

REACCIONES DE ALCOHÓLISIS CON ALFA-AMILASAS SACARIFICANTES

Alina Moreno Menéndez, Gloria Saab-Rincón, Agustín López-Munguía

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM

Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, c.p. 62210, Cuernavaca, Morelos. Fax: (52-777) 11 49 03

e-mail: alina@ibt.unam.mx

Palabras clave: α -amilasa, transglicosilación, alcoholólisis, alquil-glicósidos.

Introducción. Las α -amilasas son enzimas que hidrolizan enlaces internos $\alpha(1-4)$ en polímeros de glucosa (1) y se clasifican como sacarificantes y licuefactantes en función del poder reductor que generan, produciendo, para una misma conversión, las sacarificantes, aproximadamente el doble de poder reductor que las licuefactantes. Además de la reacción de hidrólisis, las α -amilasas, en especial las sacarificantes son capaces de llevar a cabo reacciones de transferencia de residuos glicosilo a aceptores distintos al agua como alcoholes de bajo peso molecular (2), generando alquil-glicósidos, moléculas con capacidad surfactante y con potencial aplicación en diversos procesos industriales. Así, el presente proyecto estudia el potencial de las α -amilasas sacarificantes para llevar a cabo reacciones de alcoholólisis, tanto con almidón, como con maltodextrinas como donadores de residuos glicosilo.

Metodología. Las reacciones de hidrólisis y alcoholólisis con la α -amilasa de *A. niger*, se llevaron a cabo en 10 ml una solución con 1.2% de almidón o 15% de maltodextrinas Las concentraciones de CH₃OH para las reacciones de alcoholólisis, variaron de 1 a 40%. Los productos de reacción fueron analizados por CCF (fase móvil butanol:etanol:agua 3:5:2v/v) y HPLC (columna aminada, fase móvil: acetnitrilo:agua 70:30 v/v). La actividad de la enzima se determinó siguiendo la liberación de poder reductor por el método de DNS. El gen de la α -amilasa de *T. marítima* se amplificó por PCR del DNA cromosomal y se clonó en el vector pET 3 a Los pasos de purificación de la enzima fueron los siguientes: sonicación, tratamiento térmico (70°C/30 min), diálisis (<30Kda) en TRIS-HCl 5 mM, 1mM NaCl y 1mM CaCl₂, precipitación con 75% de (NH₄)₂SO₄ y cromatografía de filtración en gel (columna de Superosa).

Resultados y Discusión. Las α -amilasas sacarificantes, como la de *A. niger*, son capaces de llevar a cabo reacciones de alcoholólisis a partir de almidón o maltodextrinas y metanol como compuesto aceptor de residuos glicosilo (Fig.1). Sin embargo, dentro de los problemas que suponen estas reacciones, se encuentran, con almidón por un lado, la necesidad de gelatinizarlo a altas temperaturas y la alta viscosidad que genera mientras que, con maltodextrinas por otro lado, la ausencia del efecto protector que el almidón ejerce sobre la enzima, lo que resulta en bajos rendimientos de alquil-glicósidos. Por esta razón resulta atractiva la posibilidad de evaluar el potencial de una α -amilasa termofílica para llevar a cabo reacciones de alcoholólisis debido a que se sabe que la termofiliidad en las enzimas se encuentra relacionada con resistencia a otras condiciones

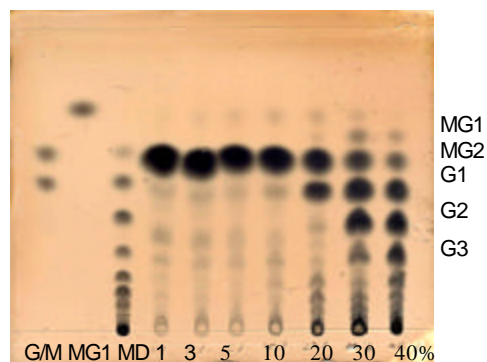


Fig.1 CCF de las reacciones de alcoholólisis con maltodextrinas: 15%, metanol: 1-40%, α -amilasa de *A. Níger*: 9 mg de prot/ml. MG1: metil-glucósido, MG2: metil-maltósido, G1: glucosa, G2: maltosa, G3: maltotriosa.

del medio de reacción. La α -amilasa de la eubacteria hipertermófila *T. marítima* es una enzima sacarificante de 64.5 Kda con una temperatura óptima de 80°C, un pH óptimo de 7 (3) y con potencial aplicación en reacciones de alcoholólisis. En el presente trabajo, se ha logrado la expresión heteróloga de la enzima así como su purificación. La enzima pura resultó tener una actividad específica de 17.89 μ mol de eq. de glucosa/ min mg prot. Se comprobó que esta enzima es sacarificante, ya que de una hidrólisis exhaustiva de almidón 1.2% a 80°C, generó como productos principales glucosa y maltosa.

Conclusiones. La α -amilasa de *A. niger* es capaz de llevar a cabo reacciones de alcoholólisis a partir de almidón y metanol como compuesto aceptor de residuos glicosilo, sin embargo, la reacción con maltodextrinas genera rendimientos muy bajos. La α -amilasa de *T. marítima* podría resultar atractiva para la producción de alquil-glicósidos a partir de almidón y maltodextrinas por su termofiliidad y capacidad sacarificante.

Bibliografía.

- Whiters, S. (2001). Mechanisms of Glycosyltransferases and Hydrolases. *Carb. Polymers*, 44: 325-337.
- Saab-Rincón, G, Del Río, G, Santamaría, R, López-Munguía, A, Soberón, X. (1999). Introducing Transglycosylation Activity in a Liquefying α -Amylase.
- Liebl, W, Stemplinger, I, Ruile, P. (1997). Properties and Gene Structure of the *Thermotoga marítima* α -Amylase AmyA, Putative Lipoprotein of a Hyperthermophilic Bacterium. *J. Bacteriol.* 179(3): 941-948.