



INGENIERÍA DE PROTEÍNAS EN α -AMILASAS COMO BIOCATALIZADORES EN LA PRODUCCIÓN DE ALQUIL-GLUCÓSIDOS

Juanita Yazmín Damián Almazo, Ane Lore Chauvin, Alina Moreno, Manuel H. Rivera, Fernando González Muñoz, Agustín López-Munguía, Xavier Soberón, Gloria Saab Rincón.

Departamento de Ingeniería Celular y Biotecología. Instituto de Biotecnología, UNAM. Apartado Postal 510-3. Cuernavaca, Morelos 62260. FAX: (777)317 2388. Correo electrónico (gsaab@ibt.unam.mx)

Palabras clave: α -amilasas, alquil-glicósidos, ingeniería de proteínas.

Introducción. Las alfa-amilasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces α -1,4 en almidón. Sin embargo, algunas de ellas tienen la capacidad de realizar reacciones alternas como son la transglicosidación y la alcoholólisis, en cuyos casos el glicósido unido a la enzima es transferido a un aceptor de naturaleza glicosídica en el primer caso, o a un alcohol, en el segundo caso. Nuestro interés se centra en las reacciones de alcoholólisis que generan alquil-glicósidos como producto, ya que estos son utilizados como tenso activos en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética, y tienen un alto valor agregado. El desarrollo de biocatalizadores para la producción de este tipo de compuestos resulta muy atractivo para sustituir la síntesis química de estos compuestos que requiere de varios pasos de protección y desprotección de los diversos grupos hidroxilo en las moléculas de sacárido bajo condiciones extremas de pH, que resultan muy laboriosas, costosas y de bajo rendimiento. El presente trabajo tiene por objetivo la generación de variantes de alfa amilasas mediante mutagénesis sitio-dirigida enfocadas a incrementar el rendimiento de alcoholólisis catalizada por esta enzima.

Metodología. La evolución dirigida es una herramienta poderosa en ingeniería de proteínas, sin embargo, la necesidad de métodos de selección para funciones que normalmente no son indispensables y posiblemente ni siquiera requeridas en sistemas biológicos, limitan su aplicación. El desarrollo de métodos de detección cuantitativa de la actividad enzimática deseada en un formato de alta eficiencia, permite el análisis de un gran número de variantes. No obstante, aun con el desarrollo de estos métodos de alta eficiencia, el análisis se limita a unos cuantos miles de variantes, que es una muestra ínfima de las variantes que se pueden generar por métodos de mutagénesis aleatoria. Es entonces indispensable, dirigir la mutagénesis hacia residuos que presumiblemente estén involucrados con el mecanismo de la reacción. La identificación de residuos a mutagenizar se basó en el modelamiento del sitio activo, así como en la identificación de patrones de estos residuos en enzimas homólogas con alta actividad transglicosídica. Las mutantes generadas se caracterizaron en cuanto a sus parámetros catalíticos para la degradación de almidón, termoestabilidad, y rendimiento de producción de alquil-glicósidos.

Resultados y discusión. El trabajo realizado en nuestro grupo de trabajo ha englobado la exploración de diversas amilasas como biocatalizadores en la producción de alquil-glicósidos a partir de almidón. La comparación de patrones de secuencias entre amilasas con y sin actividad transglicosídica nos ha permitido identificar residuos que son importantes en esta actividad y a través de mutagénesis sitio-dirigida hemos podido introducir actividad transglicosídica y alcoholólica en amilasas que no presentaban estas actividades [1], así como aumentarla en enzimas que ya las presentaban [2, 3].

*Incremento de las reacciones de alcoholólisis en mutantes de α -amilasa de *Thermotoga maritima*.*

Enzima	Alcoholólisis/hidrólisis	Eficiencia de Alcoholólisis (%)
WT	0.94	48
H222D	0.88	46
H222E	1.74	63
H222Q	2.49	71

Conclusiones. En el presente trabajo se plantean algunas de las estrategias utilizadas para la generación de variantes y el resultado de los esfuerzos más recientes para la optimización en la producción de la amilasa que presenta el rendimiento más alto en alcoholólisis reportado hasta la fecha. Hemos podido identificar algunas de las determinantes estructurales en la relación hidrólisis-alcoholólisis en alfa-amilasas.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT IN214803-3 otorgado a GSR.

Bibliografía.

1. Saab-Rincon, G., et al. (1999), Introducing transglycosylation activity in a liquefying alpha-amylase. *FEBS Lett.*, 453(1-2):100-6.
2. Rivera, M.H., et al., (2003), Alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* mutants near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. *Protein Eng.*, 16(7):505-14.
3. Damián-Almazo, J.Y., et al., Enhanced the alcohololytic activity of α -amylase AmyA from *Thermotoga maritima* MSB8 (DSM 3109) by site directed mutagenesis. (manuscript in preparation).