

# ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS REGIONES RICAS EN SERINA Y TREONINA DEL DOMINIO DE FIJACIÓN AL ALMIDÓN DE LAS $\alpha$ -AMILASAS DE LACTOBACILOS.

Romina Rodríguez-Sanoja, Beatriz Ruiz, Sergio Sánchez.

Depto. Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., A.P. 70228 Cd. Universitaria C.P.04510 México, D.F. Tel. 5622-3867. Fax 5622-3855

[romina@correo.biomedicas.unam.mx](mailto:romina@correo.biomedicas.unam.mx)

*Bacterias lácticas amilolíticas, dominio de fijación al almidón, alfa-amilasas*

**Introducción.** Recientemente se describió una nueva estructura que permite la fijación al gránulo de almidón en tres  $\alpha$ -amilasas del género *Lactobacillus* (*L. amylovorus*, *L. plantarum* y *L. manihotivorans*) (1). La secuencia de este dominio de fijación al almidón (DFA) revela que estas enzimas tienen una estructura diferente a la del resto de las amilasas. Normalmente, el DFA está constituido por una centena de aminoácidos, que forman una estructura en barril  $\alpha$ -distorsionado. Sin embargo, el DFA de las  $\alpha$ -amilasas mencionadas está formado por casi 500 aminoácidos organizados en unidades repetidas (UR).

Los genes de dichas amilasas comparten más del 98% de identidad, siendo su principal diferencia la presencia de regiones ricas en serina y treonina que flanquean a las UR en *L. manihotivorans* y *L. plantarum*, pero no en *L. amylovorus* (2). Estas regiones presentan gran similitud con el dominio Gp-I de la glucoamilasa I de *Aspergillus awamori* var. *kawachi*, que tiene como característica distintiva ser una región rica en serina y treonina y por función promover la hidrólisis del almidón insoluble (3).

Con el objetivo de conocer la importancia de las regiones ricas en Ser y Thr, se compararon las características cinéticas y de adsorción de las  $\alpha$ -amilasas de *L. plantarum* y *L. amylovorus*.

**Metodología.** Las cepas de lactobacilos fueron cultivadas en medio MRS-almidón, cosechados en la fase logarítmica tardía y las  $\alpha$ -amilasas purificadas del sobrenadante por cromatografía de afinidad en sefarsa- $\alpha$ -ciclodextrina.

Todos los estudios de actividad, se realizaron con una concentración normalizada de las proteínas puras y bajo condiciones de pH y temperatura óptimas. La actividad amilolítica y la capacidad de adsorción al almidón crudo fue determinada según se describe en (1).

**Resultados y discusión.** Se observó que la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* genera 10 veces más extremos reductores que la de *L. plantarum* sin importar si el sustrato está gelatinizado o no. En el cuadro 1 se muestran los datos de las constantes cinéticas y de adsorción de ambas enzimas.

En la  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* (1) estudios preliminares habían mostrado que las secuencias repetidas encontradas en el extremo carboxilo terminal de la proteína eran responsables de la adsorción al almidón insoluble. Nuestros resultados sugieren que se requiere un paso de adsorción, ya que no se encuentra hidrólisis del almidón insoluble en etapas tempranas de la reacción. Sin embargo, cuando las enzimas actúan sobre almidón soluble, la reacción puede

describirse como una cinética convencional de Michaelis-Menten, es decir, la velocidad es proporcional a la concentración de sustrato en las etapas iniciales.

Cuadro 1. Características cinéticas y de adsorción de dos  $\alpha$ -amilasas de lactobacilos.

Cepa	$K_M$ (g/L)	$V_{max}$ ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mmol}$ proteína pura $^{-1}$ )	$K_{ad}$ ( $\text{mL} \cdot \text{mg}$ almidón $^{-1}$ )
<i>L. amylovorus</i>	1.973	2.97	0.87
<i>L. plantarum</i>	1.922	0.39	1.22

Las secuencias de las  $\alpha$ -amilasas de lactobacilos conocidas presentan importantes similitudes con la  $\alpha$ -amilasa de *B. subtilis* a nivel del dominio catalítico, sin embargo, a nivel del dominio de fijación al sustrato encontramos una estructura nueva que se repite en al menos 3 especies del género. Resulta muy interesante que las pequeñas diferencias encontradas en dos de estas enzimas cambien tan dramáticamente sus propiedades catalíticas y de adsorción. Los resultados sugieren que las regiones ricas en Ser y Thr encontradas entre las secuencias repetidas aumentan la capacidad de las enzimas de adsorberse al sustrato, disminuyendo la velocidad máxima de la reacción, lo que explicaría la mayor eficiencia hidrolítica de la  $\alpha$ -amilasa sin las secuencias intermedias (*L. amylovorus*).

**Conclusiones.** La presencia de las regiones ricas en Ser y Thr intermedias a las UR que presenta la  $\alpha$ -amilasa de *L. plantarum*, parece suficiente para diferenciarla catalíticamente de la enzima de *L. amylovorus*, con la que comparte un 98% de identidad. Probablemente, estas secuencias intermedias actúen aumentando la unión de la enzima al almidón, disminuyendo su eficiencia de hidrólisis.

## Bibliografía

- Rodríguez-Sanoja, R., Morlon, G. J., Jore, J., Pintado, J., Juge, N. & 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.
- Morlon, G. J., Mucciolo, R. F. Rodríguez-Sanoja, R., & Guyot, J. P. 2001. Characterization of the *L. manihotivorans*  $\alpha$ -amylase gene. *DNA Seq.* 12: 27-37
- Semimaru, T., Goto, M., Furukawa, K. & Hayashida, S. 1995. Functional analysis of the threonine and serine rich Gp-I domain of glucoamylase I from *Aspergillus awamori* var. *kawachi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2885-2890.