



FUNCIONES ADICIONALES DEL DOMINIO DE FIJACION AL ALMIDÓN DE LA α -AMILASA DE *Lactobacillus amylovorus*.

Susana González, Sergio Sánchez y Romina Rodríguez-Sanoja. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Apto. Postal 70228, 04510 México, DF, fax (5255)56223855, e-mail: romina@correo.biomedicas.unam.mx.

Palabras clave: α -amilasas, dominio de fijación al almidón, desestabilización.

Introducción. Las α -amilasas son proteínas con múltiples dominios, algunas de ellas además del dominio catalítico tienen un dominio conocido como de fijación al almidón (DFA). Muchos estudios han demostrado que el papel del DFA es aumentar la concentración efectiva de la enzima sobre el gránulo de almidón, facilitando la hidrólisis. Sin embargo, en otros sistemas semejantes como las celulasas se ha observado que el dominio de unión a la celulosa (DFC) puede, además de adsorber la enzima al sustrato, desestabilizar la estructura de las fibras del polímero e incrementar la actividad de la celulasa al hacer al sustrato más accesible para la enzima [1]. Un efecto similar fue descrito en el DFA de la glucoamilasa de *Aspegillus niger* sobre el gránulo del almidón [2]. Sin embargo no es un fenómeno generalizado puesto que se ha observado que el DFA la β -amilasa de *Bacillus cereus* no desestabiliza al gránulo. La α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* presenta un DFA con una estructura peculiar, pues esta formado por cinco unidades repetidas (UR) que son directas e idénticas, cada una constituida de un centenar de aminoácidos [3]. La función de adsorción al gránulo de almidón del DFA aislado del sitio catalítico y de cada una de las unidades que lo forman ha sido comprobada [4].

El objetivo de este trabajo es determinar si el DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* puede, además de adsorberse al gránulo, desestabilizar su estructura. El primer acercamiento al objetivo es ver como afecta a la hidrólisis la adición *in trans* del DFA completo.

Metodología. El fragmento del gen que codifica para el DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* fue fusionado a un tallo de histidinas y expresado en *E. coli*, posteriormente fue purificado por afinidad en columnas níqueladas. Por otro lado la α -amilasa de *L. amylovorus* fue purificada también por cromatografía de afinidad pero sobre β -ciclodextrina. Se realizaron ensayos de hidrólisis sobre almidón de maíz con la amilasa pura añadiendo diferentes concentraciones del DFA. La actividad amilolítica se determinó por la liberación de azúcares reductores que fueron cuantificados por el método de DNS.

Resultados y discusión. Los resultados obtenidos muestran que la adición del DFA, al menos a las concentraciones probadas, disminuye la liberación de azúcares reductores del almidón insoluble (fig. 1). Esto sugiere inhibición por competencia en la adsorción al sustrato, sin embargo hay que considerar que este fenómeno también se presenta en las

amilasas que desestabilizan el gránulo, por lo que, si bien es probable que el DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* no desestabilice la estructura del almidón, puede ser también que no se ha encontrado la concentración adecuada en la que se elimine la competencia.

Por otro lado, en los DFAs de las amilasas que desestabilizan al almidón se han encontrado dos sitios de unión al sustrato, la comparación de las secuencias sugiere que en el DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* sólo hay un sitio de unión y que el segundo se encuentra incompleto. Estudios estructurales nos permitirán definir el número de sitios de unión.

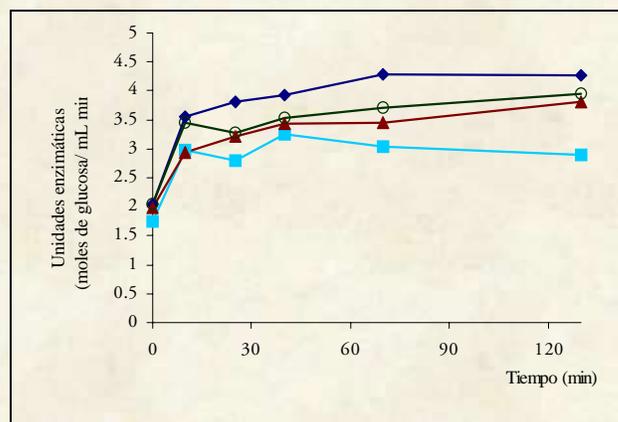


Fig. 1. Cinética de la α -amilasa con diferentes relaciones molares de DFA : (U) amilasa (■)1:1,(▲)5:1,(○)10:1.

Conclusiones. El dominio de fijación al almidón adicionado *in trans* compete con la α -amilasa de *L. amylovorus* por adsorberse al sustrato.

Agradecimiento. Gracias a CONACyT por el apoyo otorgado al proyecto J141222-Z y la beca recibida.

Bibliografía. 1. Din, N, Gilkes N, Tekant B, Miller R, Anthony R, Warren J, Kilburn D. 1991. *Biotechnology*. 9, 1096-1099. 2. Southall, S, Simpson, P, Gilbert, H, Williamson G, Williamson M. 1999. *FEBS letters* 447, 58-60. 3. Rodríguez R, Morlon J, Jore J, Pintado J, Juge N, Guyot J. 2000. *Appl Environ. Microbiol.* 66, 3350-3356. 4. Santiago M. 2004. Tesis de licenciatura, UNAM.