

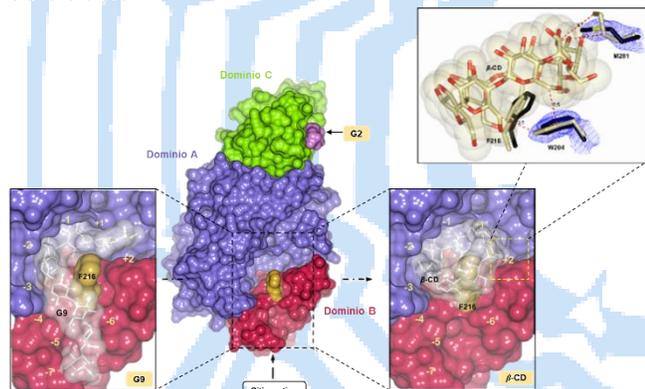
## INGENIERÍA DE DISEÑO RACIONAL DEL PERFIL DE ACTIVIDAD DE CICLACIÓN DE UNA CICLOGLUCANOTRANSFERASA TERMOACIDOFÍLICA

Beatriz Velazquez-Cruz<sup>1</sup>, Laura Espinosa-Barrera<sup>1</sup>, Hugo Serrano-Posada<sup>1,2\*</sup>, Sara Centeno-Leija<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, 28629.

\*Autores de correspondencia: [hserrano0@uclm.mx](mailto:hserrano0@uclm.mx), [sceneno0@uclm.mx](mailto:sceneno0@uclm.mx)

Palabras clave: almidón, CGTasas, ciclodextrinas

**Introducción.** Recientemente se caracterizó una nueva cicloglucanotransferasa (CGTasa) termoacidofílica, CldA, capaz de ciclar  $\alpha$ -(1,4)-glucopolisacáridos a partir de almidón (actividad de ciclación), para producir ciclodextrinas (CDs) funcionales. No obstante, CldA también hidroliza almidón, disminuyendo el rendimiento de CDs<sup>1,2,3</sup>. La estructura cristalográfica de CldA (**Fig. 1**) sugirió que la modesta actividad de ciclación está relacionada con la presencia del par hidrofóbico inusual Trp<sup>204</sup>/Met<sup>281</sup> en el subsitio +2 del sitio activo<sup>3</sup>, alejado del par clásico (Phe)/(Phe/Tyr), el cual es primordial para la actividad de ciclación<sup>4</sup>.

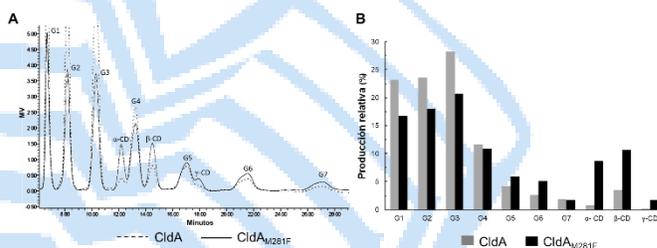


**Figura 1.** Estructura cristalográfica de CldA (Código PDB 6WNI; [3]). Note el par Trp<sup>204</sup>/Met<sup>281</sup> interactuando con  $\beta$ -CD en el subsitio +2 del sitio activo.

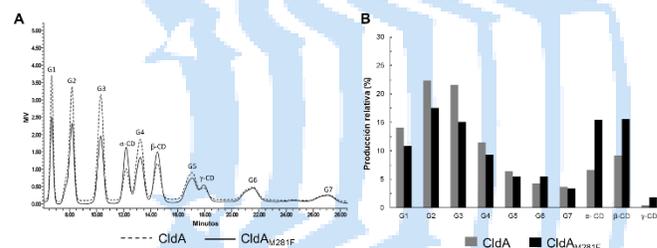
Este trabajo presenta la caracterización funcional comparativa entre la forma nativa de CldA y su forma mutante CldA<sub>M281F</sub>, con el objetivo de optimizar el perfil de actividad de ciclación.

**Metodología.** Purificación: cromatografía de afinidad a níquel (CldA y CldA<sub>M281F</sub> recombinantes). Análisis de productos (maltooligosacáridos y CDs): HPLC, con el Sistema Alliance® 2695 acoplado a un detector de índice de refracción (IR: 2414). Estándares: glucosa (G1), maltosa (G2), maltotriosa (G3), maltotetraosa (G4), maltopentosa (G5), maltohexosa (G6), maltoheptaosa (G7) y  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CDs.

## Resultados.



**Figura 2.** Productos sintetizados a pH 4.0. (A) Perfil de productos de CldA (línea punteada) y mutante (línea sólida). (B) Producción relativa de CldA (Barras en gris) y mutante (barras en negro).



**Figura 3.** Productos sintetizados a pH 7.0. (A) Perfil de productos de CldA (línea punteada) y mutante (línea sólida). (B) Producción relativa de CldA (Barras en gris) y mutante (barras en negro).

**Conclusiones.** Con relación a la forma nativa, CldA<sub>M281F</sub> incrementó 3.41 veces la actividad de ciclación a pH 4.0 y 1.76 veces a pH 7.0, confirmando el éxito del diseño racional para optimizar el perfil de actividad de ciclación.

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

## Bibliografía.

- [1] Velazquez-Cruz, B. (2021). Tesis maestría. Universidad de Colima, México. [2] Centeno-Leija, S., Espinosa-Barrera, L., Velazquez-Cruz, B. et al., (2022) *Sci. Rep.* 12:730. [3] Espinosa-Barrera, L., Velazquez-Cruz, B. et al., (2023). Escritura terminada. Para Acta Cryst. D o JBC. [4] Uitdehaag, J. C., Kalk, K. H., van Der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., & Dijkstra, B. W., (1999). *J. Biol. Chem.* 274(49):34868-34876.