



MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA DEL DOMINIO DE FIJACIÓN AL ALMIDÓN DE LA α -AMILASA DE *Lactobacillus amylovorus*

Norma Oviedo, Laura Escalante, Daniel Guillén, 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

Palabras clave: dominio de fijación al almidón, adsorción al almidón.

Introducción. El dominio C-terminal de la α -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* le confiere a la enzima la capacidad de adsorberse e hidrolizar el almidón insoluble [1]. Este dominio es estructuralmente diferente al observado en otras amilasas, ya que se encuentra constituido por 5 módulos idénticos de 91 aminoácidos cada uno. En un trabajo reciente se demostró que cada módulo corresponde a un Dominio de Fijación al Almidón (DFA), dado que cada uno es capaz de adsorberse al almidón de manera independiente [2]. La comparación de la secuencia de un módulo con otros DFAs mostró conservados varios residuos que habían sido reportados como importantes para la interacción proteína-carbohidrato [3]. En el DFA de la amilasa de *Bacillus halodurans* dicha interacción está dada por 3 aminoácidos aromáticos W36, Y23 y Y25 [4].

Con el objetivo de identificar los residuos esenciales para la adsorción de la α -amilasa de *L. amylovorus* al almidón se reemplazaron por mutagénesis dirigida los aminoácidos aromáticos altamente conservados (W11, W32, Y16, Y18, Y20 y Y85), además de un residuo no aromático pero si altamente conservado de prolina (P33).

Metodología. Uno de los módulos presentes en el DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* fue clonado en el vector de expresión pQE31 (QIAGEN). Los residuos asociados a la unión al almidón fueron mutagenizados con el sistema Quick Change Mutagenesis Kit (Stratagene). Todas las mutaciones fueron verificadas por secuenciación (Laragen Inc.). Las proteínas obtenidas fueron expresadas en *E. coli* XL10-Gold y purificadas a partir de lisados por cromatografía de afinidad en sefarosa niquelada. La pureza de las proteínas fue verificada en SDS-PAGE 10%. La capacidad de adsorción del DFA original y las proteínas mutadas fue analizada en geles de afinidad de poliacrilamida (5%) copolimerizada con almidón, amilasa o amilopectina.

Resultados y discusión. La figura 1 muestra el efecto de las mutaciones sobre la afinidad de las proteínas por el almidón. En ella se puede observar como la mutación del W32 (carril 4) inhibe la interacción proteína-carbohidrato, evitando la retención de la proteína en el gel. Lo mismo puede observarse con la doble mutante W11-32-L (carril 5); sin embargo, la mutación en W11 no tiene ningún efecto en la adsorción, la proteína continúa siendo retenida como el tipo silvestre. Parece claro que W32 gobierna la interacción con el azúcar no obstante se puede observar que dos residuos de tirosina Y18 y Y20 interaccionan también con el sustrato aunque su mutación no inhibe de manera absoluta la retención de la

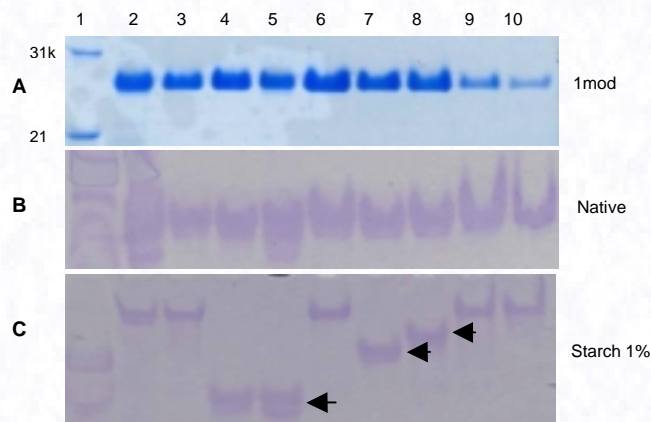


Fig. 1 Análisis electroforético de las proteínas purificadas: (A) SDS-PAGE, (B) gel nativo y (C) en gel nativo con almidón 1%. Carriles: 1, Marcador de peso molecular; 2; DFA silvestre (1 módulo); 3, W11L; 4, W32L; 5, W11-32-L; 6, Y16L; 7, Y18L; 8, Y20L; 9, Y85L y 10, P33L.

proteína. Los mismos resultados fueron observados cuando se utilizó amilopectina y amilosa como sustratos.

Conclusiones. Los resultados obtenidos sugieren que sólo uno de los triptófanos es esencial para la unión al almidón y que probablemente cada módulo contenga sólo un sitio de unión. Es muy probable que, a pesar de su escasa similitud, el DFA de la α -amilasa de *L. amylovorus* interaccione con el almidón de una manera semejante a la propuesta para el DFA de la amilasa de *B. halodurans* [4].

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

Bibliografía.

- Rodríguez-Sanoja, R, Morlon, J, Pintado, J, Juge, N and Guyot, JP (2000). Comparative characterization of complete and truncated forms of *L. amylovorus* alpha-amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3350-3356.
- Guillén, D, Santiago, M, Linares, L, Pérez, R, Ruiz, B, Sánchez, S and Rodríguez-Sanoja, R. (2007) Submit.
- Rodríguez-Sanoja, R., Oviedo, N. and Sánchez S. 2005. Microbial starch binding domain. *Curr. Op. Microbiol.* 8:260-267.
- Santiago, M, Linares, L, Sanchez, S and Rodriguez-Sanoja, R. (2005) Functional characteristics of the starch-binding domain of α -amylase. *Biología*, 60/Suppl.16:111-114.
- Boraston, A, Healey, M, Klassen, J, Ficko, B, Lammerts, A and Law, V (2006) A structural and functional analysis of α -glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate binding modules reveals a conserved mode of starch recognition. *J. Biol. Chem* 396:469-477.