

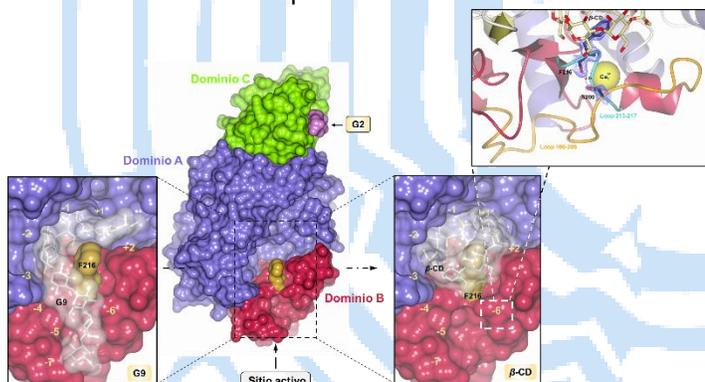
## EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MUTACIÓN S200G SOBRE LA ESPECIFICIDAD DE DESPROPORCIÓN/CICLACIÓN/HIDRÓLISIS PH-MODULABLE DE UNA CICLOGLUCANOTRANSFERASA TERMORRESISTENTE

Laura Espinosa-Barrera<sup>1</sup>, Beatriz Velazquez-Cruz<sup>1</sup>, Sara Centeno-Leija<sup>1,2\*</sup>, Hugo Serrano-Posada<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Sintética, Estructural y Molecular – LaBioSEM. <sup>2</sup>Investigadores por México - CONACyT, LaBioSEM, Universidad de Colima, Colima, Colima, México, C.P. 28629. [Aespinosa5@uacol.mx](mailto:Aespinosa5@uacol.mx)

*Palabras clave:* CGTasas, especificidad pH-modulable, Ingeniería de proteínas

**Introducción.** Las cicloglucanotransferasas (CGTasas) son enzimas que escinden los enlaces  $\alpha$ -1-4-glucosídicos del almidón para formar oligosacáridos lineales y ciclodextrinas ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs). En el sitio activo, comprendido por los dominios AB, se encuentran 9 subsitios (-7 al +2) involucrados en la catálisis. El mecanismo por el cual las CGTasas tienen la capacidad de ciclación está dada en los subsitios +2, -3 y -6 [1]. CldA es una CGTasa termorresistente de tres dominios ABC [2] con una alta competencia de desproporción/ciclación/hidrólisis pH-modulable. Su estructura cristalográfica (Fig. 1; [3]) mostró que en el subsitio -6 se genera un puente de hidrógeno de 2.6 Å entre Ser<sup>200</sup> y el aminoácido central Phe<sup>216</sup>, ausente en CGTasas con alta especificidad de ciclación.

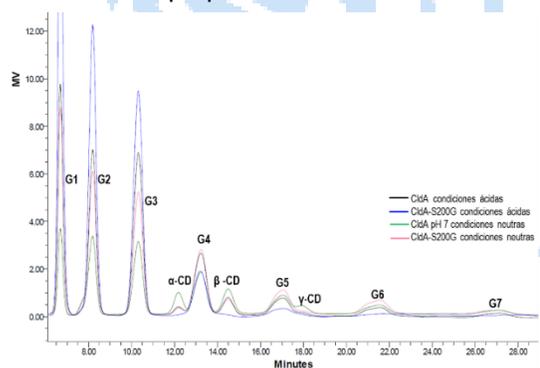


**Figura 1.** Estructura cristalográfica de CldA (Código PDB 6WNI; [3]). Note a Ser<sup>200</sup> interactuando con Phe<sup>216</sup> en el subsitio -6 del sitio activo.

Este trabajo evalúa el efecto de la mutación S200G sobre la especificidad pH-modulable de CldA.

**Metodología.** Producción de CldA y CldA<sub>S200G</sub> recombinantes: *E. coli* SHuffleT7::pET22b::CldA-S200G; medios: LB y YT2X; inducción: IPTG. Purificación: calentamiento térmico y cromatografía de afinidad a níquel. Actividad: método de DNS. Cuantificación de productos: HPLC. Las actividades de hidrólisis y ciclación se probaron en condiciones ácidas y neutras, en un intervalo de temperatura de 60-100 °C, con almidón soluble como sustrato.

**Resultados.** CldA<sub>S200G</sub> a pH 4.0 presentó una especificidad de desproporción/ciclación/hidrólisis de 9.54/0.03/90.41 comparada con 22.17/3.76/72.05 para la forma nativa. A pH 7.0, CldA<sub>S200G</sub> presentó una especificidad de desproporción/ciclación/hidrólisis de 28.72/3.17/68.10 comparada con 28.82/13.12/58.05 para la forma nativa (Fig. 2). Estos resultados indicaron que CldA<sub>S200G</sub> disminuyó 4.13 veces el rendimiento de CDs a pH 7.0 ( $\alpha$ - y  $\beta$ -CDs, pero no  $\gamma$ -CD), mientras que a pH 4.0 solo presentó productos de desproporción, 0.43 veces menor que CldA nativa. CldA<sub>S200G</sub> conservó su propiedad termoestable y conservó el tipo de productos de desproporción G3-G7 e hidrólisis G1-G2.



**Fig. 2.** Perfiles de productos sintetizados por CldA y CldA<sub>S200G</sub> a pH 4.0 y 7.0. G1: glucosa, G2: maltosa, G3: maltotriosa, G4: maltotetraosa, G5: maltopentosa, G6: maltohexosa, G7: maltoheptaosa.

**Conclusiones.** La especificidad pH-modulable observada previamente en CldA, no recae en el residuo S200. Sin embargo, este residuo es clave para conservar la especificidad de ciclación en CldA. CldA<sub>S200G</sub> resultó un biocatalizador termoestable atractivo para producir dextrinas lineales de alto valor agregado G3-G7 bajo condiciones ácidas.

**Agradecimientos.** LEB agradece al CONACyT por la beca posdoctoral No. 218862. SCL y HSP agradecen el apoyo de los proyectos CONACyT CB-2018-A1-S-18011, CF-2019-33-549477 e INFR-2021-17-316456.

**Bibliografía.** [1] Uitdehaag, J. C., *et al.*, (1999). *J. Biol. Chem.* 274. [2] Centeno-Leija, S., Espinosa-Barrera, *et al.* (2022) *Scientific Reports*. 12:730. [3] Espinosa-Barrera, L., Velazquez-Cruz, B. *et al.* (2023). Escritura terminada. Para Acta Cryst. D o JBC.