

NUEVA ESTRUCTURA DE FIJACION AL ALMIDON EN LAS α -AMILASAS DEL GENERO *Lactobacillus*.

Rodríguez-Sanoja, R.*, Morlon-Guyot, J. y Guyot, J. P.

UR106: Nutrition, Alimentation, Sociétés. IRD-Montpellier. 911, Av. Agropolis B.P. 5045. 34032 Montpellier, Francia. *Dirección actual: Depto. de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Cd. Universitaria, México D.F., Apt. 70228, C.P. 04510, Fax 56223855. E-mail: romina_rs@yahoo.com.

Palabras clave: α -amilasas, dominio de fijación al almidón, secuencias repetidas

Introducción. La α -amilasa (α -1,4 glucan-4-glucanohidrolasa EC 3.2.1.1) hidroliza al azar los enlaces α -1,4 al interior de polisacáridos y oligosacáridos como el almidón, el glucógeno y azúcares semejantes. Un cierto número de bacterias lácticas son capaces de producir esta enzima, entre ellas los genes de las α -amilasas de *Lactobacillus plantarum* A6, *Lb. amylovorus* (1) y *Lb. manihotivorans* (2) han sido secuenciados. Estos genes, que codifican para proteínas de alrededor de 900 aminoácidos, poseen 98% de similitud y un nivel similar de identidad en la secuencia deducida de aminoácidos. Se encontró que los primeros 410 aminoácidos de la α -amilasa de *Lb. amylovorus* eran suficientes para transferir la actividad amilolítica a una cepa no-amilolítica de *Lb. plantarum* (3) lo que sugería que la mitad amino-terminal de estas enzimas contenía el sitio activo. La mitad correspondiente al extremo 3' de los tres genes muestra una estructura formada por 4 o 5 unidades idénticas de 273 nucleótidos, nunca observada con anterioridad en amilasas y cuya función no se conocía. Se había observado que los fragmentos derivados de una proteólisis limitada de la α -amilasa de *Lb. plantarum* A6, perdían la capacidad de hidrolizar el almidón insoluble (4). Así, en el presente trabajo se investigó el papel funcional que las secuencias repetidas de dichas α -amilasas tenían, con un especial énfasis en la fijación al almidón insoluble.

Metodología. Con el gen de α -amilasa de *Lb. amylovorus*, se realizaron dos construcciones, la primera contenía el gen entero de la amilasa (*AmyA*) y la segunda el gen desprovisto de la región carboxilo-terminal formada por las secuencias repetidas (*AmyAD*). Las dos construcciones fueron transferidas a una cepa no-amilolítica de *Lb. plantarum* y los productos de expresión fueron purificados, caracterizados y comparados, en especial sobre su capacidad para fijarse e hidrolizar el almidón insoluble.

Resultados. Las amilasas *AmyA* y *AmyAD* presentaron actividades similares sobre substratos solubles o parcialmente solubles como la amilosa, amilopectina, la α -ciclodextrina y el almidón soluble. Sin embargo, las constantes catalíticas muestran que *AmyA* es más eficaz que *AmyAD* para hidrolizar el almidón soluble. Así mismo, la eliminación de la mitad carboxilo-terminal disminuye la tolerancia de *AmyAD* a cambios en el pH y la temperatura. La remoción de las secuencias repetidas ocasionó la pérdida de la capacidad de la α -amilasa de *Lb. amylovorus* para

disminuye la tolerancia de *AmyAD* a cambios en el pH y la temperatura.

La remoción de las secuencias repetidas ocasionó la pérdida de la capacidad de la α -amilasa de *Lb. amylovorus* para unirse e hidrolizar el almidón insoluble (Fig. 1). Así, la capacidad de absorción y degradación del almidón insoluble depende de la existencia de dichas secuencias repetidas en el extremo carboxilo-terminal.

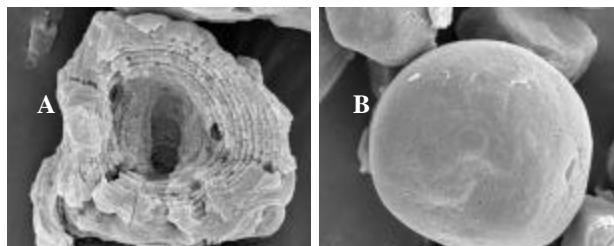


Fig. 1. Fotografías al microscopio electrónico de barrido que muestran el efecto sobre gránulos de almidón de maíz de: (A) la α -amilasa entera (*AmyA*) y (B) la α -amilasa truncada (*AmyAD*).

Conclusiones. Los estudios realizados sobre la estructura primaria (no mostrados), así como las propiedades observadas en estas amilasas llevan a concluir que fue descubierto un dominio funcional de fijación al almidón, constituido por unidades repetidas.

Agradecimientos. R. Rodríguez agradece a CEFI-SFERE-CONACyT el apoyo otorgado.

Bibliografía.

1. Giraud, E., & Cunny, G. (1997). Molecular characterization of the α -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct-tandem repeats and suggest a common evolutionary origin. *Gene* 198:149-157.
2. Morlon-Guyot, J., Mucciolo, R. F., Rodríguez-Sanoja, R. & Guyot, J. P. (2000). Characterization of the *L. Manihotivorans* α -amylase gene. *DNA Seq.* In Press.
3. Jore, J. P. M. & De Parasis, J. (1993). Studies on the amylase of *Lactobacillus amylovorus* as a model for heterologous protein secretion by lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:26.
4. Florencio, J. A. M., Eiras, S. D. R., Soccol, C. R., Raimbault, M., Guyot, J. P. & Fontana, J. D. (2000). *Lactobacillus plantarum* amylase acting on crude starch granules: native isoforms and activity changes after limited proteolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86:721-730.

unirse e hidrolizar el almidón insoluble. Así, la capacidad de