



## PROPUESTA DEL USO DE $\alpha$ -AMILASA DE *Thermotoga maritima* PARA LA PRODUCCIÓN DE ALQUIL GLUCOSIDOS.

Juanita Yazmín Damián Almazo, Agustín López-Murguía, Xavier Soberón y Gloria Saab Rincón  
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.  
Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210 MEXICO  
Fax: (777)317-23-88. E-mail: jyazmin@ibt.unam.mx.

*Palabras clave:*  $\alpha$  amilasa, residuos catalíticos, mutagénesis.

**Introducción.** Las glicosidasas (EC 3.2.1) son enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico en polisacáridos. Si durante la hidrólisis del enlace glicosídico hay retención de la configuración del carbono anomérico, la enzima, mediante una reacción de doble desplazamiento es capaz de sintetizar glucósidos o alquil glucósidos, dependiendo si la molécula aceptora en el segundo paso de la reacción es un sacárido o un alcohol (1).

La síntesis enzimática de alquil glucósidos, surfactantes no iónicos empleados principalmente en la producción de jabones y detergentes, es un proceso atractivo para la industria pero requiere de una enzima capaz de transferir sacáridos a un alcohol. La  $\alpha$ -amilasa de la bacteria hipertermófila *Thermotoga maritima* posee una importante actividad transglicosídica (2) y puede efectuar reacciones de alcoholólisis con baja eficiencia (comunicación personal Alina Moreno), además al ser una enzima termoestable es capaz de llevar a cabo catálisis a temperaturas elevadas, lo que hace posible emplear un sustrato tan abundante y económico como almidón para generar sacáridos. Aunque podría optimizarse la capacidad de alcoholólisis que presenta la enzima mediante técnicas de evolución dirigida, la selección de variantes con aumento en su actividad transglicosídica es difícil. Un método para seleccionarlas es empleando glicosidasas mutadas en el residuo que funge como nucleófilo (3) con el fin de evitar la hidrólisis del producto formado y monitorear la reacción de transglicosidación mediante la liberación de una molécula colorida durante la formación del enlace glicosídico.

Debido a que la  $\alpha$ -amilasa de *Thermotoga maritima* es una enzima que aun no ha sido caracterizada y cuya estructura se desconoce, en este trabajo pretendemos identificar los residuos catalíticos que fungen como ácido-base y nucleófilo en la enzima como un primer paso para el diseño de una estrategia que nos permita detectar mutantes con una actividad transglicosídica incrementada.

**Metodología.** La localización de los residuos catalíticos que fungen como ácido-base y nucleófilo en la  $\alpha$ -amilasa de *Thermotoga maritima* se realizó detectando los residuos conservados en  $\alpha$ -amilasas de diferentes orígenes mediante alineamientos múltiples de secuencias. Una vez identificados, se reemplazaron de forma independiente por glicina mediante mutagénesis sitio dirigida con el fin de hacer a la enzima hidrolíticamente inactiva. La pérdida de actividad se comprobó midiendo la cantidad de azúcares reductores formados con DNS por la enzima silvestre y las mutantes después de incubarlas con almidón como sustrato a

85 °C. El perfil de productos generados se determinaron mediante cromatografía en capa fina (TLC).

**Resultados y discusión.** A pesar de que la  $\alpha$ -amilasa de *T. maritima* tiene muy poca similitud con otras  $\alpha$ -amilasas (menos del 35%) (2) las regiones en que se encuentran los residuos catalíticos (asas 4 y 5 del barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>), son muy conservadas en estas enzimas, lo que permitió asignar al ácido aspártico 218 y al ácido glutámico 258 en la enzima de *T. maritima* como los residuos catalíticos. Después de mutagenizar estas posiciones y realizar los ensayos de actividad, ambas mutantes resultaron ser inactivas en presencia de almidón. Estos resultados confirman que los residuos mutando están directamente involucrados en la hidrólisis del enlace glicosídico del sustrato. En contraste la enzima silvestre presenta un comportamiento tipo Michaelis Menten, presentando una  $k_{cat} = 1705 \text{ min}^{-1}$ .

**Conclusiones.** Detectamos dos de los tres residuos catalíticos de la  $\alpha$ -amilasa de la bacteria hipertermófila *Thermotoga maritima*, el aspártico 218 y el glutámico 258, los cuales, al ser mutados generan una enzima hidrolíticamente inactiva. A partir de estas construcciones podemos probar la reacción de transferencia con sustratos activados (fluorados), mediante la medición de la liberación de fluoruro. La generación de bibliotecas de esta enzima serán probadas utilizando alcoholes como grupos aceptores. Se seleccionarán aquellas mutantes que liberen mas fluoruro en presencia de alcoholes (es decir, aquellas que presenten mayor actividad de alcoholólisis).

**Agradecimiento.** Apoyo financiero PAPIIT IN214803 to GSR.

### Bibliografía.

1. Ismail A, Soutani S, y Ghoul M. (1999). Enzymatic-catalyzed synthesis of alkylglycosides in monophasic and biphasic systems: I. The transglycosylation reaction. *J. of Biotech.* 69:135-143.
2. Liebl, W, Semplinger I, Ruile O. (1997). Properties and Gene Structure of the *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -amylase AmyA, a Putative Lipoprotein of a Hiperthermophilic Bacterium. *J. Bacteriol.* 179 (3): 941-948.
3. Mayer C, Jakeman, Mah M, Karjala, Gal L, Warren R, Whitters S. (2001). Directed evolution of new glycosynthases from *Agrobacterium*  $\beta$ -glucosidase: a general screen to detect enzymes for oligosaccharide synthesis. *Chemistry and Biology* 8: 437-44