



## CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DEL DOMINIO DE FIJACION AL ALMIDÓN DE LA $\alpha$ -AMILASA DE *Lactobacillus amylovorus*

Daniel Guillén, Monserrat Santiago, Larissa Linares, Ricardo Pérez, Sergio Sánchez y Romina Rodríguez-Sanoja. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Apto. Postal 70228, México, D.F. e-mail: [romina@correo.biomedicas.unam.mx](mailto:romina@correo.biomedicas.unam.mx)

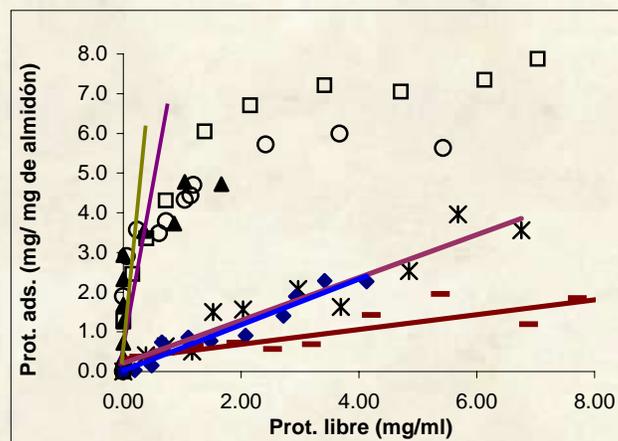
*Palabras clave:*  $\alpha$ -amilasa, dominio de fijación al almidón, adsorción al almidón insoluble.

**Introducción.** La  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* posee una estructura constituida por dos dominios funcionales: un dominio catalítico y un dominio carboxilo-terminal. El dominio catalítico es muy semejante al de las  $\alpha$ -amilasas de otras bacterias y contiene las regiones conservadas reportadas en todas las amilasas. El dominio carboxilo-terminal, que le confiere la capacidad de adsorberse e hidrolizar el almidón insoluble, es estructuralmente diferente al observado en otras amilasas, ya que se encuentra constituido por unidades repetidas (UR) directas e idénticas de 91 aminoácidos cada una. [1,2]. La forma como actúa este dominio de fijación al almidón (DFA) no se encuentra esclarecida, por lo que el objetivo de este trabajo es determinar si las URs, aisladas del sitio catalítico, son funcionalmente activas y si es así, determinar si actúan como unidad o constituyen módulos separados cuya función en la fijación pueda ser sumatoria.

**Metodología.** Los fragmentos del gen correspondientes a 1, 2, 3, 4 UR y el DFA completo fueron clonados en vectores de expresión de *E. coli* (pQE-QIAGEN, pBAD-Invitrogen). Las UR se obtuvieron por amplificación PCR, mientras que el fragmento correspondiente al DFA (5UR) se aisló del gen previamente clonado de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* (pLPCR2-3 [2]). Las proteínas expresadas fueron purificadas a partir de lisados de *E. coli* por cromatografía de afinidad en sefarsa niquelada. Simultáneamente se produjo y purificó la  $\alpha$ -amilasa entera por afinidad en  $\beta$ -ciclodextrina. Para realizar los ensayos de adsorción se añadieron concentraciones crecientes de las proteínas obtenidas a una suspensión de almidón de maíz insoluble, la concentración de proteína se determinó por absorbancia a 280nm [3].

**Resultados y discusión.** En los ensayos de adsorción se encontró que todos los péptidos producidos (1, 2, 3, 4 y el DFA) se adsorben al almidón insoluble y si una UR es capaz de adsorberse, entonces cada UR puede estar actuando como un dominio independiente de fijación a sustrato, situación nunca antes observada en amilasas. Al comparar las curvas de adsorción de las diferentes proteínas (Gráfica 1) se aprecia un aumento en la pendiente de unión de las proteínas conforme se incrementa el número de UR, lo que indica que la capacidad de fijación es proporcional al número de UR y que existe algún efecto de tipo sumatorio o sinérgico entre ellas. Sin embargo, se observa que la curva de adsorción de la  $\alpha$ -amilasa entera es muy similar a la curva de 2UR, estos resultados sugieren que la amilasa no utiliza todas sus UR para fijarse a su sustrato, sino que solo usa 2 de las 5 presentes; es posible que el resto de las UR desarrollen una

función de espaciadores, ayudando a posicionar en el espacio al DFA.



Gráfica 1: Curvas de adsorción al almidón de maíz insoluble correspondientes a: 1UR ( $\nabla$ ), 2UR ( $\blacklozenge$ ), 3UR ( $\square$ ), 4UR ( $\circ$ ) el DFA completo ( $\blacktriangle$ ) y la amilasa completa ( $*$ ).

**Conclusiones.** Por los resultados obtenidos en este trabajo se propone que cada UR de la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* esta actuando como un módulo independiente de adsorción y que la presencia de múltiples unidades optimiza la adsorción al sustrato insoluble, probablemente a través de un efecto de tipo sumatorio o sinérgico.

Este nuevo tipo de DFA puede tener un gran potencial de aplicación en el campo de la biotecnología en la elaboración de vectores de expresión para la purificación de proteínas recombinantes, así como en la industria de la transformación del almidón.

**Agradecimiento.** Este trabajo fue financiado por el CONACYT proyecto J41222-Z.

**Bibliografía.** 1. Giraud, E. and Cuny, G. (1997). Molecular characterization of the  $\alpha$ -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggests a common evolutionary origin. *Gene* 198:149-157.  
2. Rodríguez-Sanoja, R., Morlon-Guyot, J., Jore, J., Pintado, J. N. Juge and Guyot, J. P. (2000). Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3350-3356.  
3. Williamson, G, N. J. Belshaw, and Williamson, M. 1992. O-Glycosylation in *Aspergillus* glucoamylase. *Biochem. J.* 282:423-428