conformacional para la WT (rojo), W131G (verde) y asa 130s recortada (azul; las zonas más lábiles de esta estructura se muestran en color rojo).

Al igual que para el RMSD, el incremento de los valores de RMSF para estas proteínas es debido fundamentalmente al asa protuberante del dominio B y a uno cercano a la entrada del sitio activo (Figura 24a-b). De forma general, las fluctuaciones de estas asas están presentes en las tres variantes, pero se potencian en la variante con el asa 130s recortada en la que alcanza valores cercanos a 3 Å (Figura 24c).

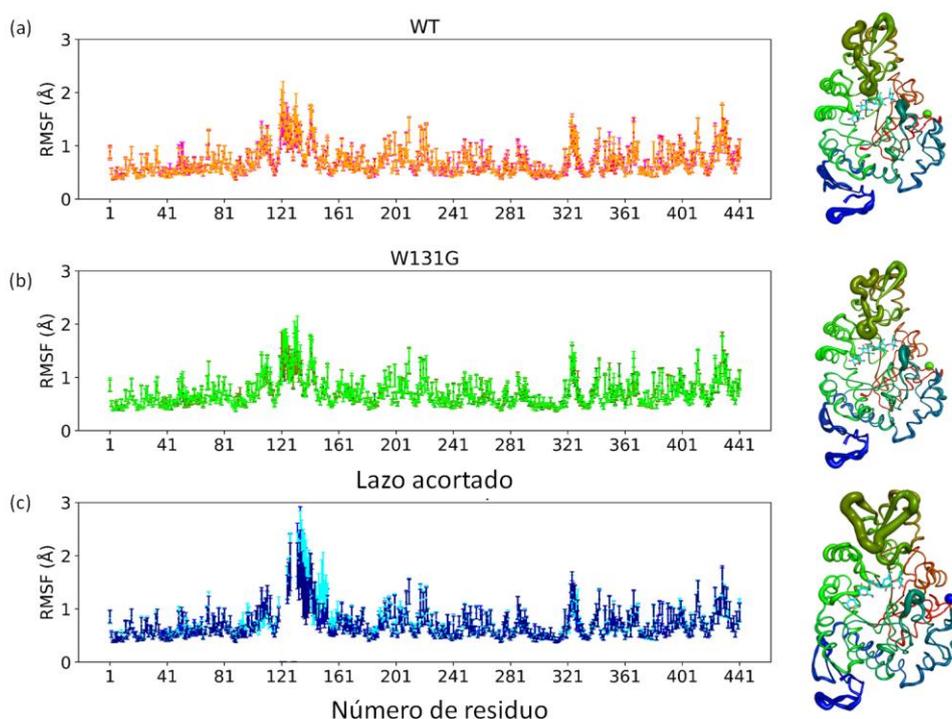


Figura 24. Fluctuación de la *Tm*GTasa en intervalos de 100 ps de la simulación de 400 ns. Valores de RMSF para la WT (a), W131G (b), y asa 130s recortada (c). En el lado derecho de cada una de las gráficas se muestran las representaciones estructurales basadas en los valores de RMSF para cada una de las formas de las proteínas. La

superposición de la acarbosa (color cian) desde la estructura cristalográfica (PDB ID 1LWJ) delimita el sitio activo de estas variantes de la enzima. Todas las estructuras están coloreadas desde el N-terminal (rojo) al centro (verde) y terminando el C-terminal (azul). La región con mayor fluctuación se encuentra entre los residuos 121-150 corresponde con el dominio B de la proteína y corresponde con las zonas más anchas mostradas en las estructuras correspondientes (panel derecho). Las esferas de cada una de las estructuras corresponden con el ion Ca^{2+} .

7.6 El asa más larga del dominio B funciona como una tapa del sitio activo

Se ha encontrado que los cambios conformacionales en el asa 130s de interés pueden estar mediadas por la interacción del W131 con K324, W218, H190, y F150 (Figura 25b–c). La distribución de los valores de las distancias entre el residuo de la posición 131 y la K324 sugiere que asociado con la mutación W131G se accede a conformaciones más abiertas (Figura 26). Esta sustitución se relaciona con la pérdida de las interacciones de van der Waals, aromáticas, y catión-pi, lo que termina favoreciendo el equilibrio hacia una conformación abierta (Figura 25e–f) respecto a la variante WT de la proteína (Figura 25a).

Contrario a lo esperado, el acortamiento del asa del dominio B no tuvo un efecto tan pronunciado como la sustitución del W131. Este comportamiento puede ser explicado desde los resultados de la DM debido a que el desorden del asa 130s recortada aun permite alternar entre una estructura abierta y otra cerrada, aunque estas ocurran en el contexto de una cavidad catalítica con mayor amplitud (Figura 25d).

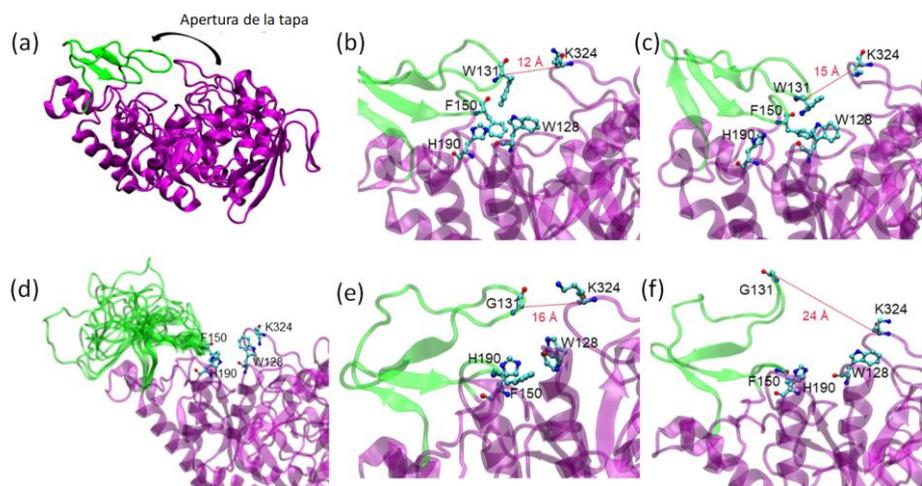


Figura 25. Cambios conformaciones en las variantes de la *TmGTasa*. (a) estructura original del PDB 1LWJ (b) interacciones fundamentales en la proteína WT resultando en una conformación cerrada (c) Interacciones en la WT que resultan en una conformación abierta (d) mutante con el asa 130s recortada pierde la interacciones principales y culmina en el asa 130s desordenada (e) Interacción en la mutante W131G que permiten la obtención

de una conformación cerrada (f) la variante W131G pierde las interacciones presentes en la WT produciendo una conformación con mayor apertura.

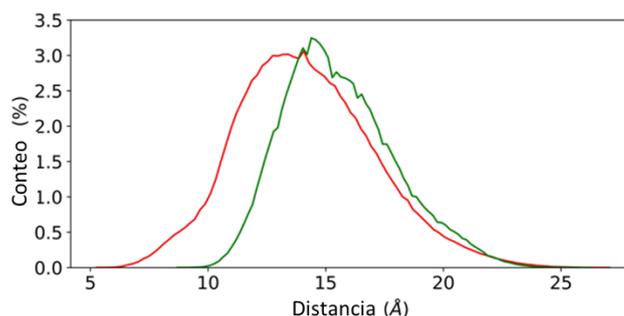


Figura 26. Histograma de las distancias entre los carbonos alfa de los residuos 131 y 324 para la *TmGTasa* WT (rojo) y W131G (verde).

7.7 Perfiles de actividad a diferentes pH para las mutantes del dominio B

El ambiente en el que se encuentran los residuos aminoacídicos ácidos o básicos delimita sus valores de pK_a , los que pueden cambiar en función de las conformaciones que adopte la proteína. En especial el E216 de la *TmGTasa* tiene un comportamiento dual: primero actúa como ácido en la primera parte de la reacción (glicosilación) para facilitar la salida del extremo reductor del carbohidrato que se va a modificar; en cambio, en la segunda parte de la reacción (desglicosilación) funciona como una base para incrementar el poder nucleofílico del agua (hidrólisis) o de otra molécula aceptora (transglicosilación) (Roujeinikova et al., 2002). Por esta razón en la glicosilación debe tener un pK_a elevado para poder encontrarse protonado mientras que en la desglicosilación su pK_a debe encontrarse en la zona ácida para que pueda aceptar el protón del nucleófilo que atacará el GEI. Este ciclo en los valores de pK_a de este residuo en particular es el que permite tener una enzima funcional. Por el contrario, el residuo nucleofílico (D186 en la *TmGTasa*) actúa en su forma básica por lo que su pK_a es bajo y no debe modificarse a valores lejanos al promedio reportados para este tipo de aminoácido. Para determinar el efecto de las mutaciones realizadas en el dominio B sobre las propiedades ácido-base de los residuos catalíticos (D186 y E216) se determinaron los perfiles de actividad enzimática en el rango de pH de 3-11. Los criterios que se consideraron para ajustar los datos experimentales a los diferentes modelos fueron los siguientes: (1) coeficiente de determinación (R^2), (2) presencia de “hombros” en las regiones ácidas/básicas de la curva, (3) valores residuales, (4) ajuste a los máximos de las actividades experimentales. El modelo de dos o tres grupos ionizables para las variantes WT y W131G se asociaron con un ajuste no adecuado con

los datos experimentales (Figura 27); esto indica la presencia de más de dos especies ionizables asociadas con la actividad de estas dos variantes de la enzima. Como se muestra en la Figura 28 la enzima WT o W131G muestran al menos dos grupos ionizables en cada parte de la curva. Por esta razón se ajustaron los valores de estas dos variantes a un modelo más complejo que considera el estado de protonación de dos residuos adicionales, cada una asociada a un grado de actividad de la enzima. Los valores de pK_a obtenidos para cada una de las variantes y modelos se listan en la Tabla 3.

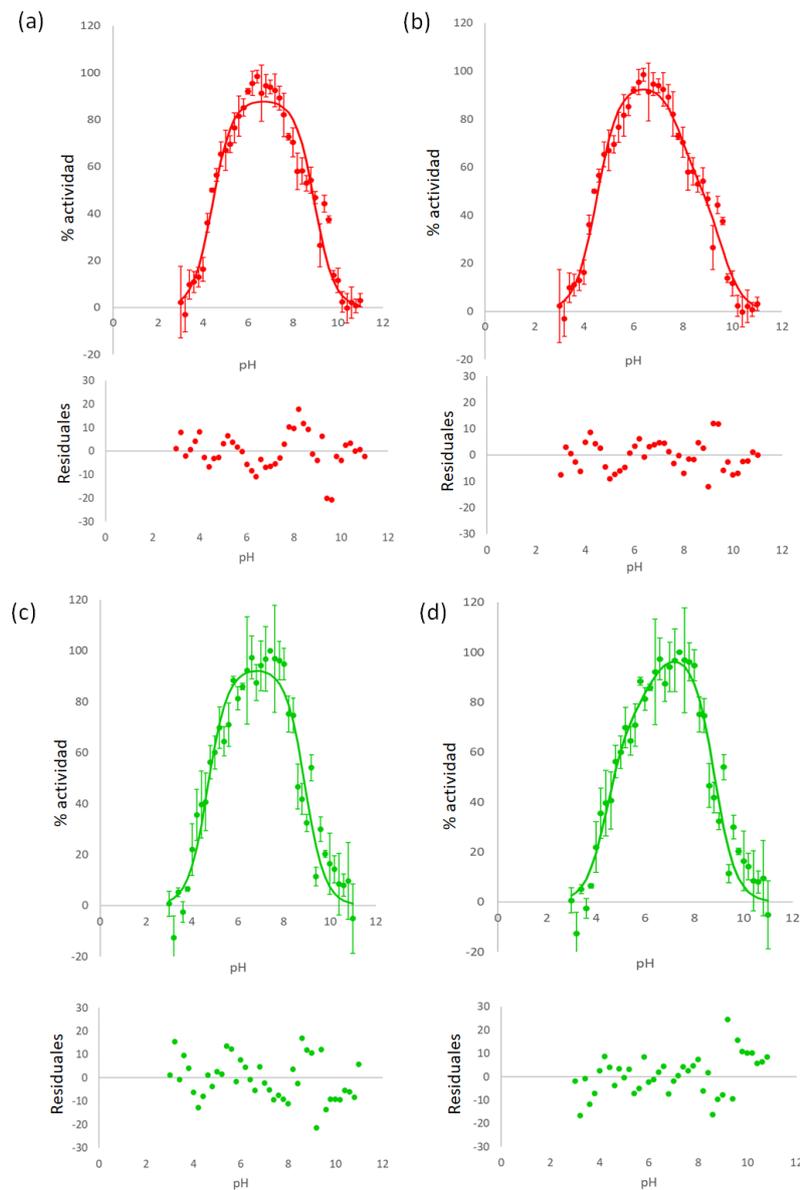


Figura 27. Dependencia del pH de la actividad transglicosídica de la *TmGTasa* WT (círculos rojos) y W131G (círculos verdes) ajustadas a dos valores de pK_a ((a) y (c)) y a tres valores de pK_a ((b) y (d)).

En contraste, la especie obtenida por el acortamiento del asa al mejor modelo que se ajustó fue al que considera dos grupos ionizables siendo un estado de protonación el que determina la actividad de la enzima (Figura 28c, Tabla 3).

Tabla 3. Valores de pK_a de los residuos catalíticos de las variantes de la *TmGTasa* determinados por el ajuste de los perfiles de actividad vs pH a diferentes modelos matemáticos definidos en las Eqs. 4-6. Los valores de pK_a en los extremos ácido y básico corresponden a los residuos nucleófilo (D186) y ácido/base (E216), respectivamente. x , y y z corresponden con las actividades relativas de las especies presentes en el sitio activo de la enzima. Los valores obtenidos de los mejores ajustes se presentan en negrita.

Proteína	# de pK_a	pK_a-1	pK_a-2	pK_a-3	pK_a-4	x	y	z	R^2
WT	2	4.4±0.1	8.9±0.1	-	-	88.7±2.3	-	-	0.975
	3	4.5±0.1	7.9±0.3	9.6±0.2	-	51.8±9.3	94.7±2.5	-	0.987
	4	4.4±0.1	6.2±0.7	7.6±0.3	9.5±0.1	81.6±8.9	106.8±10.9	55.8±7.1	0.989
W131G	2	4.7±0.1	8.9±0.1	-	-	93.5±2.9	-	-	0.968
	3	4.5±0.2	6.2±0.7	8.8±0.1	-	100.7±5.2	75.2±13.7	-	0.973
	4	4.6±0.1	7.7±0.8	8.1±0.5	10.1±0.4	85.7±4.2	145.7±62.0	28.0±11.7	0.981
Asa 130s recortada	2	4.6±0.1	8.9±0.1	-	-	109.7±3.5	-	-	0.976

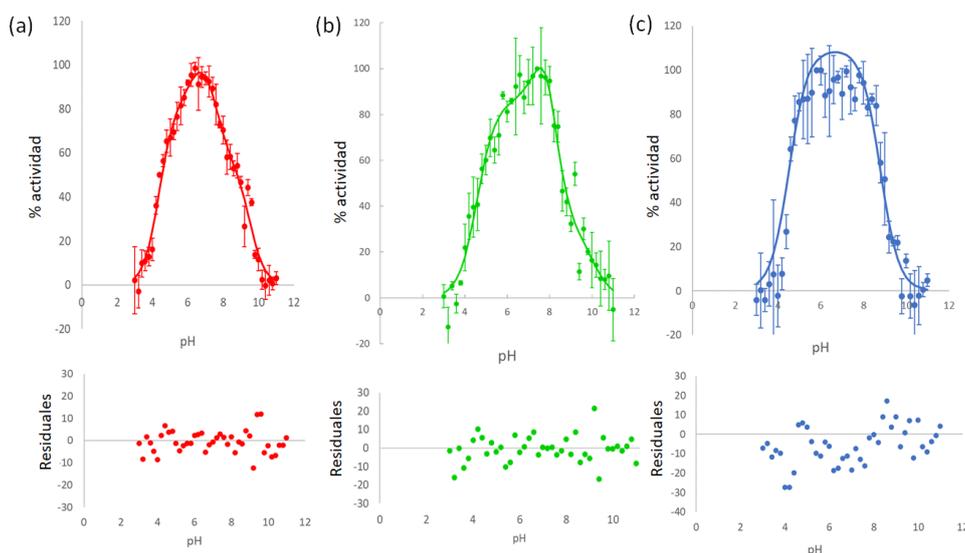


Figura 28. Perfiles de actividad a diferentes pH para las variantes de la *TmGTasa*. (a) WT, (b) W131 G, y (c) asa 130s recortada. Los datos son presentados con el error correspondiente a una desviación estándar. Los valores obtenidos fueron ajustados a las ecuaciones 6 para las dos primeras y 4 para la variante del asa 130s recortada. Los paneles inferiores muestran los valores residuales de los valores experimentales y los obtenidos por el modelo ajustado.

7.8 Dinámica de los residuos del sitio activo para las mutantes del dominio B

Los cambios en los comportamientos de la actividad vs pH respecto a la WT indican que las redes de puentes de hidrógeno y de interacciones electrostáticas pueden haberse modificado producto de las mutaciones en el dominio B de la *TmGTasa*. Para tratar de encontrar indicios de las causas de estas modificaciones, se determinó el pK_a de los residuos catalíticos a lo largo de la simulación de DM. En la Figura 29a-b se muestran histogramas de los pK_a s muestreados en las diferentes conformaciones a lo largo de la DM. La plasticidad de los residuos localizados en el sitio activo de las glicosil-hidrolasas es un elemento crucial para su funcionamiento correcto. En el caso del E216 (residuo ácido-base) se aprecia una distribución bimodal en los pK_a de las tres variantes. Este comportamiento es de esperarse ya que este residuo cambia de pK_a a lo largo de la reacción, aunque se hubieran esperado valores de pK_a más altos, hay que considerar que PROPKA tiene un error fraccional de 0.1 en una unidad de pH en la determinación de los pK_a s (Olsson et al., 2011). Por otro lado, es interesante resaltar que mientras en la enzima WT y en la mutante sencilla W131G los dos picos están más separados, en la del asa 130s acortada los pK_a s tienden a colapsarse.

Contrario a lo esperado, para el D186, los pK_a tienen una distribución bimodal, que se centran en los valores 3.00 y 10.00 (Figura 29a). En concordancia con el mecanismo de reacción es de esperarse que los valores de pK_a para el residuo nucleofílico se mantengan bajos (zona ácida) y que varíen menos, ya que este actúa solamente como nucleófilo a lo largo de la reacción. En cambio, el residuo ácido-base debe alternar entre diferentes valores de pK_a con al menos 1.5 unidades por encima del correspondiente al nucleófilo (Nielsen & McCammon, 2003). De acuerdo con lo anterior, sólo en el caso de las conformaciones en las que el residuo D186 tenga valores de pK_a inferiores a 4.00 se tendrá una conformación activa. En el caso de las mutantes de *TmGTasa* se observó una disminución de la población con pK_a alrededor de 3.00 (Figura 29a; esto pudiera justificar la disminución de actividad observadas en estas variantes de la proteína producto de las mutaciones. Para el E216 el valor de pK_a puede alternar entre valores elevados (para la primera parte de la reacción) y bajos (para la segunda parte de la reacción). Sin embargo, para E216 solo en el caso de la proteína WT se alcanzan conformaciones que se caracterizan por valores de pK_a cercanos a 8.0. En ambas mutantes del dominio B los valores de pK_a del E216 alcanzan valores máximos cercanos a 6.0 (Figura 29b).

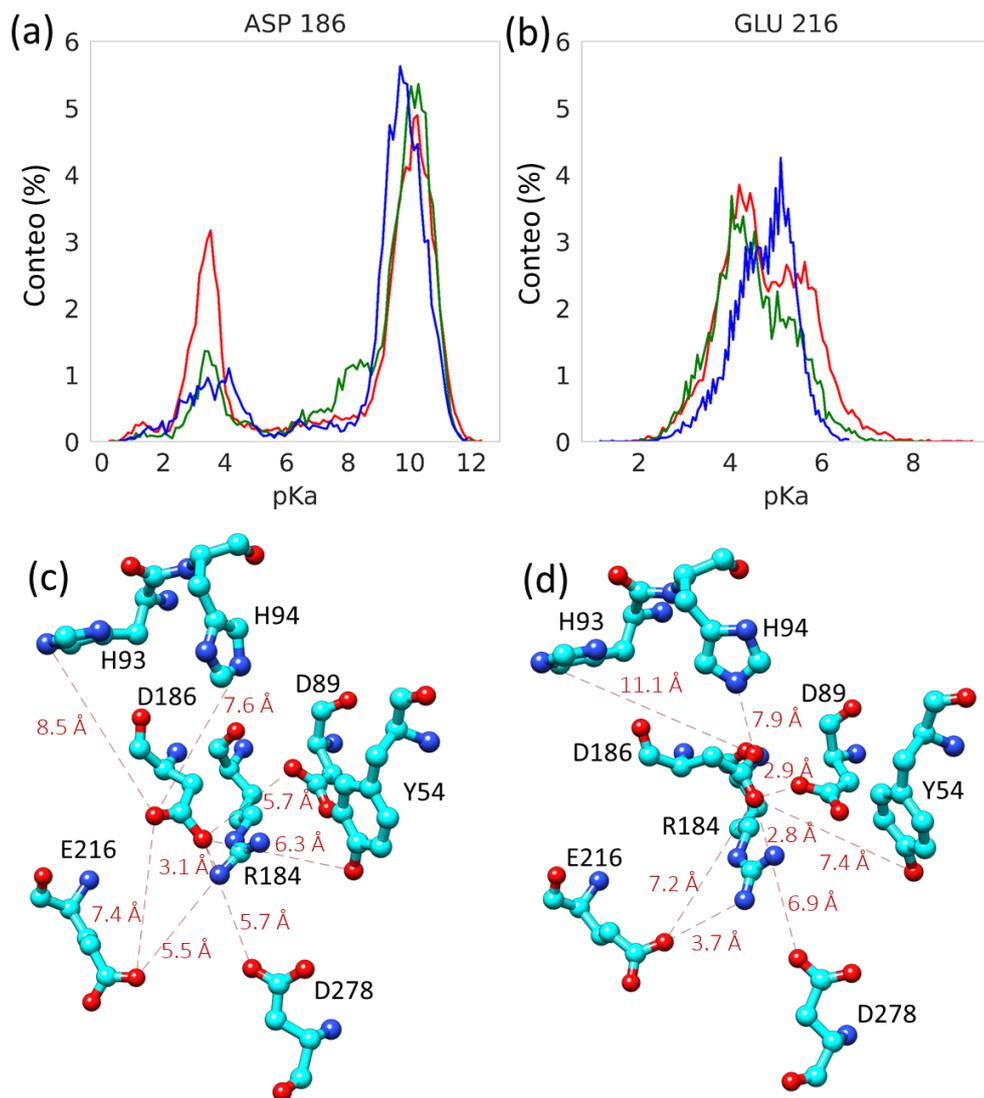


Figura 29. Cambios en los valores de pK_a a lo largo de la simulación DM. Distribución de los valores de pK_a para los residuos (a) D186, (b) E216, para la especie WT (roja), W131G (verde), y del asa 130s recortada (azul). Estructuras representativas de la distribución del D186 con valores de $pK_a = 3.00$ (c) y 10.00 (d) en la proteína WT. Las distancias entre átomos están representadas en líneas discontinuas.

Los valores de pK_a de estos dos residuos pueden ser influenciados por otros grupos funcionales que formen parte de la cavidad catalítica. Un residuo que parece de gran importancia para cumplir este papel es la R184, quien organiza al grupo de residuos ácidos (D186, E216, D89, D278) presentes en dicha cavidad (Figura 29c-d y Figura 30c-d). Interesantemente la Y54 cambia su distancia del residuo catalítico en dependencia del pK_a del D186, lo que sugiere su posible papel en el funcionamiento de la enzima. Otros dos residuos que resultan interesantes son las H93 y H94 que se encuentran en la parte superior de la cavidad catalítica (Figura 29c-d y Figura 30c-d). En las conformaciones funcionalmente competentes de la proteína el residuo

H93 mantiene valores de pK_a alrededor de 7.00 (Figura 29c-d y Figura 30c-d). En estas conformaciones es posible encontrar el residuo D186 con un valor de pK_a en la zona ácida y el E216 con un valor elevado de pK_a (zona cercana a la neutralidad), lo que es compatible con el paso de glicosilación de la reacción. Esto sugiere el posible papel de la H93 como reguladora del pH en el sitio activo de la enzima; lo anterior puede suceder en conjunto con el residuo H94, el que se caracteriza por valores de pK_a ácidos y por encontrarse conservado en la estructura de las GHs (Heinrich et al., 1994).

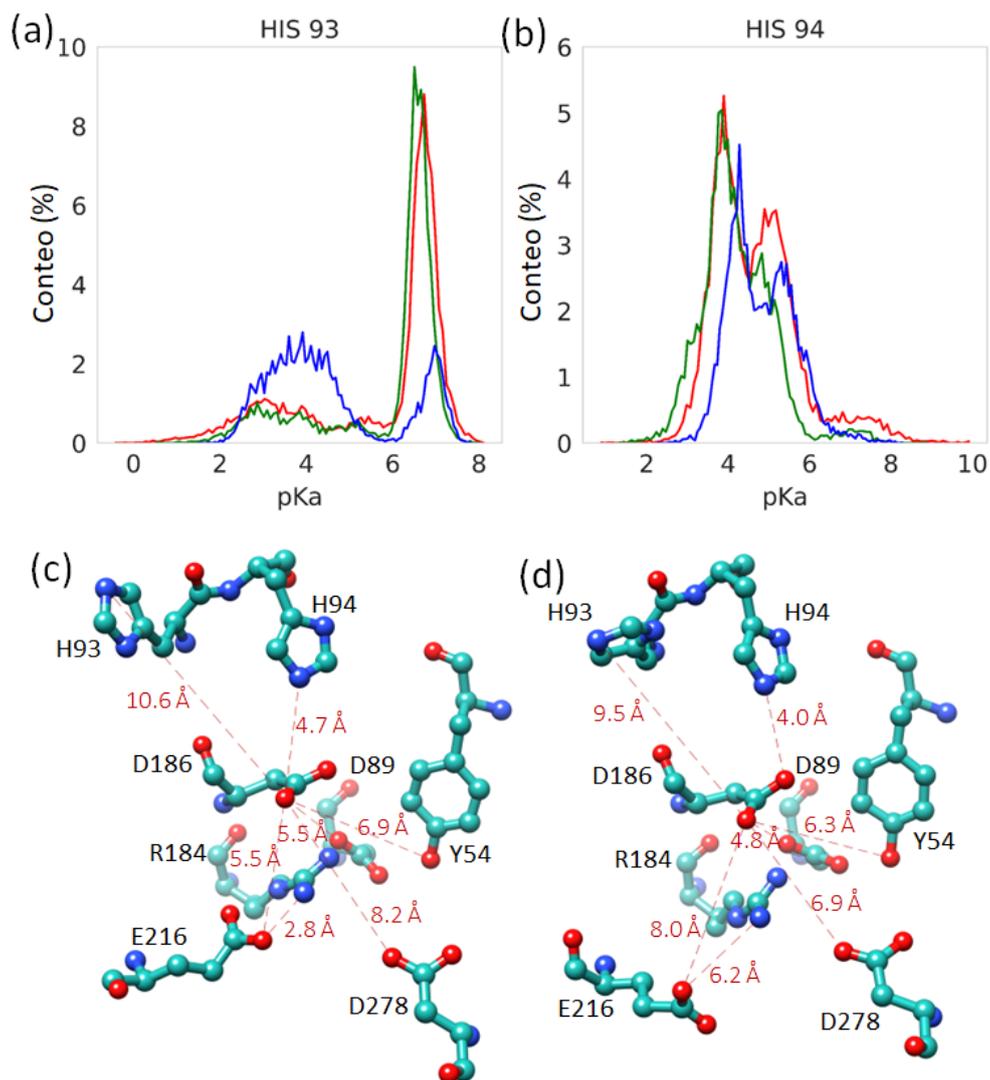


Figura 30. Cambios en los valores de pK_a a lo largo de la simulación DM (a) Distribución de los valores de pK_a para los residuos H93 y (b) H94 para la especie WT (roja), W131G (verde), y del asa 130s recortada (azul) (c, d) Estructuras representativas de la distribución para la variante del asa 130s recortada para la H93 con valores de $pK_a = 4.00$ y 6.50 , respectivamente. Las distancias están representadas en líneas discontinuas.

7.9 Cambios de actividad producto de las mutaciones en el dominio A de la *TmGTasa*

Se construyó una biblioteca conformada por las combinaciones de los codones degenerados que codifican tanto para los residuos de la especie silvestre, como para los predichos por el algoritmo, lo cual ocasionó que también se exploraran codones que codifican para otros aminoácidos además de los planeados. Se hizo un escrutinio en la librería generada en un formato de alta eficiencia en el que se midieron las actividades transglicosídica e hidrolítica relativas a la enzima silvestre a partir de extractos celulares. La representación de las actividades relativa a la especie WT de la proteína se muestra en la Figura 31, en donde en el eje de las abscisas se grafica la actividad transglicosídica y en el eje de las ordenadas, la actividad hidrolítica; de manera que la coordenada 1,1 corresponde a la enzima silvestre. Las variantes que muestran un corrimiento hacia la izquierda están asociadas a una disminución de la transglicosilación, mientras que aquellas en la parte superior se relacionan con un incremento de la hidrólisis. El conjunto de mutantes muestreada se agrupó en el cuadrante superior izquierdo, es decir que aumentan la relación hidrólisis y disminuyen la transglicosilación simultáneamente. Se analizaron las secuencias de varias variantes mostrando perfiles algo diferentes de la librería generada para mutar los residuos 5 y 275. Esto permitió la identificación reiterada de una doble mutante de la proteína con la posición 5 sustituida por ácido glutámico –como fue predicho por el algoritmo–, pero sorpresivamente en la posición 275 el residuo presente en la variante más hidrolítica fue el W (puntos verdes en la gráfica). Este residuo no fue identificado en ninguna de las GH usadas para el entrenamiento o validación del algoritmo usado en este trabajo (Arreola-Barroso et al., 2021), ni en otros miembros de la familia GH13. Adicionalmente, en algunos casos (variantes 78, 79 y 47) se identificaron algunas mutaciones espurias producto de un procesamiento erróneo de la DNA polimerasa durante la PCR.

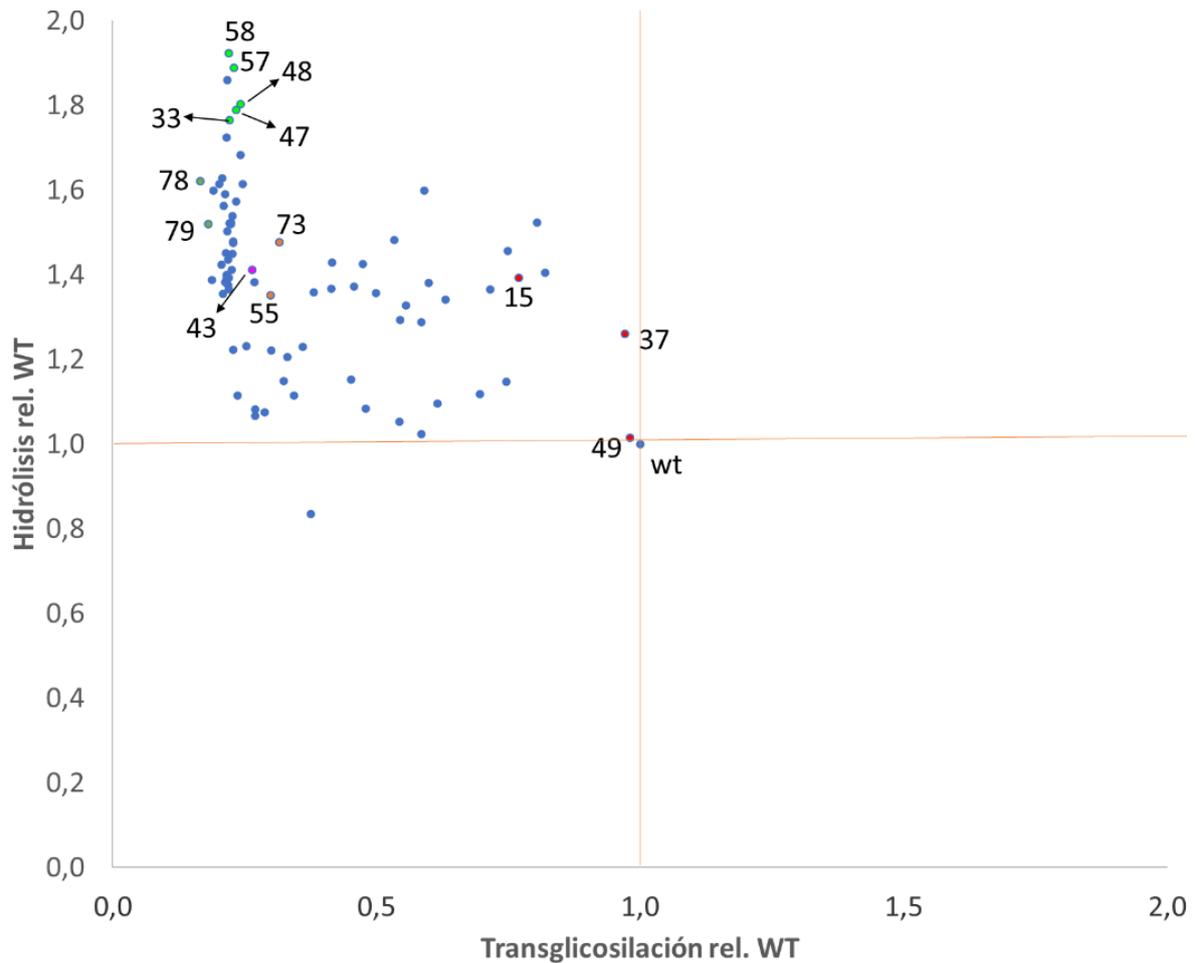


Figura 31. Relación entre las especificidades hacia las reacciones de hidrólisis y transglicosilación de las variantes de la *TmGTasa* obtenidas por mutación en los residuos aminoacídicos Q5 y S275. El punto (1;1) corresponde a la enzima silvestre (WT). La actividad transglicosídica está medida como el cambio de absorbancia a 620 nm que experimenta el complejo del almidón y el Lugol luego de 15 min de reacción. La actividad hidrolítica fue medida en función de la cantidad de azúcares reductores a partir de la hidrólisis de almidón.

En la Tabla 4 se muestran los cambios de aminoácidos en las clonas cuyo DNA se secuenció y que están indicadas en la Figura 31. De estos resultados se puede deducir que para el mantenimiento de la actividad transglicosídica original de la enzima se necesita que en la posición 5 permanezca la glutamina que se encuentra en la especie silvestre (clonas 15, 33 37, 62, 49). Para referencia, la clona 62 corresponde a la enzima silvestre. En el caso de la clona 49 como existe una mezcla de Q/E en la posición 5 y serina (residuo presente en la especie silvestre) es probable que la elevada actividad transglicosídica se deba a la proteína silvestre, ya que al parecer la sustitución Q5E es deletérea de la actividad original de la enzima. En cambio, en la posición 275 puede ser sustituido el aminoácido serina (polar sin carga) por uno similar en tamaño pero hidrofóbico (A) (clonas 33 y 37) o por la G (clona 15). Sin embargo,

cuando la Q5 es sustituida por ácido glutámico la actividad transglicosídica decae bruscamente (clonas 43, 47, 48, 55, 57, 58, 73 y 78).

Tabla 4. Clasificación de las variantes obtenidas en la región 2 (posición 5 y 275) de la *TmGTasa* en función de sus actividades hidrolítica y transglicosídica relativas a la forma WT. *corresponden a la especie silvestre de la proteína. †También se detectó la señal correspondiente a S275.

Grupo	Características	Colonia	Especie de la <i>TmGTasa</i>
I	Mantienen actividad transglicosídica elevada, y la hidrolítica es baja a media	15	Q5/S275G
		37	Q5/S275A†
		49	Mezcla de Q5 y Q5E con S275
		62	Q5/S275*
II	Ambas actividades son bajas	55	Q5E/S275A
		73	Q5E/S275A
III	Actividad hidrolítica media y transglicosidación baja	78	Q5E/S275A/A187V
		79	Q5/S275/H111R
IV	Actividad hidrolítica más elevada y transglicosídica baja	33	Q5/S275A
		47	Q5E/S275W/Y60C
		48	Q5E/S275W
		57	Q5E/S275W
		58	Q5E/S275W
V	Esperada por la predicción del algoritmo (ambas actividades son bajas)	43	Q5E/S275G

Por otra parte, las reacciones de hidrólisis se favorecen cuando en la posición 5 hay ácido glutámico, pero en la 275 se acompaña por una glicina (residuo predicho por el algoritmo basado en los factores de enriquecimiento de los residuos contacto) o un triptófano; sin embargo, este residuo aromático no aparece en los alineamientos múltiples de ninguna de las proteínas usadas para la predicción de los factores de enriquecimiento ni en la familia GH13. Una excepción fue la colonia 33 en la que la mutación simple S275A propició un aumento de la actividad hidrolítica unido a la pérdida de la transglicosídica. La inserción de mutaciones espurias durante la extensión del gen por la Taq polimerasa también dio lugar a modificaciones (no planificadas) en la posición H111 y A187, las que tuvieron un efecto importante en el cambio de especificidad de reacción de la *TmGTasa*. Es importante resaltar que estas posiciones no hubieran sido seleccionadas por este método, ya que se encuentran en el dominio B (Figura 1), el que por su diversidad entre estas enzimas no fue considerado en los alineamientos estructurales.

7.10 Determinación de la actividad en preparaciones purificadas de las enzimas obtenidas por modificación del dominio A

Se purificaron dos de las variantes de la *TmGTasa* obtenidas por la modificación del residuo de la posición 5 por E y en la 275 por G o W para determinar sus actividades transglicosídicas e hidrolíticas. La extensión de la hidrólisis se realizó mediante el método del DNS, midiendo la absorbancia a 540 nm. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la actividad hidrolítica de la WT y la variante Q5E/S275G. Sin embargo, en el caso de la doble mutante Q5E/S275W la cantidad de azúcares reductores fue 4.4 veces mayor a la producida por la *TmGTasa* WT (Figura 32).

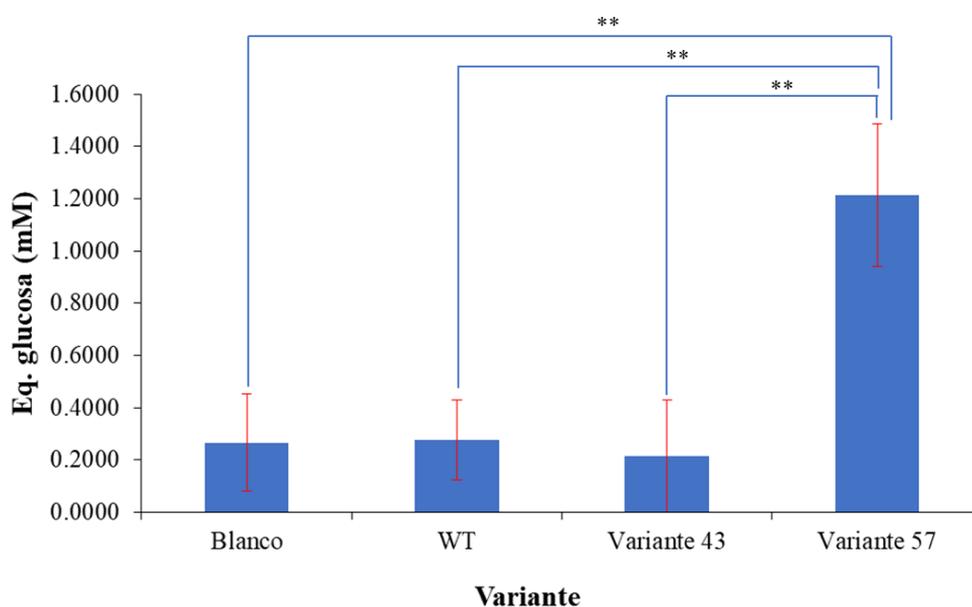


Figura 32. Actividad hidrolítica sobre el almidón 1 % de las variantes 43 (Q5E/S275G) y 57 (Q5E/S275W) purificadas por IMAC. La medición se realizó mediante la estimación de los azúcares reductores (equivalentes de glucosa) luego de 12 h a 70 °C. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Para la actividad transglicosídica hubo una disminución de la velocidad máxima en ambas variantes del dominio B. Sin embargo, al comparar con la forma WT de la proteína, la disminución de la V_{max} de la variante Q5E/S275W fue mayor (1073 veces, Figura 33b) que para la Q5E/S275G (81 veces, Figura 33a). Cuando se consideran en conjunto las actividades hidrolítica y transglicosídica de ambas variantes Q5E/S275W o G, la relación H/T experimentó un incremento respecto a la forma WT de la proteína de 4721 y 62, respectivamente.

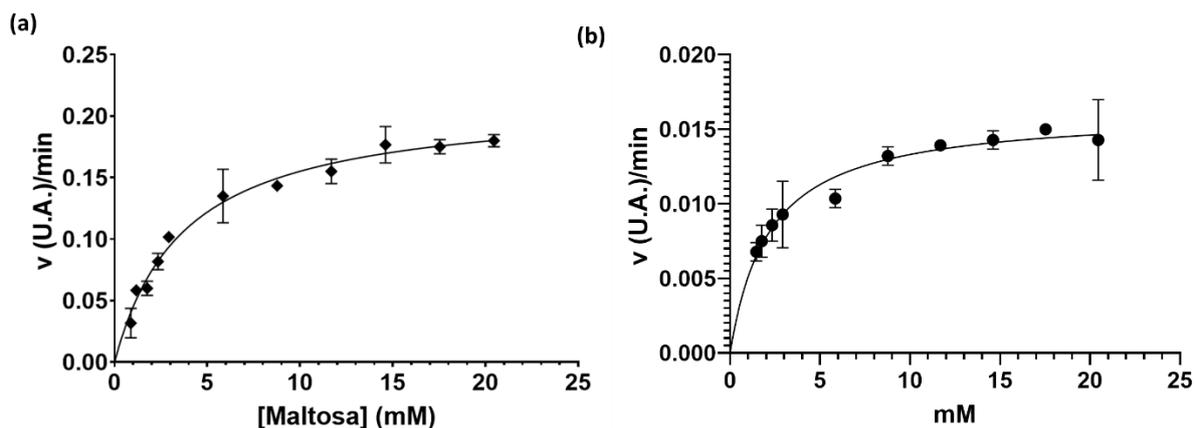


Figura 33. Curva de Michaelis-Menten para las variantes del dominio catalítico de la *TmGTasa* manteniendo constante la concentración de almidón (0.93 %) y variando la concentración de maltosa. **(a)** Q5E/S275G, $K_m=3.75\pm 0.89$ mM; $V_{max}= 0.213\pm 0.009$ UA/min. **(b)** Q5E/S275W. $K_m=2.17\pm 0.26$ mM; $V_{max}= 0.016\pm 0.0005$ UA/min.

Para evaluar el efecto producido por las mutaciones realizadas en el dominio A (Q5E7S275W o G) en su estabilidad se procedió a la determinación de las actividades enzimáticas a 70 °C. Sin embargo, en ningunos de los tiempos evaluados la actividad relativa promedio fue inferior al 50 % (Figura 34).

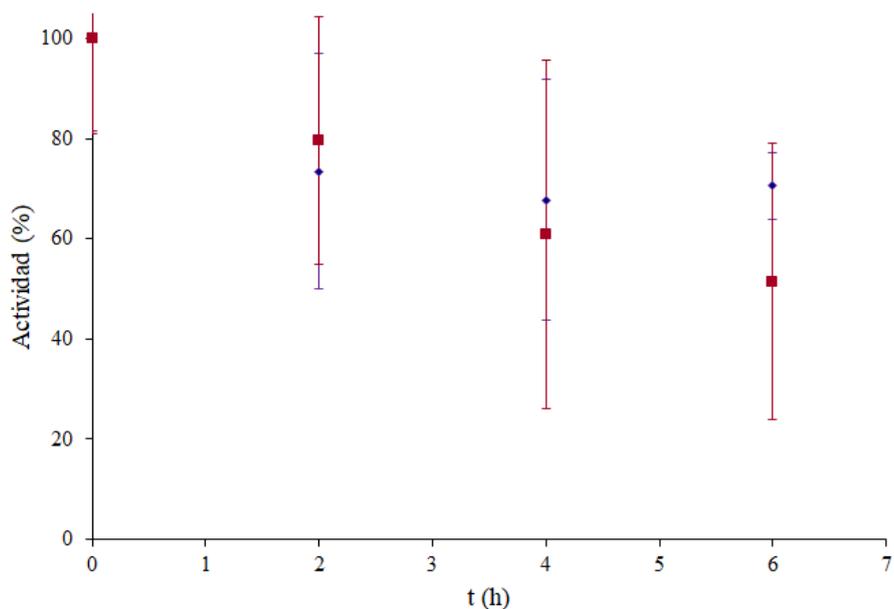


Figura 34. Estabilidad a 70 °C de las variantes de la *TmGTasa* en el dominio A. Q5E/S275G (marrón), Q5E/S275W (morado). Los valores se muestran como el promedio \pm desviación estándar de tres réplicas independientes.

El ajuste de los datos a un modelo cinético de primer orden tuvo un comportamiento para la variante Q5E/S275W sí se obtuvo un comportamiento lineal a lo largo de todo el tiempo evaluado (Figura 35). Como resultado estas variantes obtenidas por modificación del dominio A tuvieron $t_{1/2}$ de vida media comprendidos entre 6-7 h, los que resultaron ser alrededor de la mitad de los correspondientes a la forma WT de la *TmGTasa*.

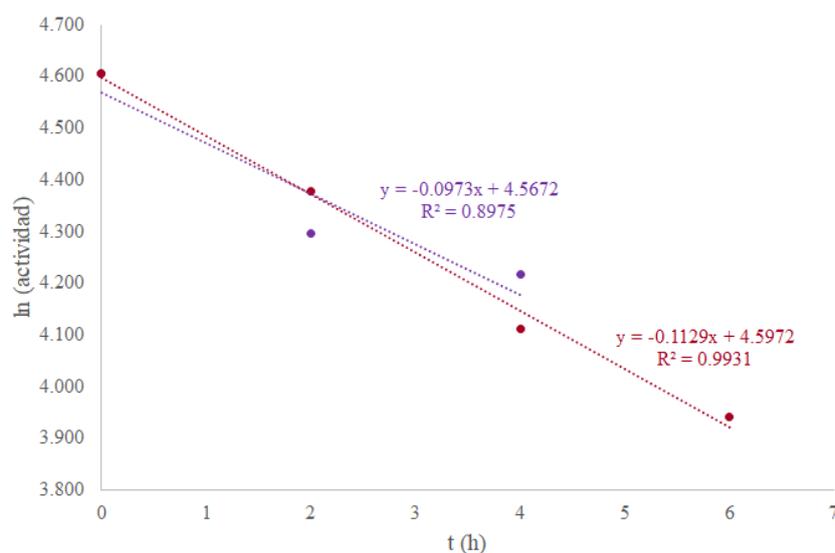


Figura 35. Ajuste a un modelo cinético de primer orden de los datos de estabilidad a 70 °C de las variantes de la *TmGTasa* en el dominio A. Q5E/S275G (marrón), Q5E/S275W (morado).

7.11 Cambios estructurales asociados con las mutaciones en el dominio A de la *TmGTasa*

El cambio en los valores de los RMSD para las variantes Q5E/S275W(G) fueron similares a los obtenidos para la forma WT de la proteína (Figura 36a). En el caso de la Q5E/S275W se observó una doble distribución con valores que están centrados alrededor de 1.6 y 2 Å, respectivamente.

La variante Q5E/S275G experimentó cambios incluso menores que para la forma WT de la proteína y una distribución uniforme centrada alrededor de 1.4 Å. La flexibilidad de ambas mutantes (posición 5 y 275) también se refleja en que el análisis por agrupamiento indicó que fue necesaria solo una estructura de cada una de estas proteínas para representar más del 99 % de la población conformacional (Figura 36b).

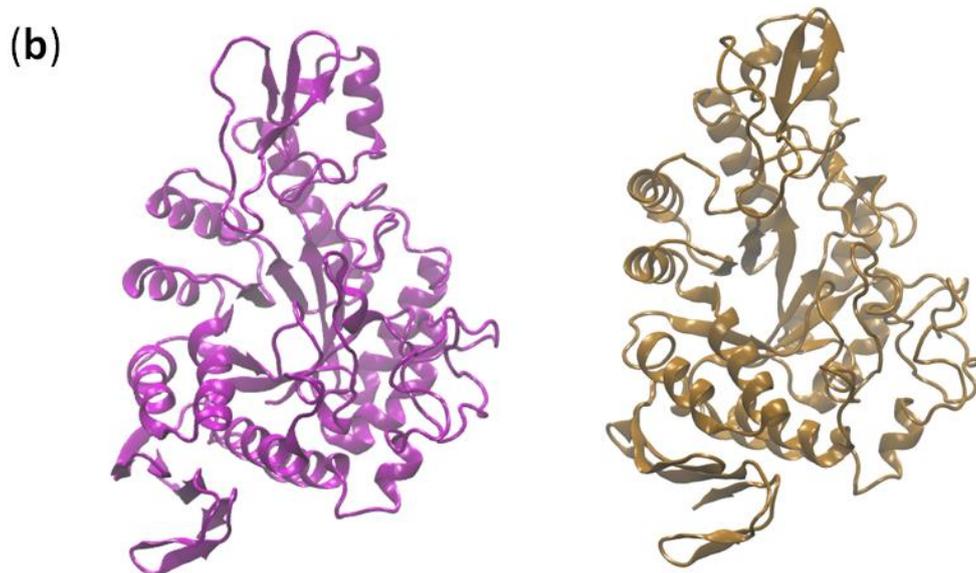
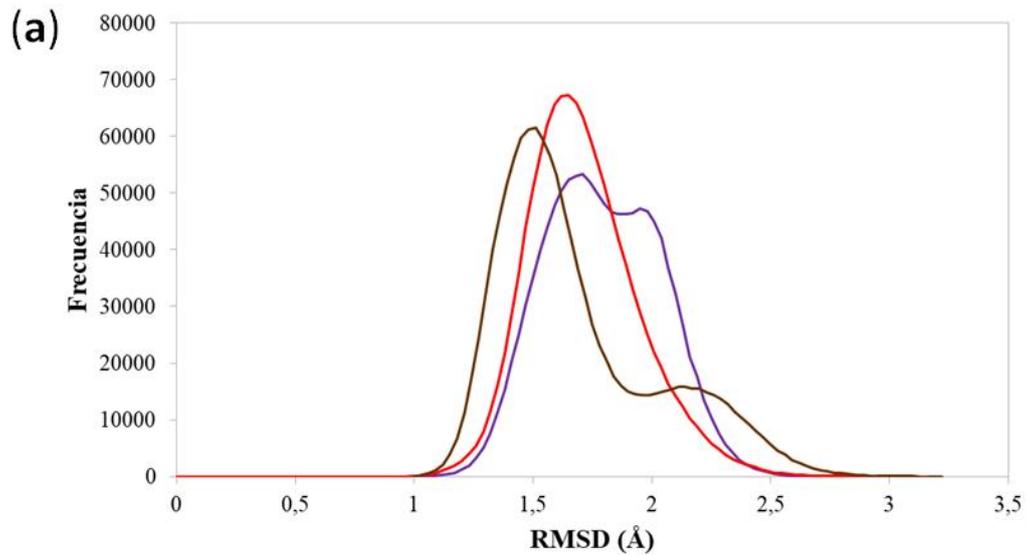


Figura 36. (a) Distribución de los valores de RMSD de la proteína WT (rojo), Q5E/S275W (morado), y Q5E/S275G (ocre), (b) estructuras representativas de los agrupamientos que contienen al menos al 99 % de la población conformacional para la Q5E/S275W (morado), Q5E/S275G (ocre).

Los valores de *RMSF* indican que las regiones más flexibles de estas variantes de la *TmGTasa* también coinciden con el dominio B (Figura 37). Sin embargo, también se pueden localizar algunas asas a la entrada del sitio activo que representan zonas con flexibilidades intermedias (Figura 37b).

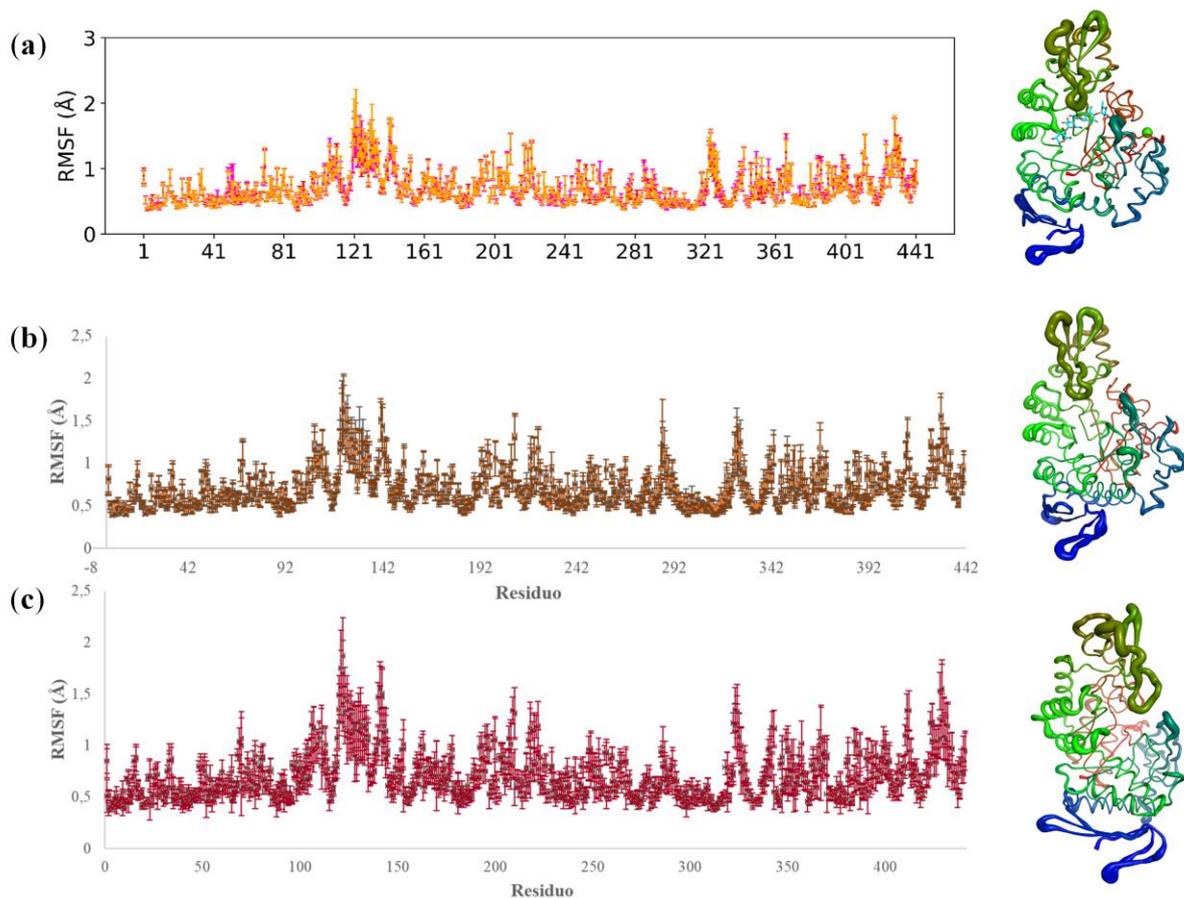


Figura 37. Fluctuación de las variantes del dominio A de la *TmGTasa* en intervalos de 100 ps. Valores de RMSF para la variante WT **(a)** Q5E/S275G **(b)** y Q5E/S275GW **(c)**. En los paneles derechos se muestran las representaciones estructurales basadas en los valores de RMSF para cada una de las dos variantes. Todas las estructuras están coloreadas desde el N-terminal (rojo) al centro (verde) y terminando el C-terminal (azul).

En las variantes producto de modificaciones en el dominio A al parecer el mecanismo de apertura/cierre del sitio activo resulta similar a la WT para la variante Q5/S275G. La diferencia principal radica en los valores más pequeños de estas distancias entre W131 y K324, los que tienen un ligero incremento en el caso de esta mutante.

Al contrario, para la Q5E/S275W de forma general existe un corrimiento de los valores de las distancias entre los residuos W131-K324 hacia valores más pequeños que los que corresponden a la forma WT, centrándose la distribución alrededor de los 12 Å (Figura 38).

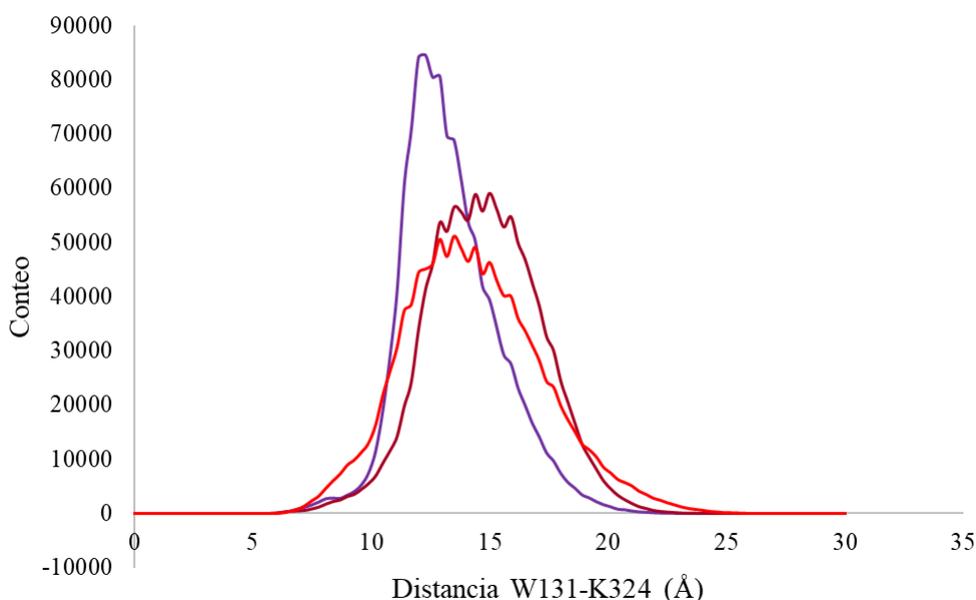


Figura 38. Histograma de las distancias entre los carbonos alfa de los residuos 131 y 324 para la *TmGTasa* WT (rojo), Q5E/S275W (morado) y Q5E/S275G (marrón).

7.12 Dinámica de los residuos del sitio activo para las mutantes del dominio A

La distribución de los valores de pK_a del residuo D186 (nucleófilo) tienen un comportamiento muy similar al de la especie WT y las mutantes del dominio B de la proteína. Sin embargo, existe una mayor separación entre estas dos poblaciones cuando se compara con la forma WT de la proteína; los valores de pK_a bajos llegan a estar centrados alrededor de 2.0 (Q5E/S275W) o de 11.00 para la otra población. Al igual que en las mutantes del dominio B se ve un aumento en la conformación con un valor alto de pK_a para el nucleófilo, que darían lugar a conformaciones improductivas para la etapa de glicosilación; incluso, en el caso de la variante Q5E/S275W tiene un corrimiento de alrededor de 1 unidad en los valores de la región básica comparado con la WT (Figura 39a), lo cual concuerda con la mayor pérdida de actividad de esta variante.

En cuanto a los valores de pK_a del residuo E216 (ácido-base) tienen valores mayores para la variante Q5E/S275W relativo a la forma WT y a la mutante Q5E/S275G. Igualmente, en las mutantes del dominio A la distribución de los valores resulta ser menos extendida que para la forma WT de la proteína. Esto concuerda con algunos reportes que sugieren que la activación del agua (asistida por este residuo) es más demandante energéticamente que la de un azúcar y

por tanto la hidrólisis se vería favorecida por un pK_a más alto de este residuo, tal como se observó.

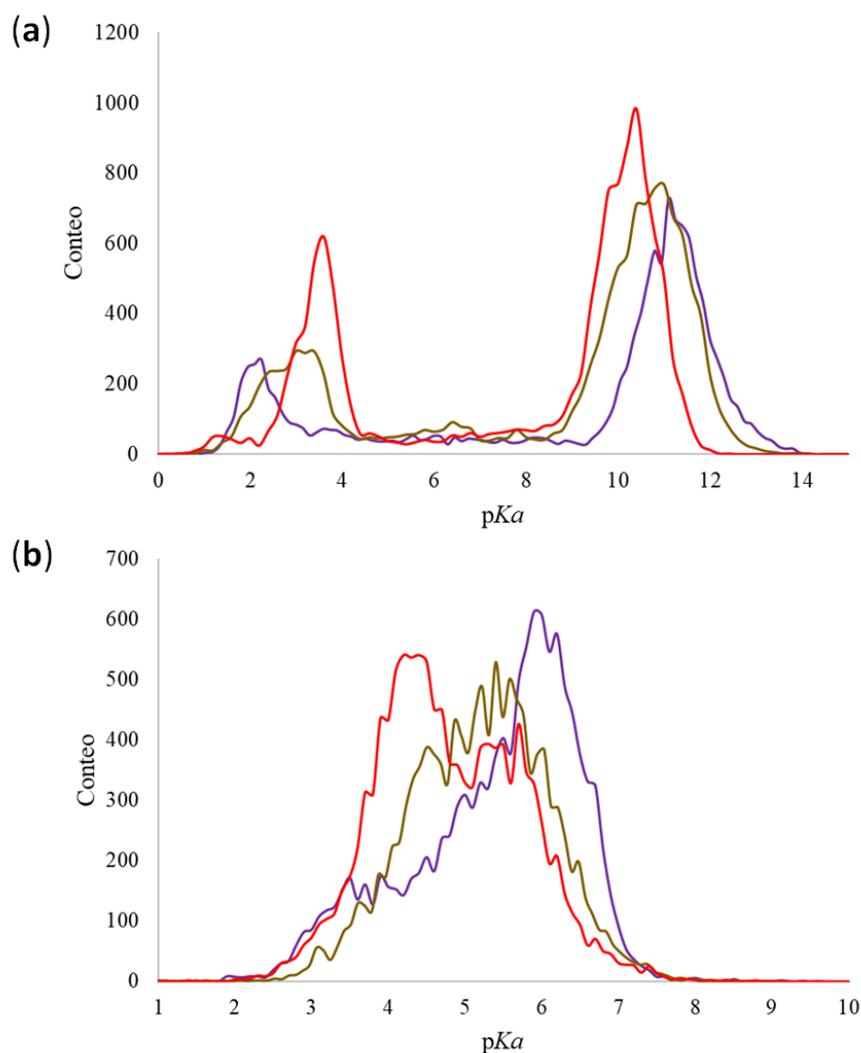


Figura 39. Cambios en los valores de pK_a a lo largo de la simulación DM (a) Distribución de los valores de pK_a para los residuos D186, (b) E216, para las especies WT (rojo), Q5E/S275W (morado), Q5E/S275G (marrón).

Las estructuras representativas indican que en estas variantes producto de la modificación en las posiciones 5 y 275 existen diferentes disposiciones entre las conformaciones que son aparentemente catalíticas (Figura 40a-b) y las que no lo son (Figura 40c-d). En las conformaciones catalíticamente competentes se observa un acercamiento de las H93 y H94 al D186, tal como ocurre en el caso de las formas WT (Figura 29 y Figura 30) y del asa 130s acortada de la *TmGTasa*. En estas conformaciones igualmente el E216 (residuo ácido-base) se separa del D2186 (nucleófilo) y se acerca a la R184.

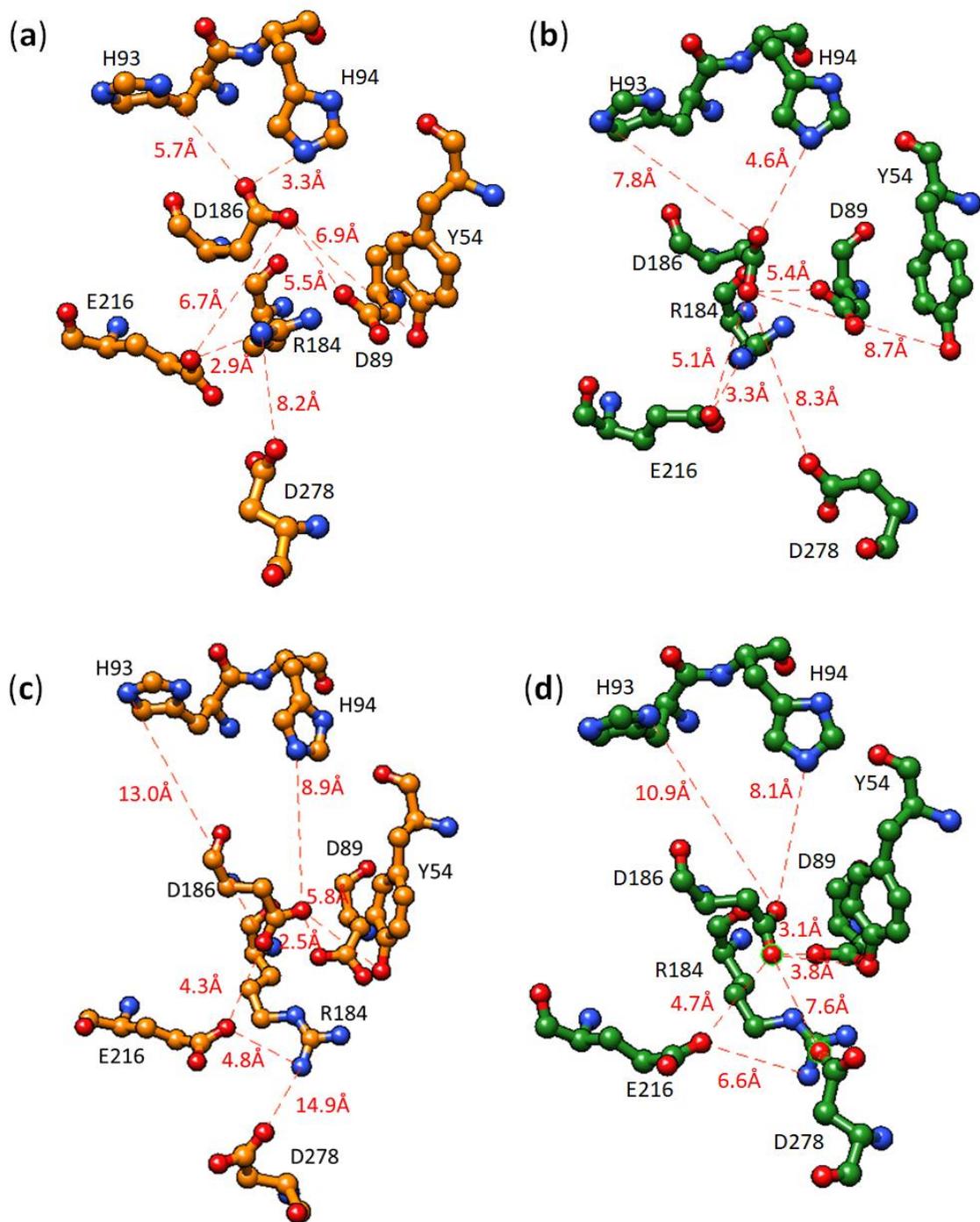


Figura 40. (a) Estructura representativa de la distribución del D186 con valores de $pK_a = 2.20$ para la variante Q5E/S275W. (b) Estructura representativa de la distribución del D186 con valores de $pK_a = 3.20$ para la variante Q5E/S275G. (c) Estructura representativa de la distribución del D186 con valores de $pK_a = 11.00$ para la variante Q5E/S275W. (d) Estructura representativa de la distribución del D186 con valores de $pK_a = 11.00$ para la variante Q5E/S275G. Las estructuras del panel superior corresponden con conformaciones catalíticamente competentes de acuerdo con los valores de los pK_a de los residuos catalíticos. Las distancias entre los átomos correspondientes están representadas en líneas discontinuas.

En el caso del residuo H93 se observa una distribución en ambas mutantes del dominio B en la que predominan pK_a alrededor de 6.7 (Figura 41a). Las distribuciones de ambas mutantes resultan casi indistinguibles de la correspondiente a la forma WT de la proteína. Esta distribución permite que la proteína acceda a conformaciones que resultan catalíticamente competentes para el paso de glicosilación (Figura 41b). En este caso se observa una diferencia con la distribución de la forma del asa 130s recortada en el dominio B, en la que también se observa una población secundaria alrededor de $pK_a = 4.00$ (Figura 30).

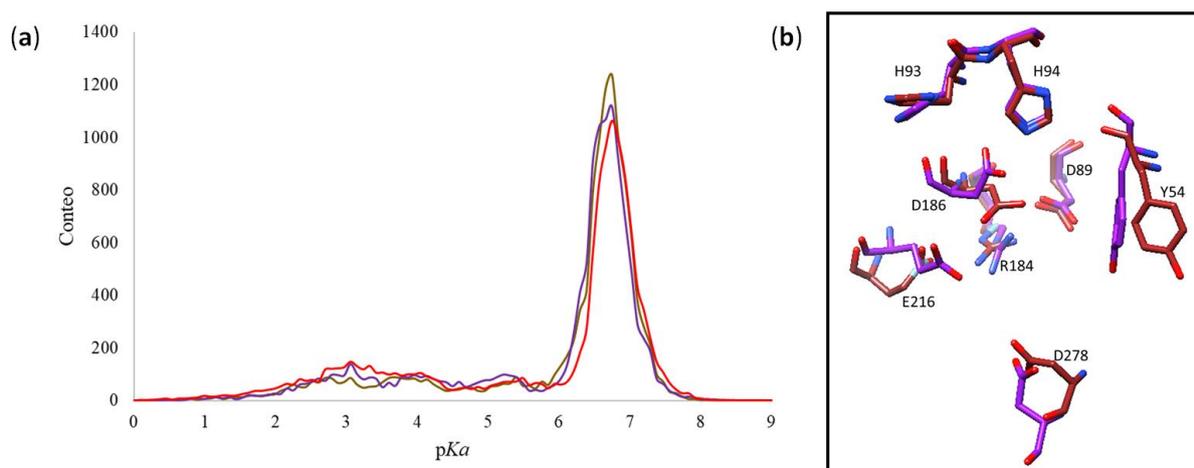


Figura 41. Cambios en los valores de pK_a del residuo H93 a lo largo de la simulación DM (a) Distribución de los valores de pK_a , (b) Estructuras representativas de la disposición de los residuos catalíticos en conformaciones que pueden resultar catalíticamente relevantes para las especies WT (rojo), Q5E/S275W (morado), Q5E/S275G (marrón).

El residuo H94 de las variantes del dominio A presenta una distribución similar a las obtenidas para las variantes WT y del dominio B de la *TmGTasa* (Figura 30), aunque existe una mayor población con valores de pK_a alrededor de 8.00 (Figura 42). Sin embargo, las conformaciones que pueden ser catalíticamente relevantes no parecen abundar cuando el valor del pK_a de la H94 está alrededor de 8.00.

Otra diferencia se observa para la variante Q5E/S275W alrededor de $pK_a = 5.00$. Esta reducción en la población conformacional pudiera ser un elemento que desfavorezca el mecanismo catalítico de esta enzima, ya que este residuo parece ser funcional alrededor de las zonas ligeramente ácidas, quizás funcionando como un tampón de pH en el sitio activo de la proteína.

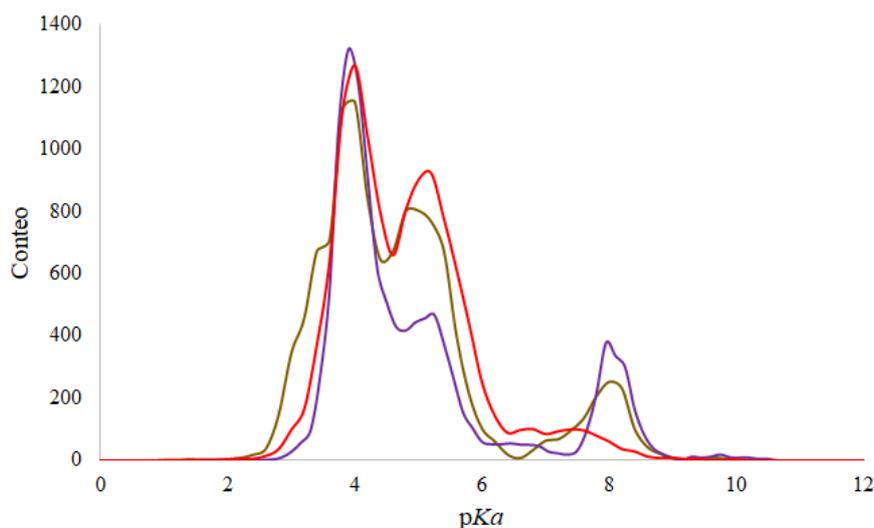


Figura 42. Distribución de los valores de pK_a del residuo H94 a lo largo de la simulación DM para las variantes WT (rojo), Q5E/S275W (morado), Q5E/S275G (marrón).

8. Discusión

Las glicosil hidrolasas (GH) son enzimas que se caracterizan por tener diferencias en la especificidad de las reacciones en las que actúan como catalizadores. Esta diferencia se ha identificado incluso entre miembros de la misma familia, por lo que se ha propuesto la modificación de los conceptos de familia en estos grupos de proteínas (Janeček et al., 2014; Kuriki & Imanaka, 1999). En cuanto al tipo de reacción, en algunos casos están involucradas en reacciones hidrolíticas, en las que actúa el agua como nucleófilo aceptor; mientras que en otros casos es una molécula orgánica la que ataca al carbono anomérico del azúcar que forma el intermediario covalente con la enzima (GEI), lo que favorece la reacción de transglicosilación. El balance entre cada una de estas dos reacciones, incluso entre la preferencia por diferentes aceptores orgánicos, depende de la estructura y naturaleza de cada enzima en particular.

En diferentes familias de las GHs se conoce que las mutaciones en los subsitios que conforman el sitio activo tienen un efecto en la especificidad de reacción. Esto ha sido inspiración para estrategias semiracionales que permitan la modificación de T/H. Estos cambios se basan en que las sustituciones en los subsitios positivos (aceptor) por aminoácidos hidrofóbicos y/o aromáticos favorecen T/H (Kong et al., 2021; Leemhuis et al., 2010; van der Veen et al., 2001). Este fenómeno se asocia con la capacidad que tienen estos aminoácidos de impedir la entrada de agua a los subsitios del aceptor en conjunto con el aumento de las interacciones π - π . En el

caso de los subsitios negativos (donador) se ha hipotetizado que las mutaciones en esta región afectan la estabilización del estado de transición (TS^\ddagger) de forma más importante en la hidrólisis que en la transglicosilación. Esto repercute en un aumento de la T/H, aunque a expensas de la eficiencia catalítica (Teze et al., 2014).

Una de las estrategias más usadas para la identificación de estos residuos aminoacídicos ha sido mediante alineamientos múltiples de secuencia (MSA) de enzimas con preferencias hacia una reacción u otra (Damián-Almazo et al., 2008; Heinrich et al., 1994; P. L. Tran et al., 2014). Esto es posible porque estas posiciones se localizan en alguna de las regiones conservadas del barril TIM que conforma el dominio catalítico (Janeček et al., 2014); sin embargo, este análisis se realiza con un número reducido de secuencias de enzimas con una supuesta preferencia hacia la hidrólisis o transglicosilación. Una de las limitantes relacionada con los subconjuntos de proteínas con una u otra especificidad es que en muchas ocasiones no se cuenta con la información suficiente y confiable de la especificidad de reacción de estas proteínas. Por otra parte, hay otras regiones fuera del dominio catalítico de estas proteínas que no son estructuralmente equivalentes entre los homólogos, especialmente el dominio B, el que resulta ser divergente incluso dentro de la misma familia (Janecek et al., 1997). En el caso del dominio B de GH solo unos pocos residuos forman parte de algunas de las regiones conservadas en la familia (Heinrich et al., 1994). Incluso existen un conjunto de familias que contienen miembros que presentan más de tres dominios (A-C), algunos de los cuales pueden estar asociados con la especificidad de reacción (Bourne & Henrissat, 2001; Han et al., 2013).

Uno de los miembros de la familia GH13 que no ha sido clasificado dentro de ninguna subfamilia es la enzima 4- α -glucanotransferasa de *Thermotoga maritima* (*TmGTasa*). Esta GH tiene una especificidad hacia la reacción de transglicosilación. En la mezcla de reacción debe encontrarse un azúcar donador como el almidón, además de un α -glicósido con al menos dos unidades de glucosa (maltosa), el que funciona como molécula aceptora (Liebl et al., 1992). Además de la maltosa existe un número limitado de aceptores que pueden acomodarse en los subsitios positivos de esta enzima, entre los que se encuentran derivados de la glucosa o maltosa modificados con 4-metilumbeliferil-, pNP- y 5-bromo-4-cloro-3-indol- (Huber & Liebl, 1994). La especificidad limitada hacia ciertos sustratos en el contexto del sitio de unión del aceptor puede ser un indicio de la optimización evolutiva de esta proteína para producir preferencialmente la reacción de transglicosilación. Aunque no se conocen con certeza los elementos asociados a su especificidad de reacción, es posible que en su estructura existe algún

mecanismo que le permite controlar los niveles de aguas catalíticas, lo que desfavorece marcadamente la reacción de hidrólisis. Debido a estas características, esta glicosil hidrolasa fue utilizada en este trabajo como una proteína modelo para encontrar determinantes estructurales que regulan la competencia entre las reacciones de hidrólisis y transglicosilación.

Una de las estrategias usadas en este trabajo fue la comparación de la estructura de la *TmGTasa* (una enzima fundamentalmente transglicosídica) con la correspondiente a la amilasa (*AmyS*) de *Thermotoga petrophila* (hidrolítica). En una segunda estrategia la comparación fue entre los residuos en contactos de 41 y 37 enzimas hidrolíticas y transglicosídicas, respectivamente; para ello se usó un algoritmo que calcula la frecuencia de aminoácidos en los contactos en cada una de las posiciones que conforman estas proteínas (Arreola-Barroso et al., 2021), sobre todo en el contexto del dominio catalítico, que es el que resulta más similar en cuanto a su disposición tridimensional.

La comparación de un par de estructuras (Estrategia 1, Figura 1) con distintas especificidades permitió la identificación de diferencias en la disposición del sitio activo de estas dos enzimas, entre las que se encuentran: (1) cambios de residuos en la *TmGTasa* (P91V, S154M, W218F, A219S, E220G, Y322W, K324G y T237D), (2) sitios de interacción diferenciales con iones metálicos como el Ca^{2+} , el Na^{+} y el K^{+} , y (3) un asa con un W (residuo 131) en la punta solo en la *TmGTasa*, que se extiende desde el dominio B hacia los subsitios positivos del sitio activo de la enzima; este residuo no cuenta con uno exactamente equivalente en la enzima hidrolítica, sino que al parecer este es sustituido con el W223 (numeración como aparece en PDB ID 5M99) que se extiende desde un asa (residuos 213-225, numeración de acuerdo a como aparece en PDB 5M99) de su dominio catalítico.

De acuerdo con la estrategia 2 (Figura 6) se encontró que los residuos en la posición 5 y 275 podían ser cambiados a E y G, respectivamente, lo que tiene asociado un cambio en los factores de enriquecimiento calculados. Sin embargo, y debido a que se usó un oligonucleótido degenerado en la reacción de PCR, la variante con mayor actividad hidrolítica que se obtuvo fue la doble mutante que contenía W en la posición 275. En concordancia con el efecto producido por las mutaciones en el dominio A, al parecer la región que comprende los residuos 200-300 están relacionados con la especificidad de reacción de esta enzima, tal como se reportó para las variantes con mutaciones en los residuos 274 y 279 (Arreola-Barroso et al., 2021). Este resultado pudiera estar relacionado con que esta región móvil se encuentra en las inmediaciones

del sitio catalítico. Adicionalmente, en este asa se encuentra el D278, el que funciona como estabilizador del estado de transición.

En las cuatro variantes obtenidas hubo una reducción de la actividad transglicosídica, lo que indica que se alteró la red de interacción de residuos que propician un correcto funcionamiento de la enzima catalizando la reacción de transglicosilación. Para las mutaciones en el dominio B, un mecanismo posible que explica el cambio en la relación H/T es que el W131 y la red de residuos aminoacídicos que se encuentra a su alrededor regulan la entrada de agua a las inmediaciones del sitio activo de la proteína a través de un movimiento coordinado de esta asa protuberante que se extiende desde el dominio B. De tal modo, este elemento estructural complementa la disposición y la dinámica del sitio activo de la WT. Esta forma de regular la disponibilidad de agua catalítica se afecta producto de las mutaciones producidas en el dominio B de la proteína. Un elemento que está a favor de esta idea es que esta parte de la estructura se encuentra flanqueada por residuos aromáticos/hidrofóbicos (¹¹⁵YYVW¹¹⁸ y W137), por lo que esta asa 130s pudiera regular la entrada de agua desde el exterior de la proteína. En concordancia con lo anterior, el análisis *in silico* con el programa Zebra3D identificó la región que comprende los residuos 118–154, el que comprende el asa alrededor de los residuos 130s, como relevantes para la función específica que realiza esta proteína. En función de estas ideas para probar nuestra hipótesis se construyeron dos variantes que implicaron cambios en el dominio B de la *TmGTasa*, una que conllevó el acortamiento del asa proveniente del dominio B en los residuos 120-124 & 126-131, y la otra fue producto de la sustitución del residuo aromático de la punta de esta asa 130s por una G (W131G).

De acuerdo con la predicción, ambas mutantes del dominio B tuvieron un incremento de ~ 12 veces en la relación de H/T relativa a la proteína WT. Sin embargo, estos cambios fueron asociados principalmente a la reducción de la actividad transglicosídica y solo con un incremento discreto en la actividad hidrolítica en el caso de la variante con el asa 130s cortada. La importancia de este tipo de elemento estructural provenientes del dominio B de GHs también ha sido observada en la ciclodextrin-glicosiltransferasa (CGTasa) Tabium (Leemhuis, 2003); en esta enzima se insertó un asa en el dominio B que cae sobre los subsitios –3/–4, el cual es característico de la amilasa G2 de *B. stearothermophilus* (una enzima hidrolítica). Esta mutación provocó una reducción de los eventos de ciclización/desproporción en alrededor de un 97 % aunado a la disminución de la hidrólisis entre un 56–92 %; esta modificación resultó en un cambio en la relación de hidrólisis/ciclización desde 0.23 (WT) hasta 17. Igualmente, en

el grupo de van der Maarel para las enzimas ramificadoras de glucógeno (GBEs) de la familia GH 57 se reportó el papel de un asa flexible con un residuo de Y en la punta, el que también se extiende desde el dominio B de estas proteínas (Xiang et al., 2021). La modificación de estas asas tiene un efecto significativo en las actividades de hidrólisis y transglicosilación en las GBEs, probablemente debido al desplazamiento del residuo aromático que llevan en su punta, el cual puede estar interactuando con el sustrato durante la ocurrencia de estas reacciones.

Debido a que el residuo W131 de la *TmGTase* se encuentra en el subsitio +2, igualmente decidimos investigar el papel que pudiera jugar este residuo de forma independiente en la especificidad de reacción, afinidad por el aceptor y estabilidad de la enzima. En la mutante W131G se redujo drásticamente la actividad transglicosídica, aunque no tuvo un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.1$) en la hidrólisis, como sí ocurrió en la variante con el asa 130s recortada cuando se compararon con la forma WT de la proteína. La importancia de los residuos aromáticos en el control de la especificidad de reacción ha sido demostrada en varias enzimas que contienen un plegamiento del tipo $(\beta/\alpha)_n$ ($n = 7-8$), el que es característico de las familias GH 13 y 57. En estos casos ha sido sugerido que estos residuos aromáticos se pueden asociar con la prevención del flujo de agua hacia el sitio activo de estas proteínas. Por otra parte, también se han asociado con la disposición adecuada de los carbohidratos que actúan como aceptores, lo que es mediado por interacciones $\pi-\pi$. El posicionamiento de un nucleófilo aceptor de naturaleza sacarídica en los subsitios positivos de la enzima, al parecer tiene una mayor diversidad de acomodo que no afecta la reacción de transglicosilación (David et al., 2019). Contrariamente, en el caso de la hidrólisis también se ha sugerido que no solo es necesario el acceso del agua al sitio activo de la enzima, sino que su correcto posicionamiento y cantidad en el contexto de los residuos catalíticos también repercute en el favorecimiento de una u otra reacción (Larsbrink et al., 2012). En tal sentido, la evolución de estas enzimas pudiera haber ocurrido en el sentido de optimizar el ataque por el agua (hidrólisis) u otra molécula (transglicosilación) que actúen como nucleófilo aceptor.

El efecto de residuos aromáticos en los subsitios positivos sobre la especificidad de reacción se ha observado en la amilomaltasa de *T. brockianus* (Jung et al., 2011)(Jung et al., 2011)(Jung et al., 2011) y en la GTasa de *P. furiosus* (Tang et al., 2006). También este mecanismo se presenta en la enzima formadora de cicloalternano (CA) de *L. monocytogenes* (*LmCAFE*), la cual es transglicosídica y miembro de la familia GH 31. En este caso la mutación W430A incrementó la hidrólisis desde 17 a 97 demostrando así la importancia de este residuo aromático

en el favorecimiento de los eventos de hidrólisis o transglicosilación (Light et al., 2017)(Light et al., 2017)(Light et al., 2017). Un comportamiento similar se observó debido a la mutación Y233A en la GBE de *T. kodakarensis*, la que se localiza en un asa que se extiende desde el dominio B hacia el sitio activo de esta enzima, tal como se observa en la *TmGTasa*. Para la *TkGBE* esta modificación se asoció con un incremento del doble de la actividad hidrolítica sin cambios apreciables en la transglicosídica (Xiang et al., 2021). También ha sido reportado que no cualquier residuo aromático/hidrofóbico en la punta de un asa extendido desde fuera del dominio catalítico favorece la relación T/H en la misma forma. En el caso de la sustitución W324Y en la α -glucosidasa de *Schwanniomyces occidentalis* (GH31) se reduce la capacidad hidrolítica en conjunto con el cambio en el perfil de transglicosilación (Song et al., 2013). Los autores sugieren que este cambio se puede explicar a partir de las diferentes disposiciones de los sustratos en las inmediaciones del sitio de corte, el que comprende los subsitios -1 a +1.

En el caso de las variantes del dominio A, el aumento de la relación de H/T fue aún mayor que para las variantes del dominio B. Este efecto fue producto mayormente de la disminución de la actividad transglicosídica. Sin embargo, en el caso de la variante Q5E/S275W también se incrementó 4.4 veces la actividad hidrolítica de la WT. Es notorio que la modificación de los residuos 5 y 275, los cuales están más alejados del sitio activo que el W131 tengan un efecto más prominente en la especificidad de reacción.

El residuo W131 de *TmGTase* además de contribuir a la especificidad de reacción, también parece jugar un papel fundamental en la estabilidad de la proteína. Sin embargo, cuando se analizaron las tres variantes de la proteína mediante CD se obtuvieron espectros similares en la región entre 210-250 nm. En especial las señales a 222 nm, las que son indicativas del plegamiento de las hélices tuvieron valores similares. Las diferencias en la zona del UV lejano se deben a la composición de la solución en la que se realizó la medición (Tris 50 mM, NaCl 150 mM). Sin embargo, existen varios reportes donde se realizan mediciones en el UV lejano en presencia de elevadas concentraciones de sales (Reed et al., 2014). Esto puede ser posible debido a que el NaCl tiene baja absorbancia sobre los 205 nm; en el caso del Tris las absorbancias entre 210-220 nm son relativamente bajas (Micsonai et al., 2021). Incluso en algunos trabajos se resalta la necesidad de realizar las mediciones en las soluciones en las que se almacenan o usan las proteínas objeto de estudio (C. H. Li et al., 2011). Cuando esta variante de la proteína se purificó y se analizó por SDS-PAGE se observó una banda adicional de menor masa molar (~9 kDa menor que la proteína nativa), la que corresponde a una degradación. Sin

embargo, al parecer luego de ser purificada no continúa su modificación, la cual probablemente se pueda deber a proteólisis durante las etapas de expresión y purificación. Teniendo en cuenta que esta mutación puede afectar la estructura de esta parte del dominio B quizás exponga sitios sobre los que pueden actuar proteasas provenientes del hospedero. De igual forma, cuando se evalúa la estabilidad a 70 °C durante 12 h se mantiene más del 50 % de la actividad para las WT y las dos variantes con modificaciones en el dominio B, lo que confirma que los cambios en los perfiles de productos de estas variantes no se deben a la inactivación térmica de las enzimas. El análisis de estabilidad térmica de las variantes del dominio A también arroja resultados similares relativos a la estabilidad de esta proteína en condiciones extremas de temperatura (Liebl et al., 1992).

De acuerdo con los resultados de DM la posible función del residuo W131 de la *TmGTasa* parece estar asociada a la posibilidad estructural de alternar entre dos conformaciones, una abierta y la otra cerrada, que serían fundamentales para la reacción de transglicosilación. La sustitución de la cadena lateral de este residuo por un hidrógeno elimina la capacidad de la proteína para mantener una conformación cerrada, lo que resulta en un canal abierto a la entrada de agua, evidenciado por el cambio desde 5 hasta 10 Å en la distancia de los residuos que delimitan estas conformaciones (Figura 26). El hecho de que esta enzima muestra una actividad hidrolítica ligeramente mayor que la WT y una pérdida significativa de la transglicosilación sugiere que está mejor diseñada para llevar a cabo reacciones de hidrólisis. Sin embargo, el incremento en la exposición del sitio activo es un elemento que pudiera estar tributando a la disminución de la estabilidad observada en esta mutante sencilla. La distribución de las distancias entre el W131 y la K324 en las variantes del dominio catalítico tiene un comportamiento distinto del que se encontró en la forma WT de la proteína. Al parecer este fenómeno también pudiera ser parte del mecanismo por el que se disminuyó la actividad transglicosídica de las variantes del dominio A de la *TmGTasa*. Contrariamente a lo esperado, el acortamiento del asa del dominio B no tuvo un efecto catastrófico en la estabilidad de la proteína, como ocurrió con el cambio del residuo W131. Una posible explicación puede ser encontrado en los resultados de dinámica molecular en los que se muestra que la variante con el asa 130s acortada tiene un comportamiento diferente en las conformaciones que puede adquirir por el movimiento del asa que se modificó (Figura 25).

Aunque muchos grupos de investigación han tratado de correlacionar las modificaciones de los perfiles de T/H con diferentes cambios en la dinámica de la proteína no existe una clara

tendencia entre estos parámetros. Algunos no indican una correlación (Lundemo et al., 2017), mientras que otros sugieren que hay una relación directa (Seo et al., 2019) o inversa (Marneth et al., 2021; Seo et al., 2016) entre la reducción de la dinámica conformacional de la proteína y el incremento de la transglicosilación. La explicación presentada se basa en que el estado de transición correspondiente a la hidrólisis es más demandante desde el punto de vista estructural. De tal modo, en el caso de la transglicosilación, el aceptor tiene mayor libertad conformacional para producir la reacción de deglicosilación. En un intento de explicar el posible mecanismo por el cual se modificó la especificidad de reacción en las mutantes de la *TmGTasa* obtenidas se procedió a la realización de una simulación por una DM clásica. En base a los valores de RMSF se identificó un incremento de la flexibilidad en el dominio B para las cuatro formas de la proteína, aunque en el caso de la mutante con el asa 130s acortada también hubo un incremento en otra asa 130s que circunda la entrada al sitio activo.

Desde el punto de vista cinético el cambio más importante ocurrió en la velocidad máxima aparente (V_{max}), con una reducción de su valor cercana a 10 producto de las mutaciones en el dominio B de la proteína y de alrededor de 2-3 órdenes de magnitud en el caso de las mutaciones que se produjeron en el dominio A. Estos resultados sugieren que los elementos estructurales modificados en la *TmGTasa* están íntimamente relacionados con el establecimiento de la configuración catalítica. Un resultado similar fue obtenido para la 4- α -glucanotransferasa de *Pyrococcus furiosus* cuando se realizó la mutación W229H (subsitos +1/+2) la que tuvo una disminución de 4.2 veces en la constante catalítica de la transglicosilación, a la vez que la K_m del aceptor se incrementó 1.6 veces (Tang et al., 2006). También en la enzima formadora de cicloalternano proveniente de *L. monocytogenes* (*LmCAFE*), la actividad transglicosídica se redujo al reemplazar un asa por el estructuralmente equivalente de la enzima degradadora de cicloalternano de *Trueperella pyogenes* (*TpCADE*). Los autores atribuyeron este comportamiento a un mecanismo de ajuste inducido de Koshland. En este caso la enzima transglicosídica *LmCAFE* se encuentra en una conformación activa en la que existe una elevada afinidad por el azúcar aceptor. De forma contraria, en la enzima hidrolítica *TpCADE* los residuos que conforman el subsitio +1 se encuentran desordenados y solo van a una conformación activa al encontrarse la enzima con el sustrato (ajuste inducido). Producto de la sustitución del asa en *CAFE*, hay un costo entrópico para que la enzima llegue a la conformación que es activa para la reacción, lo que incrementa la energía de activación para la transglicosilación y disminuye la velocidad de la reacción, lo que permite que se produzca en mayor medida la reacción de hidrólisis (Light et al., 2017). De tal forma, la

dinámica y la disposición de los residuos catalíticos, en especial el residuo ácido-base, es un elemento estructural que controla el balance entre los eventos de hidrólisis y transglicosilación. Sin embargo, este fenómeno debe ser analizado con precaución, ya que existen otros elementos estructurales que gobiernan la eficiencia de la hidrólisis o transglicosilación. Tal es el caso de la red de puentes de hidrógenos que se establecen con el agua que en última instancia posicionan en la ubicación adecuada a las moléculas de agua que intervienen directamente en la reacción (atacando el GEI).

Adicional a la dinámica y al ambiente en el que se encuentran los residuos catalíticos, algunas otras propiedades fisicoquímicas como el pK_a , la distribución de cargas, la hidrofobicidad e hidrofiliidad parecen tener un efecto en la especificidad de reacción. La modificación de estos parámetros pudiera favorecer a uno u otro de los estados de transición correspondiente a cada una de las reacciones en competencia (Geronimo et al., 2018). En el caso del residuo que actúa como nucleófilo (D186) la distribución de pK_a durante el tiempo de la simulación por DM mostró que este residuo puede alternar entre dos conformaciones, una con pK_a cercano a 4, y la otra alrededor de 10. Sin embargo, si se considera el mecanismo de reacción el nucleófilo se tiene que caracterizar por valores de pK_a que estén en la zona ácida, por lo que la población principal a la que accede este residuo sería conformacionalmente inactiva. Este resultado se presentó en las tres variantes, pero alrededor de $pK_a = 3$ las dos variantes experimentaron una disminución de esta población, en comparación con la forma WT. Este hecho pudiera explicar la disminución de velocidad que se observó producto de todas las mutaciones realizadas. La inspección de estructuras representativas indica que existen conformaciones que se caracterizan por valores elevados de pK_a para el E216 cuando los de D186 tienen valores en la subpoblación alrededor de pK_a 3.00. Esta configuración está en correspondencia con la que deben tener estos dos residuos catalíticos durante la glicosilación de la enzima. Estos resultados sugieren la necesidad de una dinámica conformacional en la proteína que responda a cada uno de los estados necesarios para llevar a cabo toda la reacción.

Los resultados del análisis de los perfiles de actividad a diferentes pH de las enzimas que se obtuvieron por modificación del dominio B estuvieron en concordancia con los resultados de la simulación. Para el ajuste de los datos experimentales a una función de dos, tres o cuatro valores de pK_a se consideraron los valores de R^2 , en conjunto con los valores residuales, la forma de las curvas y el valor máximo de la actividad alcanzado con cada uno de los ajustes. En el caso de la enzima WT y de la W131G se observó un comportamiento más complejo que

se puede explicar a partir de la presencia de cuatro valores de pK_a , respectivamente. Esto es contrario a lo que ocurre en la especie en la que se acortó el asa proveniente del dominio B de la proteína, en la que el mejor ajuste se logró considerando solo dos valores de pK_a . El análisis de las estructuras representativas para cada una de las poblaciones de pK_a observadas para el residuo D186 o la H93, la que presumiblemente pudiera estar relacionada con la acción catalítica específica de la *TmGTasa* permitió la identificación de distintos residuos que conforman el sitio catalítico y que pudieran estar modificando el ambiente electrostático de esta parte de la proteína. Entre estos se encuentran además de la diada catalítica: Y54, D89, H93, H94, R184 y D278. En el caso de la Y54 se observa un alejamiento de este residuo en conformaciones competentes para el inicio de la catálisis. De igual manera la R184 se acerca al nucleófilo y se separa del residuo ácido-base. En este análisis se obtuvo que la mutante con el asa 130s acortada es la que mayor diferencias presentó en el perfil de actividad vs pH, lo que coincide con una distribución diferencial del residuo H94, el que pudiera estar teniendo una función más o menos marcada en cada una de las variantes de la enzima.

En la *TmGTasa*, la estructura de la enzima ha sido evolutivamente optimizada para favorecer la reacción de transglicosilación sobre la de hidrólisis. Uno de los posibles mecanismos por el cual pudiera estar ocurriendo esto es mediante la alternancia del sitio activo en conformaciones abiertas y cerradas que desfavorecen la entrada y posicionamiento de moléculas de agua en posiciones catalíticamente competentes. La presencia de un asa que se extiende desde el dominio B parece ser parte de esta estrategia para mantener el agua fuera del sitio activo de la enzima. Al mismo tiempo, la dinámica conformacional de otros asas que se posicionan en la entrada del sitio activo también pudiese estar influyendo en la especificidad de reacción. En este trabajo se llevó a cabo la modificación del asa que se extiende desde el dominio B y del residuo aromático que se encuentra en su punta para evaluar su efecto en estas dos reacciones que catalizan las GH. Igualmente se modificaron un par de residuos del dominio catalítico que se encuentran en contacto en la estructura 3D de la proteína. Estos cambios estuvieron asociados a un aumento de la H/T, fundamentalmente por la disminución de la actividad principal de la enzima. Probablemente el mecanismo relacionado con este cambio de especificidad tuvo que ver con la pérdida de la capacidad de la enzima para alternar entre diferentes conformaciones que mantuvieran el agua fuera de las inmediaciones del sitio catalítico, así como por la alteración de la red de puentes de hidrógenos en los que están involucrados los residuos que conforman el sitio activo de estas variantes de la enzima.

9. Conclusiones

- Las variantes del dominio B de la *TmGTasa* obtenidas tienen una relación de H/T de alrededor de 11. Este efecto fue asociado principalmente debido a la disminución de la actividad transglicosídica.
- Las modificaciones en el dominio A de la proteína estuvieron asociados a una disminución de la transglicosilación de hasta tres órdenes de magnitud, mientras que la actividad hidrolítica se cuatuplicó.
- La importancia del residuo W131 en el subsitio +2 fue demostrada por su reemplazo por una G.
- El residuo W131 no solo funciona para completar la estructura del sitio activo, sino que parece contribuir al flujo de agua hacia al sitio activo por la alternancia entre dos conformaciones, una abierta y la otra cerrada.
- El análisis del comportamiento cinético y dinámico de las variantes de la *TmGTasa* sugiere que la variación conformacional y el comportamiento del pK_a (experimentales y calculados) de los residuos del sitio activo pueden explicar las diferencias de especificidad observadas.
- El método basado en la frecuencia de aminoácidos encontrados en contactos 3D, permitió la identificación de posiciones que mostraron ser relevantes para la especificidad de reacción, aun cuando se encuentran entre 8.8 y 14.5 Å de distancia de los residuos catalíticos.

10. Perspectivas

- Continuar con la determinación de los parámetros cinéticos de las cinco variantes restantes de la *TmGTasa* obtenidas por modificación del dominio A.
- Explorar otras mutaciones involucradas en redes de contactos y que muestran un perfil distinto de enriquecimiento entre hidrolasas y transferasas.

11. Referencias

Alpha amylase market. (s/f). Recuperado el 29 de junio de 2023, de <https://www.persistencemarketresearch.com/market-research/alpha-amylase-market.asp>

Anisha, G. S. (2023). Biopharmaceutical applications of α -galactosidasas. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 70(1), 257–267. <https://doi.org/10.1002/bab.2349>

- Ara, K. Z. G., Linares-Pasten, J. A., Jonsson, J., Vilorio-Cols, M., Ulvenlund, S., Adlercreutz, P., & Karlsson, E. N. (2021). Engineering CGTase to improve synthesis of alkyl glycosides. *GLYCOBIOLOGY*, *31*(5), 603–612. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa109>
- Arreola-Barroso, R. A., Llopiz, A., Olvera, L., & Saab-Rincón, G. (2021). Modulating Glycoside Hydrolase Activity between Hydrolysis and Transfer Reactions Using an Evolutionary Approach. *Molecules*, *26*(21), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules26216586>
- Bahena-Molina, K. A., Sunder, S., Ganesan, A., Saini, R., Osorio-González, C. S., & Kaur Brar, S. (2022). *Pretreatment Technologies for Second-Generation Bioethanol Production* (pp. 209–241). https://doi.org/10.1007/978-3-031-01241-9_10
- Bai, Y., van der Kaaij, R. M., Leemhuis, H., Pijning, T., van Leeuwen, S. S., Jin, Z., & Dijkhuizen, L. (2015). Biochemical Characterization of the Lactobacillus reuteri Glycoside Hydrolase Family 70 GTFB Type of 4,6- α -Glucanotransferase Enzymes That Synthesize Soluble Dietary Starch Fibers. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(20), 7223–7232. <https://doi.org/10.1128/AEM.01860-15>
- Bailey, J. M., & Whelan, W. J. (1961). Physical Properties of Starch I. RELATIONSHIP BETWEEN IODINE STAIN AND CHAIN LENGTH*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, *236*(4), 969–973. <http://www.jbc.org/>
- Basha, M. T., Alghanmi, R. M., Soliman, S. M., Abdel-Rahman, L. H., Shehata, M. R., & Alharby, W. J. (2022). Synthesis, spectroscopic characterizations, biological activity, DNA-binding investigation combined with DFT studies of new proton-transfer complexes of 2,4-diaminopyrimidine with 2,6-dichloro-4-nitrophenol and 3,5-dinitrosalicylic acid. *Journal of Molecular Liquids*, *350*, 118508. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118508>
- Beltagy, E. A., Abouelwafa, A., & Barakat, K. M. (2022). Bioethanol production from immobilized amylase produced by marine *Aspergillus flavus* AUMC10636. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, *48*(4), 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2022.02.003>
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T. A. P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D313–D319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- Bissaro, B., Saurel, O., Arab-Jaziri, F., Saulnier, L., Milon, A., Tenkanen, M., Monsan, P., O'Donohue, M. J., & Fauré, R. (2014). Mutation of a pH-modulating residue in a GH51 α -L-arabinofuranosidase leads to a severe reduction of the secondary hydrolysis of transfuranosylation products. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, *1840*(1), 626–636. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.013>
- Bourne, Y., & Henrissat, B. (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: Families and functional modules. *Current Opinion in Structural Biology*, *11*(5), 593–600. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00253-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00253-0)
- Braun, C., Lindhorst, T., Madsen, N. B., & Withers, S. G. (1996). Identification of Asp 549 as the Catalytic Nucleophile of Glycogen-Debranching Enzyme via Trapping of the Glycosyl–Enzyme Intermediate. *Biochemistry*, *35*(17), 5458–5463. <https://doi.org/10.1021/bi9526488>

- Brooks, B. R., Brooks, C. L., Mackerell, A. D., Nilsson, L., Petrella, R. J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A. R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoseck, M., Im, W., ... Karplus, M. (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(10), 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>
- Cabrera, Ma. Á., & Blamey, J. M. (2018). Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. *Biological Research*, *51*(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0186-3>
- Cochran, B., Lunday, D., & Miskevich, F. (2008). Kinetic Analysis of Amylase Using Quantitative Benedict's and Iodine Starch Reagents. *Journal of Chemical Education*, *85*(3), 401. <https://doi.org/10.1021/ed085p401>
- Collet, L., Vander Wauven, C., Oudjama, Y., Galleni, M., & Dutoit, R. (2022). Highlighting the factors governing transglycosylation in the GH5_5 endo-1,4- β -glucanase RBcell. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, *78*(3), 278–289. <https://doi.org/10.1107/S2059798321013541>
- Da Lage, J.-L., Feller, G., & Janecek, ?. (2004). Horizontal gene transfer from Eukarya to Bacteria and domain shuffling: the α -amylase model. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, *61*(1), 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3334-y>
- Damián-Almazo, J. Y., Moreno, A., López-Munguía, A., Soberón, X., González-Muñoz, F., & Saab-Rincón, G. (2008). Enhancement of the alcoholytic activity of α -amylase AmyA from *Thermotoga maritima* MSB8 (DSM 3109) by site-directed mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(16), 5168–5177. <https://doi.org/10.1128/AEM.00121-08>
- Dangkulwanich, M., Kongnithigarn, K., & Aurnoppakhun, N. (2018). Colorimetric Measurements of Amylase Activity: Improved Accuracy and Efficiency with a Smartphone. *Journal of Chemical Education*, *95*(1), 141–145. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00468>
- Das, S., Raucci, U., Neves, R. P. P., Ramos, M. J., & Parrinello, M. (2023). How and When Does an Enzyme React? Unraveling α -Amylase Catalytic Activity with Enhanced Sampling Techniques. *ACS Catalysis*, *13*(12), 8092–8098. <https://doi.org/10.1021/acscatal.3c01473>
- David, B., Arnaud, P., Tellier, C., & Sanejouand, Y.-H. (2019). Toward the design of efficient transglycosidases: the case of the GH1 of *Thermus thermophilus*. *Protein Eng Des Sel*, *32*(7), 309–316. <https://doi.org/10.1093/protein/gzz032>
- Davies, G. J., Wilson, K. S., & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J*, *321*(2), 557–559. <https://doi.org/10.1042/bj3210557>
- Dutt, S., & Tyagi, V. (2021). Biocatalytic synthesis of quinoline derivatives via α -amylase catalysed one-pot domino aza-Michael/Aldol/aromatization reactions. *Tetrahedron Letters*, *87*, 153527. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2021.153527>

- Egorova, K. S., Smirnova, N. S., & Toukach, P. V. (2021). CSDB_GT, a curated glycosyltransferase database with close-to-full coverage on three most studied nonanimal species. *Glycobiology*, *31*(5), 524–529. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa107>
- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). *Coot*: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *60*(12), 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of *Coot*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *66*(4), 486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
- Feller, G., Bonneau, M., & Da Lage, J.-L. (2021). Amyrel, a novel glucose-forming α -amylase from *Drosophila* with 4- α -glucanotransferase activity by disproportionation and hydrolysis of maltooligosaccharides. *Glycobiology*, *31*(9), 1134–1144. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab036>
- Feng, J., Zhang, P., Cui, Y., Li, K., Qiao, X., Zhang, Y.-T., Li, S.-M., Cox, R. J., Wu, B., Ye, M., & Yin, W.-B. (2017). Regio- and Stereospecific *O*-Glycosylation of Phenolic Compounds Catalyzed by a Fungal Glycosyltransferase from *Mucor hiemalis*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, *359*(6), 995–1006. <https://doi.org/10.1002/adsc.201601317>
- Geronimo, I., Payne, C. M., & Sandgren, M. (2018). The role of catalytic residue pKa on the hydrolysis/transglycosylation partition in family 3 β -glucosidases. *Organic and Biomolecular Chemistry*, *16*(2), 316–324. <https://doi.org/10.1039/c7ob02558k>
- Gonçalves, C., Rodriguez-Jasso, R. M., Gomes, N., Teixeira, J. A., & Belo, I. (2010). Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, *2*(12), 2046. <https://doi.org/10.1039/c0ay00525h>
- Govindasamy, S., Oates, C. G., & Wong, H. A. (1992). Characterization of changes of sago starch components during hydrolysis by a thermostable alpha-amylase. *Carbohydrate Polymers*, *18*(2), 89–100. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(92\)90130-I](https://doi.org/10.1016/0144-8617(92)90130-I)
- Guo, Z., Wang, L., Su, L., Chen, S., Xia, W., André, I., Rovira, C., Wang, B., & Wu, J. (2022). A Single Hydrogen Bond Controls the Selectivity of Transglycosylation vs Hydrolysis in Family 13 Glycoside Hydrolases. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, *13*(24), 5626–5632. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.2c01136>
- Hameed, U., Price, I., Ke, A., Wilson, D. B., & Mirza, O. (2017). Functional characterization and crystal structure of thermostable amylase from *Thermotoga petrophila*, reveals high thermostability and an unusual form of dimerization. *BBA - Proteins and Proteomics*, *1865*(10), 1237–1245. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.06.015>
- Hámori, C., Kandra, L., & Gyémánt, G. (2022). LDAm α , an α -amylase from Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) with transglycosylation activity. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/10242422.2022.2050707>
- Han, R., Li, J., Shin, H.-D., Chen, R. R., Du, G., Liu, L., & Chen, J. (2013). Carbohydrate-Binding Module–Cyclodextrin Glycosyltransferase Fusion Enables Efficient Synthesis of 2-*O*- β -D-Glucopyranosyl- α -Ascorbic Acid with Soluble Starch

- as the Glycosyl Donor. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(10), 3234–3240. <https://doi.org/10.1128/AEM.00363-13>
- Hansson, T., Kaper, T., Oost, J. Van Der, Vos, W. M. De, & Adlercreutz, P. (2001). Improved Oligosaccharide Synthesis by Protein Engineering of β -Glucosidase CelB from Hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol Bioeng.*, 73(3), 203–210. <https://doi.org/10.1002/bit.1052>
- Hashim, S. O., Delgado, O. D., Martínez, M. A., Kaul, R.-H., Mulaa, F. J., & Mattiasson, B. (2005). Alkaline active maltohexaose-forming α -amylase from *Bacillus halodurans* LBK 34. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(1), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.07.017>
- Heinrich, P., Huber, W., & Liebl, W. (1994). Expression in *Escherichia coli* and Structure of the Gene Encoding 4- α -Glucanotransferase from *Thermotoga maritima*. Classification of Maltodextrin Glycosyltransferases into Two Distantly Related Enzyme Subfamilies. *Systematic and Applied Microbiology*, 17(3), 297–305. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80044-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80044-5)
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., & Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18(12), 1463–1472. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)
- Holm, L., Koivula, A. K., Lehtovaara, P. M., Hemminki, A., & Knowles, J. K. C. (1990). Random mutagenesis used to probe the structure and function of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Protein Engineering, Design and Selection*, 3(3), 181–191. <https://doi.org/10.1093/protein/3.3.181>
- Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., De Vries, J. N., Adamse, P., Jacobsen, E., Witholt, B., & Feenstra, W. J. (1988). Rapid estimation of the amylose/amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato. *Potato Research*, 31(2), 241–246. <https://doi.org/10.1007/BF02365532>
- Huber, W., & Liebl, W. (1994). Acceptor Specificity of 4- α -Glucanotransferase of *Thermotoga Maritima*. *Biocatalysis*, 11(2), 105–115. <https://doi.org/10.3109/10242429409034381>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Hwang, K. Y., Song, H. K., Chang, C., Lee, J., & Yeong, S. (1997). Crystal Structure of Thermostable α -Amylase from *Bacillus licheniformis* Refined at 1.7 Å Resolution. *Mol. Cells*, 7(2), 251–258.
- Hynninen, A., & Crowley, M. F. (2014). New faster CHARMM molecular dynamics engine. *Journal of Computational Chemistry*, 35(5), 406–413. <https://doi.org/10.1002/jcc.23501>
- James, M., Murtola, T., Schulz, R., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS : High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *Software X*, 2(1–2), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>

- Janeček, S., Svensson, B., & Henrissat, B. (1997). Domain Evolution in the α -Amylase Family. *Journal of Molecular Evolution*, 45(3), 322–331. <https://doi.org/10.1007/PL00006236>
- Janeček, Š., Svensson, B., & MacGregor, E. A. (2014). α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(7), 1149–1170. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1388-z>
- Jers, C., Michalak, M., Larsen, D. M., Kepp, K. P., Li, H., Guo, Y., Kirpekar, F., Meyer, A. S., & Mikkelsen, J. D. (2014). Rational Design of a New *Trypanosoma rangeli* Trans-Sialidase for Efficient Sialylation of Glycans. *PLoS ONE*, 9(1), e83902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083902>
- Jitonnom, J., Ketudat-Cairns, J. R., & Hannongbua, S. (2018). QM/MM modeling of the hydrolysis and transfructosylation reactions of fructosyltransferase from *Aspergillus japonicus*, an enzyme that produces prebiotic fructooligosaccharide. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 79, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.11.010>
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
- John, M., Schmidt, J., & Kneifel, H. (1983). Iodine—maltosaccharide complexes: relation between chain-length and colour. *Carbohydrate Research*, 119, 254–257. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(83\)84061-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(83)84061-0)
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Jung, J.-H., Jung, T.-Y., Seo, D.-H., Yoon, S.-M., Choi, H.-C., Park, B. C., Park, C.-S., & Woo, E.-J. (2011). Structural and functional analysis of substrate recognition by the 250s loop in amylomaltase from *Thermus brockianus*. *Proteins. Struct., Funct., Genet.*, 79(2), 633–644. <https://doi.org/10.1002/prot.22911>
- Kelly, R. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2007). Conversion of a Cyclodextrin Glucanotransferase into an α -Amylase: Assessment of Directed Evolution Strategies. *Biochemistry*, 46(39), 11216–11222. <https://doi.org/10.1021/bi701160h>
- Kelly, R. M., Leemhuis, H., Rozeboom, H. J., van Oosterwijk, N., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (2008). Elimination of competing hydrolysis and coupling side reactions of a cyclodextrin glucanotransferase by directed evolution. *Biochemical Journal*, 413(3), 517–525. <https://doi.org/10.1042/BJ20080353>
- Kong, D., Wang, L., Su, L., & Wu, J. (2021). Effect of Leu 277 on Disproportionation and Hydrolysis Activity in *Bacillus stearothermophilus* NO2 Cyclodextrin Glucosyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(12), 1–13. <https://doi.org/10.1128/AEM.03151-20>

- Kuriki, T., & Imanaka, T. (1999). The concept of the α -amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(5), 557–565. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80114-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80114-5)
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Larsbrink, J., Izumi, A., Hemsworth, G. R., Davies, G. J., & Brumer, H. (2012). Structural Enzymology of Cellvibrio japonicus Agd31B Protein Reveals α -Transglucosylase Activity in Glycoside Hydrolase Family 31. *Journal of Biological Chemistry*, 287(52), 43288–43299. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.416511>
- Lee, J., Cheng, X., Swails, J. M., Yeom, M. S., Eastman, P. K., Lemkul, J. A., Wei, S., Buckner, J., Jeong, J. C., Qi, Y., Jo, S., Pande, V. S., Case, D. A., Brooks, C. L., MacKerell, A. D., Klauda, J. B., & Im, W. (2016). CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 12(1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>
- Leemhuis, H. (2003). Engineering cyclodextrin glycosyltransferase into a starch hydrolase with a high exo-specificity. *Journal of Biotechnology*, 103(3), 203–212. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00126-3)
- Leemhuis, H., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (2002). Mutations converting cyclodextrin glycosyltransferase from a transglycosylase into a starch hydrolase. *FEBS Letters*, 514(2–3), 189–192. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02362-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02362-1)
- Leemhuis, H., Kelly, R. M., & Dijkhuizen, L. (2010). Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 823–835. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2221-3>
- Leemhuis, H., Rozeboom, H. J., Wilbrink, M., Euverink, G.-J. W., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (2003). Conversion of Cyclodextrin Glycosyltransferase into a Starch Hydrolase by Directed Evolution: The Role of Alanine 230 in Acceptor Subsite +1. *Biochemistry*, 42(24), 7518–7526. <https://doi.org/10.1021/bi034439q>
- Leskovac, V. (2004). *Comprehensive Enzyme Kinetics*. Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/b100340>
- Li, C., Du, M., Cheng, B., Wang, L., Liu, X., Ma, C., Yang, C., & Xu, P. (2014). Close relationship of a novel Flavobacteriaceae α -amylase with archaeal α -amylases and good potentials for industrial applications. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-18>
- Li, C. H., Nguyen, X., Narhi, L., Chemmalil, L., Towers, E., Muzammil, S., Gabrielson, J., & Jiang, Y. (2011). Applications of circular dichroism (CD) for structural analysis of proteins: qualification of near- and far-UV CD for protein higher order structural analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(11), 4642–4654. <https://doi.org/10.1002/jps.22695>

- Li, H., Robertson, A. D., & Jensen, J. H. (2005). Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins.Struct.,Funct., Genet.*, *61*(4), 704–721. <https://doi.org/10.1002/prot.20660>
- Liebl, W., Feil, R., Gabelsberger, J., Kellermann, J., & Schleifer, K. -H. (1992). Purification and characterization of a novel thermostable 4- α -glucanotransferase of *Thermotoga maritima* cloned in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, *207*(1), 81–88. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17023.x>
- Light, S. H., Cahoon, L. A., Mahasenan, K. V., Lee, M., Boggess, B., Halavaty, A. S., Mobashery, S., Freitag, N. E., & Anderson, W. F. (2017). Transferase Versus Hydrolase: The Role of Conformational Flexibility in Reaction Specificity. *Structure*, *25*(2), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.12.007>
- Lundemo, P., Karlsson, E. N., & Adlercreutz, P. (2017). Eliminating hydrolytic activity without affecting the transglycosylation of a GH1 β -glucosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(3), 1121–1131. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7833-9>
- Marneth, K., Elst, H. Van Den, Cramer-blok, A., & Codee, J. (2021). Tuning the Transglycosylation Reaction of a GH11 Xylanase by a Delicate Enhancement of its Thumb Flexibility. *ChemBioChem*, *22*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000856>
- McCarter, J. D., & Withers, S. G. (1996). 5-Fluoro Glycosides: A New Class of Mechanism-Based Inhibitors of Both α - and β -Glucosidases. *Journal of the American Chemical Society*, *118*(1), 241–242. <https://doi.org/10.1021/ja952732a>
- Mehta, D., & Satyanarayana, T. (2016). Bacterial and Archaeal α -Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01129>
- Meng, E. C., Petterson, E. F., Couch, G. S., Huang, C. C., & Ferrin, T. E. (2006). Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics*, *7*(1), 339. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-339>
- Mészáros, Z., Petrásková, L., Kulik, N., Pelantová, H., Bojarová, P., Křen, V., & Slámová, K. (2022). Hypertransglycosylating Variants of the GH20 β -N -Acetylhexosaminidase for the Synthesis of Chitooligomers. *Advanced Synthesis & Catalysis*, *364*(12), 2009–2022. <https://doi.org/10.1002/adsc.202200046>
- Micsonai, A., Bulyáki, É., & Kardos, J. (2021). *BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy* (pp. 175–189). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_11
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Nakajima, R., Imanaka, T., & Aiba, S. (1986). Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *23*(5). <https://doi.org/10.1007/BF00257032>
- Nielsen, J. E., & McCammon, J. A. (2003). Calculating pKa values in enzyme active sites. *Protein Science*, *12*(9), 1894–1901. <https://doi.org/10.1110/ps.03114903>

- Nyffenegger, C., Nordvang, R. T., Jers, C., Meyer, A. S., & Mikkelsen, J. D. (2017). Design of *Trypanosoma rangeli* sialidase mutants with improved trans-sialidase activity. *PLOS ONE*, *12*(2), e0171585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171585>
- Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M., & Jensen, J. H. (2011). PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pK_a Predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *7*(2), 525–537. <https://doi.org/10.1021/ct100578z>
- Ono, S., Tsuchihashi, S., & Kuge, T. (1953). On the Starch—Iodine Complex. *Journal of the American Chemical Society*, *75*(14), 3601–3602. <https://doi.org/10.1021/ja01110a519>
- Ostapska, H., Raju, D., Lehoux, M., Lacdao, I., Gilbert, S., Sivarajah, P., Bamford, N. C., Baker, P., Nguyen, T. T. M., Zacharias, C. A., Gravelat, F. N., Howell, P. L., & Sheppard, D. C. (2021). Preclinical Evaluation of Recombinant Microbial Glycoside Hydrolases in the Prevention of Experimental Invasive Aspergillosis. *mBio*, *12*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.02446-21>
- Park, J.-H., Kim, H.-J., Kim, Y.-H., Cha, H., Kim, Y.-W., Kim, T.-J., Kim, Y.-R., & Park, K.-H. (2007). The action mode of *Thermus aquaticus* YT-1 4- α -glucanotransferase and its chimeric enzymes introduced with starch-binding domain on amylose and amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, *67*(2), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.05.018>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, *25*(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Qin, Z., Yang, S., Zhao, L., You, X., Yan, Q., & Jiang, Z. (2017). Catalytic Mechanism of a Novel Glycoside Hydrolase Family 16 “Elongating” β -Transglycosylase. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(5), 1666–1678. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.762419>
- Ramasubbu, N., Rangunath, C., & Mishra, P. J. (2003). Probing the Role of a Mobile Loop in Substrate Binding and Enzyme Activity of Human Salivary Amylase. *Journal of Molecular Biology*, *325*(5), 1061–1076. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01326-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01326-8)
- RCSB Protein Data Bank. (s/f). Recuperado el 22 de mayo de 2023, de RCSB Protein Data Bank
- Reed, C. J., Bushnell, S., & Evilia, C. (2014). Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopy of Cysteinyl-tRNA Synthetase from *Halobacterium salinarum* ssp. NRC-1 Demonstrates that Group I Cations Are Particularly Effective in Providing Structure and Stability to This Halophilic Protein. *PLoS ONE*, *9*(3), e89452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089452>
- Rivas, F., Parra, A., Martinez, A., & Garcia-Granados, A. (2013). Enzymatic glycosylation of terpenoids. *Phytochemistry Reviews*, *12*(2), 327–339. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9301-9>
- Rivera, M. H., López-Munguía, A., Soberón, X., & Saab-Rincón, G. (2003). α -Amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and

- transglycosylation activity. *Protein Engineering*, 16(7), 505–514. <https://doi.org/10.1093/protein/gzg060>
- Roujeinikova, A., Raasch, C., Sedelnikova, S., Liebl, W., & Rice, D. W. (2001). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies on 4- α -glucanotransferase from *Thermotoga maritima*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 57(7), 1046–1047. <https://doi.org/10.1107/S0907444901007740>
- Roujeinikova, A., Raasch, C., Sedelnikova, S., Liebl, W., & Rice, D. W. (2002). Crystal structure of *Thermotoga maritima* 4- α -glucanotransferase and its acarbose complex: Implications for substrate specificity and catalysis. *Journal of Molecular Biology*, 321(1), 149–162. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00570-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00570-3)
- Rundle, R. E., Foster, J. F., & Baldwin, R. R. (1944). On the Nature of the Starch—Iodine Complex ¹. *Journal of the American Chemical Society*, 66(12), 2116–2120. <https://doi.org/10.1021/ja01240a031>
- Saab-Rincón, G., Del-Río, G., Santamaría, R. I., López-Munguía, A., & Soberón, X. (1999). Introducing transglycosylation activity in a liquefying α -amylase. *FEBS Letters*, 453(1–2), 100–106. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00671-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00671-7)
- Saenger, W. (1984). The structure of the blue starch-iodine complex. *Naturwissenschaften*, 71(1), 31–36. <https://doi.org/10.1007/BF00365977>
- Saqib, A. A. N., & Whitney, P. J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy*, 35(11), 4748–4750. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.09.013>
- Schwede, T. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381–3385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>
- Seo, D.-H., Jung, J.-H., Jung, D.-H., Park, S., Yoo, S.-H., Kim, Y.-R., & Park, C.-S. (2016). An unusual chimeric amylosucrase generated by domain-swapping mutagenesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 86, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.01.004>
- Seo, D.-H., Jung, J.-H., & Park, C.-S. (2019). Improved polymerization activity of *Deinococcus geothermalis* amylosucrase by semi-rational design: Effect of loop flexibility on the polymerization reaction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.139>
- Song, K.-M., Okuyama, M., Nishimura, M., Tagami, T., Mori, H., & Kimura, A. (2013). Aromatic Residue on $\beta \rightarrow \alpha$ Loop 1 in the Catalytic Domain Is Important to the Transglycosylation Specificity of Glycoside Hydrolase Family 31 α -Glucosidase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(8), 1759–1765. <https://doi.org/10.1271/bbb.130325>
- Swift, H. J., Brady, L., Derewenda, Z. S., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Turkenburg, J. P., & Wilkinson, A. J. (1991). Structure and molecular model refinement of *Aspergillus oryzae* (TAKA) α -amylase: an application of the simulated-annealing method. *Acta Crystallogr B*, 47(4), 535–544. <https://doi.org/10.1107/S0108768191001970>

- Swiss-Model. (s/f). *Structure Assessment*. Recuperado el 22 de mayo de 2023, de <https://swissmodel.expasy.org/assess>
- Tang, S.-Y., Yang, S.-J., Cha, H., Woo, E.-J., Park, C., & Park, K.-H. (2006). Contribution of W229 to the transglycosylation activity of 4- α -glucanotransferase from *Pyrococcus furiosus*. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 1764(10), 1633–1638. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.08.013>
- Teze, D., Hendrickx, J., Czjzek, M., Ropartz, D., Sanejouand, Y.-H., Tran, V., Tellier, C., & Dion, M. (2014). Semi-rational approach for converting a GH1 -glycosidase into a -transglycosidase. *Protein Engineering Design and Selection*, 27(1), 13–19. <https://doi.org/10.1093/protein/gzt057>
- Teze, D., Hendrickx, J., Dion, M., Tellier, C., Woods, V. L., Tran, V., & Sanejouand, Y. H. (2013). Conserved water molecules in family 1 glycosidases: A DXMS and molecular dynamics study. *Biochem*, 52(34), 5900–5910. <https://doi.org/10.1021/bi400260b>
- Thoma, J. A., & French, D. (1960). The Starch-Iodine-Iodide Interaction. Part I. Spectrophotometric Investigations ¹. *Journal of the American Chemical Society*, 82(16), 4144–4147. <https://doi.org/10.1021/ja01501a004>
- Timonina, D., Sharapova, Y., Švedas, V., & Suplatov, D. (2021). Bioinformatic analysis of subfamily-specific regions in 3D-structures of homologs to study functional diversity and conformational plasticity in protein superfamilies. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 1302–1311. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.005>
- Tran, L. T., Blay, V., Luang, S., Eurtivong, C., Choknud, S., González-Díaz, H., & Ketudat Cairns, J. R. (2019). Engineering faster transglycosidases and their acceptor specificity. *Green Chemistry*, 21(10), 2823–2836. <https://doi.org/10.1039/C9GC00621D>
- Tran, P. L., Cha, H. J., Lee, J. S., Park, S. H., Woo, E. J., & Park, K. H. (2014). Introducing transglycosylation activity in *Bacillus licheniformis* α -amylase by replacement of His235 with Glu. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451(4), 541–547. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.019>
- Tumhom, S., Krusong, K., & Pongsawasdi, P. (2017). Y418 in 410s loop is required for high transglucosylation activity and large-ring cyclodextrin production of amyloamylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 488(3), 516–521. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.078>
- Uitdehaag, J. C., Mosi, R., Kalk, K. H., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., Withers, S. G., & Dijkstra, B. W. (1999). X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the alpha-amylase family. *Nature structural biology*, 6(5), 432–436. <https://doi.org/10.1038/8235>
- Vafina, A., Proskurina, V., Vorobiev, V., Evtugin, V. G., Egkova, G., & Nikitina, E. (2018). Physicochemical and Morphological Characterization of Potato Starch Modified by Bacterial Amylases for Food Industry Applications. *Journal of Chemistry*, 2018, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/1627540>
- van der Veen, B. A., Leemhuis, H., Kralj, S., Uitdehaag, J. C. M., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (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(48), 44557–44562. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107533200>

- Vetter, D., & Thorn, W. (1992). ¹³C-NMR Spectroscopic Detection of Malto-oligosaccharide Complexes. *Starch - Stärke*, 44(7), 271–274. <https://doi.org/10.1002/star.19920440708>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wu, J.-Y., Ding, H.-Y., Wang, T.-Y., Tsai, Y.-L., Ting, H.-J., & Chang, T.-S. (2021). Improving Aqueous Solubility of Natural Antioxidant Mangiferin through Glycosylation by Maltogenic Amylase from *Parageobacillus galactosidasius* DSM 18751. *Antioxidants*, 10(11), 1817. <https://doi.org/10.3390/antiox10111817>
- Xia, M., Wang, L., Yang, Z., & Chen, H. (2015). A novel digital color analysis method for rapid glucose detection. *Analytical Methods*, 7(16), 6654–6663. <https://doi.org/10.1039/C5AY01233C>
- Xiang, G., Leemhuis, H., & van der Maarel, M. J. E. C. (2021). Structural elements determining the transglycosylating activity of glycoside hydrolase family 57 glycogen branching enzymes. *Proteins.Struct.,Funct., Genet.*, prot.26200. <https://doi.org/10.1002/prot.26200>
- Xu, L., Qi, T., Xu, L., Lu, L., & Xiao, M. (2016). Recent progress in the enzymatic glycosylation of phenolic compounds. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 35(1), 1–23. <https://doi.org/10.1080/07328303.2015.1137580>
- Zuo, F., Su, L., Kong, D., Wang, L., Wu, J., & Chen, S. (2022). Molecular modification of *Bacillus stearothermophilus* NO2 cyclodextrin glycosyltransferase and preparation of α -cyclodextrin. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2(4), 695–704. <https://doi.org/10.1007/s43393-022-00099-3>

12. Publicación principal

The Protein Journal
https://doi.org/10.1007/s10930-023-10136-2



The Role of a Loop in the Non-catalytic Domain B on the Hydrolysis/Transglycosylation Specificity of the 4- α -Glucanotransferase from *Thermotoga maritima*

Alexey Llopiz¹ · Marco A. Ramírez-Martínez² · Leticia Olvera¹ · Wendy Xolalpa-Villanueva¹ · Nina Pastor² · Gloria Saab-Rincon¹

Accepted: 27 June 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

The mechanism by which glycoside hydrolases control the reaction specificity through hydrolysis or transglycosylation is a key element embedded in their chemical structures. The determinants of reaction specificity seem to be complex. We looked for structural differences in domain B between the 4- α -glucanotransferase from *Thermotoga maritima* (TmGTase) and the α -amylase from *Thermotoga petrophila* (TpAmylase) and found a longer loop in the former that extends towards the active site carrying a W residue at its tip. Based on these differences we constructed the variants W131G and the partial deletion of the loop at residues 120-124/128-131, which showed a 11.6 and 11.4-fold increased hydrolysis/transglycosylation (H/T) ratio relative to WT protein, respectively. These variants had a reduction in the maximum velocity of the transglycosylation reaction, while their affinity for maltose as the acceptor was not substantially affected. Molecular dynamics simulations allow us to rationalize the increase in H/T ratio in terms of the flexibility near the active site and the conformations of the catalytic acid residues and their associated pK_as.

Keywords Hydrolysis · Transglycosylation · Glycosidases · Glucanotransferase · Reaction-specificity

1 Introduction

Glycoside hydrolases (GHs) catalyze the degradation of polysaccharides such as starch and glycogen, energy reservoirs widely used by living organisms, and other glycosyl substrates. These enzymes are broadly distributed in bacteria, fungi, yeasts, plants, and animals and have important biological, industrial, and medical applications [1]. A particular group of GHs is family 13 also known as alpha-amylases (EC 3.2.1.1). This family comprises a large group of starch hydrolases with at least 20 different specificities [2, 3], some of which catalyze hydrolysis and transfer reactions of α -D-glycosidic linkages. Glucanotransferases (EC 2.4.1.25), on

the other hand, transfer the remainder of the glycoside to another glycoside rather than to water after cleavage of the glycosidic bond. Many members of this family of enzymes catalyze both reactions with a bias dependent on the specific enzyme [4]. For example, the α -amylases of *B. licheniformis* and *B. stearothermophilus* are exclusively hydrolytic [5–7], while others, such as the 4- α -glucanotransferase of *Thermotoga maritima* (TmGTase) are predominantly transglycosidic [8]. However, there is also a group within the GH13 family in which both reactions are present and compete with one another. These include α -amylase from *T. maritima* [9, 10], cyclodextrin glucanotransferase NO2 from *B. stearothermophilus* [11, 12] and Amyrel (amylase from *Drosophila melanogaster*) [13]. GH13 family glycosidases share a similar core 3D-structure, comprising three domains: Domain A formed by a $(\beta/\alpha)_8$ barrel catalytic domain, which is interrupted by the smaller and more variable domain B between the third β -strand and the third α -helix, and domain C at the end of domain A, with a Greek key structure. Besides sharing the catalytic architecture, and reaction mechanism, some of them, mainly those with transglycosidase activity, have a variable number of extra domains either at the N- or

✉ Gloria Saab-Rincon
gloria.saab@ibt.unam.mx

¹ Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

² Centro de Investigación en Dinámica Celular, IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

Published online: 18 July 2023

Springer

13. Otras publicaciones

Article

Modulating Glycoside Hydrolase Activity between Hydrolysis and Transfer Reactions Using an Evolutionary Approach

Rodrigo A. Arreola-Barroso, Alexey Llopiz , Leticia Olvera and Gloria Saab-Rincón * 

Departamento de Ingeniería Celular y Biotáctilisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62271, Mexico; rodrigo.arreola@ibt.unam.mx (R.A.A.-B.); alexey.llopiz@ibt.unam.mx (A.L.); leticia.olvera@ibt.unam.mx (L.O.)

* Correspondence: gloria.saab@ibt.unam.mx

Abstract: The proteins within the CAZy glycoside hydrolase family GH13 catalyze the hydrolysis of polysaccharides such as glycogen and starch. Many of these enzymes also perform transglycosylation in various degrees, ranging from secondary to predominant reactions. Identifying structural determinants associated with GH13 family reaction specificity is key to modifying and designing enzymes with increased specificity towards individual reactions for further applications in industrial, chemical, or biomedical fields. This work proposes a computational approach for decoding the determinant structural composition defining the reaction specificity. This method is based on the conservation of coevolving residues in spatial contacts associated with reaction specificity. To evaluate the algorithm, mutants of α -amylase (*TmAmyA*) and glucanotransferase (*TmGTase*) from *Thermotoga maritima* were constructed to modify the reaction specificity. The K98P/D99A/H222Q variant from *TmAmyA* doubled the transglycosylation/hydrolysis (T/H) ratio while the M279N variant from *TmGTase* increased the hydrolysis/transglycosylation ratio five-fold. Molecular dynamic simulations of the variants indicated changes in flexibility that can account for the modified T/H ratio. An essential contribution of the presented computational approach is its capacity to identify residues outside of the active center that affect the reaction specificity.

Keywords: transglycosylation; hydrolysis; contact-residues; amylase; glucanotransferase; coevolution; enrichment-factor; specificity



Citation: Arreola-Barroso, R.A.; Llopiz, A.; Olvera, L.; Saab-Rincón, G. Modulating Glycoside Hydrolase Activity between Hydrolysis and Transfer Reactions Using an Evolutionary Approach. *Molecules* **2021**, *26*, 6586. <https://doi.org/10.3390/molecules26216586>

Academic Editor: Stefan Janecek

Received: 23 September 2021
Accepted: 28 October 2021
Published: 30 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Enzymes are accelerators of chemical reactions that occur in living cells, which also work in vitro, making their use in the laboratory, in medical applications, and in industry possible [1–3]. Tailoring an enzyme's ability to carry out specific reactions is one of the greatest challenges that must be met in order to move on to a more sustainable biocatalysis process [4]. In this sense, directed evolution has proven to be a valuable strategy for evolving functions, with the limitation of requiring extensive screening efforts, in order to find an improved biocatalyst [5,6]. De novo design has shown impressive improvements over the last two decades in the development of energy functions for directing the design of proteins [7–9]. However, the subtle changes that confer the necessary dynamics for catalysis have not yet been determined [10,11]. Last year, an enormous breakthrough was made in the implementation of artificial intelligence tools that predict the 3D structure of proteins. Alpha-Fold surpassed the performance obtained so far by any other structure prediction method in the CASP protein modeling competition using this approach. This year, the modeling of protein structures from humans and 20 other genomes through the use of artificial intelligence is in progress using one of the most powerful supercomputers [12,13].

The above-mentioned strategies have highlighted the importance of exploiting the structural and functional information accumulated through thousands of years of evolution. It is acknowledged that residues outside the catalytic site and their contacts can play essential roles in protein structure and function [14,15]. Exploration of these residues



Outline

Abstract

Keywords

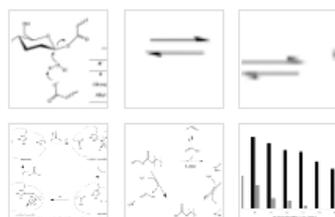
Acknowledgments

1. Introduction
2. Glycosyl hydrolases and/or glycosyl transferases
3. Lipases
4. Proteases
5. Factors affecting the enzymatic production of b...
6. Conclusions

References

[Show full outline](#)

Figures (15)


[Show 9 more figures](#)

Tables (6)

- Table 1
- Table 2
- Table 3
- Table 4
- Table 5
- Table 6

Chapter 12 - The use of biocatalysis for biosurfactant production

Gloria Saab-Rincon, [Alexey Llopiz](#), [Rodrigo Arreola-Barroso](#)

[Show more](#)

+ Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91697-4.00012-0>

[Get rights and content](#)

Abstract

Surfactants are widely used in manufacture to satisfy all kinds of human needs, from food, health, cosmetics, adhesives, etc. The large variety of natural surfactants made up of harmless compounds has inspired a wide variety of tailored biosurfactants using naturally occurring and fully biodegradable molecules. Their production by biological and eco-friendly processes has been the objective of numerous investigations aimed to replace chemical processes that are less amiable to the environment. Implementing highly regioselective biocatalysts allows the targeted production of the biosurfactants of interest and facilitates their purification.

This chapter summarizes the characteristics and limitations of hydrolytic enzymes such as lipases, proteases, and glycosyl hydrolases, which have been explored for the synthesis of biosurfactants, and illustrates the potentially enormous diversity that has yet to be unlocked to take advantage of these biological resources.

[Previous chapter in book](#)

[Next chapter in book](#)

Keywords

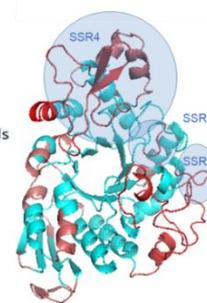
Biocatalyst; Biosurfactants; Lipases; Lipo-amino acid; Glycolipids; Proteases; Glycoside hydrolases; Regioselectivity; Enzyme immobilization; Reaction media

14. Anexos

Anexo 1

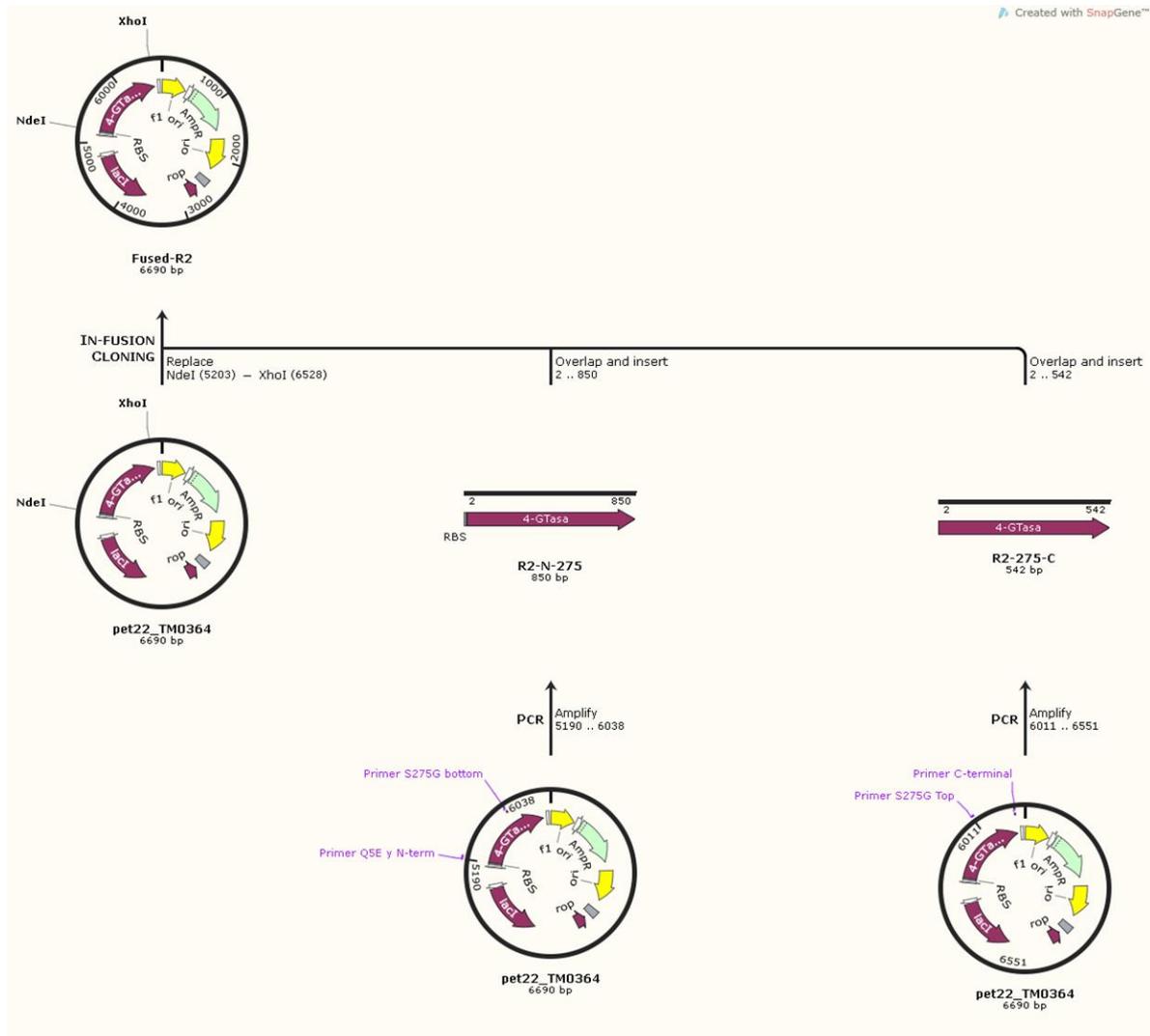
Regiones identificadas con el programa Zebra (Timonina et al., 2021) como responsables de la exclusividad funcional de la GTasa de *T. marítima*.

SSR Rank	# of subfamilies reference protein PDB)	# of outliers	S-score	Z-score	P-value	SSR boundaries
22 1	4	0	0.353	8.375	2.757666e-17	192-200
23 2	2	7	0.211	4.571	2.423449e-06	319-370
24 3	3	4	0.208	4.493	3.506163e-06	13-20
25 4	3	3	0.2	4.281	9.295433e-06	118-154
26 5	2	1	0.131	2.449	7.156718e-03	77-82
27 6	2	9	0.111	1.914	2.779902e-02	49-52
28 7	3	5	0.102	1.665	4.799998e-02	410-414
29 8	2	8	0.096	1.506	6.607951e-02	97-114
30 9	3	7	0.094	1.467	7.125484e-02	No amino acids
31 10	2	16	0.087	1.28	1.001911e-01	242-250
32 11	2	4	0.078	1.037	1.499797e-01	229-231
33 12	2	17	0.066	0.714	2.376042e-01	423-435
34 13	2	12	0.06	0.535	2.963367e-01	220-224
35 14	3	14	0.05	0.269	3.940123e-01	260-268
36 15	3	3	0.038	-0.04	5.160008e-01	391-391
37 16	2	15	0.024	-0.423	6.637672e-01	159-161
38 17	2	15	0.019	-0.537	7.044061e-01	387-387
39 18	2	19	0.019	-0.537	7.045311e-01	399-401
40 19	2	24	0.007	-0.877	8.098276e-01	11-11
41 20	2	13	0.003	-0.968	8.334876e-01	170-170



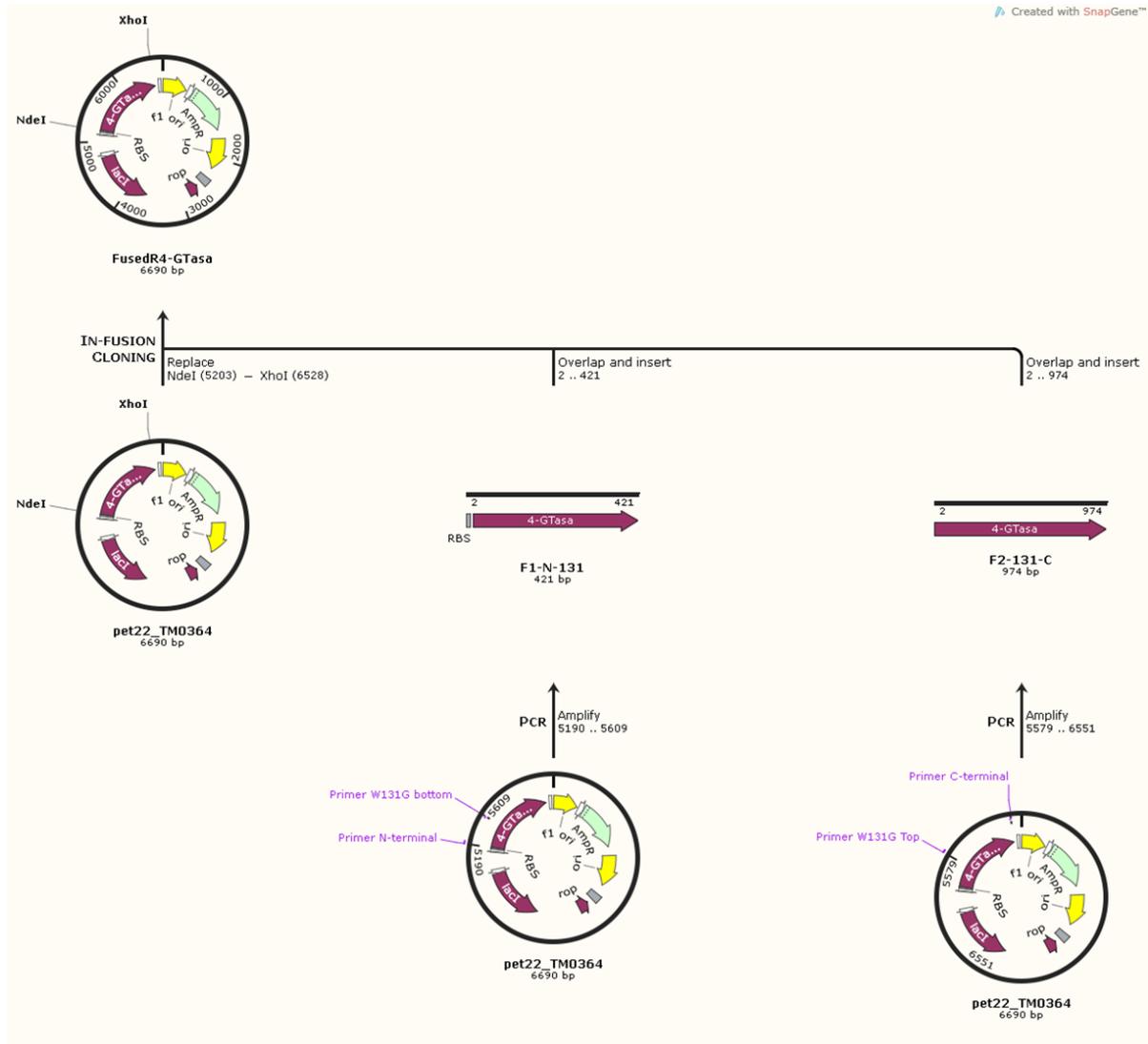
Anexo 2

Simulación de la construcción de las mutaciones en los residuos aminoacídicos 5 y 275 para la *TmGTasa*.



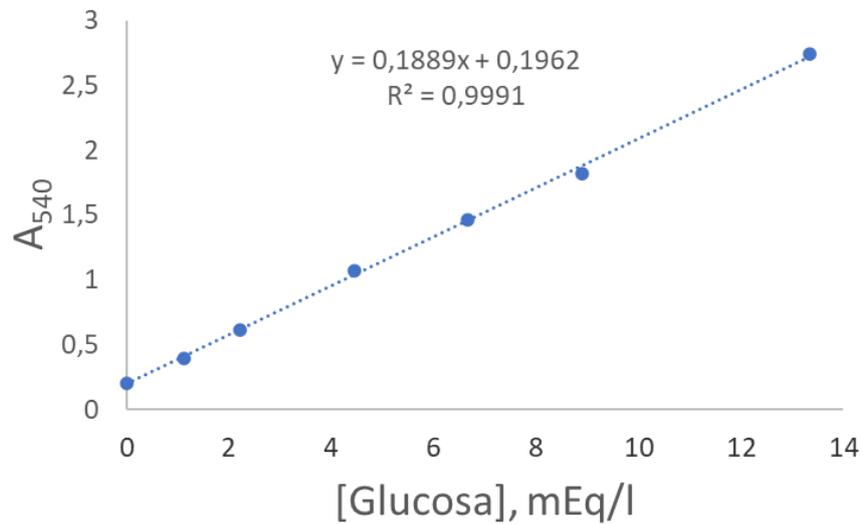
Anexo 3

Simulación de la construcción de las mutaciones en para la mutación W131G para la *Tm*GTasa.



Anexo 4

Curva estándar con glucosa para la determinación de azúcares reductores por el método del DNS (Miller, 1959).



Anexo 5

Curva estándar con almidón para la determinación del complejo que forma este polisacárido con el yodo yodurado (Hovenkamp-Hermelink et al., 1988).

