

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**

**MODIFICACION QUÍMICA Y ESTABILIZACION DE**  
**GLICOSILTRANSFERASAS:**  
**CICLODEXTRIN GLICOSILTRANSFERASA Y**  
**DEXTRANSACARASA**

**MIGUEL ALCALDE GALEOTE**  
**MADRID, 1999**

**23241**

MIGUEL ALCALDE GALEOTE

**MODIFICACION QUIMICA Y ESTABILIZACION DE  
GLICOSILTRANSFERASAS:  
CICLODEXTRIN GLICOSILTRANSFERASA Y  
DEXTRANSACARASA**



MEMORIA  
Para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

DIRECTORES:  
ANTONIO BALLESTEROS OLMO Y FRANCISCO J. PLOU GASCA  
Instituto de Catálisis y Petroquímica  
C.S.I.C., Madrid



X-53-375281-6

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I  
MADRID, 1999



BIBLIOTECA



# AGRADECIMIENTOS

Parece que fue ayer cuando comencé mi Tesis Doctoral y, sin embargo, han pasado 4 años, de los que guardo muy buenos recuerdos. Durante todo este tiempo he recibido el apoyo constante de muchas personas, gracias al cual he superado todas las dificultades que han ido surgiendo, estimulándome para seguir adelante con esta aventura llamada Tesis.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincera gratitud a los Directores de esta Tesis, los Drs. Antonio Ballesteros Olmo y Francisco J. Plou Gasca. Antonio me seleccionó para este trabajo confiando ciegamente en mí (lo cual nunca podré agradecer lo suficiente), aconsejándome y dándome la oportunidad de conocer lo que realmente es el mundo científico. Gracias por todo, y especialmente por estar tan cercano a tu grupo. Francisco es un gran investigador, y mejor persona. Ha sido mi guía durante todos estos años, siempre ha tenido un momento para cualquier duda, y las ha solucionado todas con infinita paciencia. Tengo una enorme deuda de gratitud contigo, Kiko, por todo lo que me has ayudado dentro y fuera del laboratorio, que espero poder devolver algún día (de momento este año ganamos el torneo de tenis, seguro).

A mi tutora la Dra. Pilar Estrada Díaz debo agradecer su gran cordialidad y su excelente disposición para solucionar cualquier tipo de problema que se planteara.

Al Director del Instituto de Catálisis Dr. Javier Soria Ruiz por las facilidades prestadas y al personal del centro en general (Biblioteca, Unidad de Apoyo etc.) por los servicios ofrecidos.

Esta Tesis se enmarca dentro de un proyecto en colaboración con varios grupos europeos, a todos ellos les agradezco su profesionalidad, consejos y experiencia que han aportado para mejorar el resultado de las investigaciones. Especialmente, los Drs. Pierre Monsan, Magali Remaud y Rene-Marc Willemot del Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas de Toulouse, cuya acogida durante mi estancia y la enseñanza recibida en las técnicas de inmovilización fueron fundamentales para el desarrollo de la Tesis. Asimismo, los Drs. Sven Pedersen y Carsten Andersen de Novo Nordisk, porque sus excelentes cálculos de accesibilidad y sus consejos científicos fueron de especial valor. Por último, los Drs. Lubbert Dijkhuizen, Bauke Dijkstra y Dirk Penninga de la Universidad de Groningen, que nos enseñaron numerosas técnicas analíticas necesarias para llevar a cabo esta investigación.

La finalización de este trabajo no hubiera sido posible sin la siempre imprescindible financiación económica, la cuál provino de becas-contrato de proyectos europeos y posteriormente de diversas fuentes, como la ayuda de la Fundación Caja de Madrid, la beca de FPI de la Comunidad de Madrid, y más recientemente la beca de alimentación otorgada por el Instituto Danone.

El estupendo ambiente de trabajo que se respira en los laboratorio 211 y 215 es consecuencia de los compañeros que lo forman. Manolo y yo entramos juntos en el Instituto y seguimos con las mismas bromas del primer día. Mari Angeles porque sus consejos científicos siempre estuvieron cuando los necesité. “Mis becarias”, Mayte y Arantza, (seguro que no he podido dejar “mis enzimas” en mejores manos). A Gloria por tener esa gracia “extremeña” que contrarresta en parte los chistes y dichos de Eitel (dignos del peor teleconcurso), y a Nieves por sus palabras siempre amables y su cariño. También debo recordar otros muchos que pasaron por el laboratorio y que dejaron una parte importante de su alegría en el grupo (especialmente, Oscar, Iki, Marta y Marivi).

Agradezco a “los guisanes y los toñitos” por ser tan buenos vecinos. Con respecto a estos últimos, Juan, Chema, Carolina, Toñito (y el “desterrado” Fernando), así como los “Restos”: Baranda, Luisa, Ana, Miguel Angel, Quique, Karim, Javier, Paco y Andrés (estos dos últimos la pareja más impresentable jamás vista en una cancha); todos ellos son junto con el 215, sin lugar a dudas, el alma del Instituto.

En un capítulo aparte, pero no de menor importancia, debo incluir a todos mis amigos. Sobre todo los del “cerro” (y en especial Raúl, el Búho y Alvaro) que siempre me consideraron “el Doctor Galeote”, cuando ni tan siquiera era licenciado. Por supuesto a Luis (espero que seas feliz en Argentina) porque con él conocí el verdadero significado de la palabra amistad, y porque hemos compartido muchas cosas juntos, que guardaré con mis mejores recuerdos.

A mis padres a los que quiero mucho, esta tesis va por vosotros. Mis hermanos, Aniano, Mari (y tú también Juan), porque siempre hemos sido una piña y los problemas nunca nos superarán, os quiero. También a Maria José, Clara y abuelos, por su constante apoyo e interés por mi persona y mi trabajo.

Y por último, aunque en primer lugar en mi corazón, a María por sonreír como solamente tú sabes, por quererme tanto y porque juntos somos uno.

“Y frunciendo el ceño, dijo el venerable maestro de Jedi a su discípulo: Hazlo o no lo hagas... pero no lo intentes”

# INDICE

## I INTRODUCCION

1. GLICOSILTRANSFERASAS.....	2
1.1 LAS REACCIONES DE TRANSFERENCIA.....	2
2. CICLODEXTRIN GLICOSILTRANSFERASAS.....	3
2.1 LAS CICLODEXTRINAS.....	3
<i>Estructura</i> .....	3
<i>Propiedades</i> .....	5
<i>Aplicaciones</i> .....	5
<i>Producción industrial</i> .....	8
2.2 EL ALMIDON.....	9
2.3 FUNCION CELULAR DE LAS CGTasas.....	10
2.4 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CGTasas.....	11
2.5 ACTIVIDAD CATALITICA.....	13
2.6 ESTRUCTURA Y MECANISMO.....	14
2.6.1 LOS DOMINIOS.....	15
2.6.2 EL SITIO DE UNION DE ALMIDON.....	18
2.6.3 EL CENTRO ACTIVO.....	19
<i>La triada catalítica y los subsitios de unión del sustrato</i> .....	19
<i>La acción de la triada catalítica</i> .....	20
<i>El eje de ciclación</i> .....	21
<i>El mecanismo de la reacción</i> .....	23
2.7 ESTRUCTURA-FUNCION EN CGTasas. ESTUDIOS DE MUTAGENESIS DIRIGIDA Y MODIFICACION QUIMICA.....	26
2.8 CGTasa DE <i>Thermoanaerobacter</i> sp.....	27
2.8.1 PROPIEDADES DE LA ENZIMA.....	27
2.8.2 CGTasa DE <i>Thermoanaerobacter</i> sp. COMO ENZIMA ALIMENTARIA.....	27
2.8.3 VENTAJAS DEL EMPLEO INDUSTRIAL DE LA CGTasa DE <i>Thermoanaerobacter</i> sp. COMO ENZIMA TERMOESTABLE. PRINCIPALES APLICACIONES.....	28
<i>Licuefacción del almidón empleando la CGTasa de Thermoanaerobacter sp.</i> .....	29
<i>Producción de ciclodextrinas</i> .....	30

3. LAS DEXTRANSACARASAS.....	31
3.1 GLUCANSACARASAS Y DEXTRANOS QUE PRODUCEN.....	31
3.2 APLICACIONES DE LOS DEXTRANOS.....	34
3.3 PRODUCCION DE OLIGOSACARIDOS DE INTERES CON DEXTRANSACARASAS.....	36
<i>Los glucooligosacáridos.....</i>	36
<i>La leucrosa.....</i>	37
3.4 LA DEXTRANSACARASA DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512F.....	38
3.4.1 CARACTERISTICAS GENERALES.....	38
3.4.2 MECANISMO DE LA SINTESIS DE DEXTRANO.....	40
<i>Mecanismo de doble inserción.....</i>	41
<i>Síntesis de ramas.....</i>	41
<i>Reacción de aceptor.....</i>	42
3.5 INMOVILIZACION DE DEXTRANSACARASAS.....	46
<b>II OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
<b>III MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>50</b>
<b>MATERIALES.....</b>	<b>50</b>
<b>METODOS.....</b>	<b>51</b>
1. PURIFICACION DE LA CGTasa.....	51
1.1 PURIFICACION CON LA MATRIZ AFFI-T.....	51
1.2 PURIFICACION CON LA MATRIZ DE AFINIDAD $\alpha$ -CICLODEXTRINA/SEPHAROSA.....	52
1.2.1 ACTIVACION DEL GEL.....	52
1.2.2 PROTOCOLO DE PURIFICACION.....	53
2. MODIFICACION QUIMICA DE LA CGTasa.....	53
2.1 MODIFICACION DE LOS GRUPOS AMINO.....	53
2.1.1 <i>Determinación del grado de modificación.....</i>	54
2.2 MODIFICACION DE LOS GRUPOS CARBOXILO.....	55
2.2.1 <i>Determinación del grado de modificación.....</i>	56
2.3 MODIFICACION DE LA CISTEINA.....	56
3. MEDIDAS DE ACTIVIDAD CATALITICA DE LA CGTasa.....	58
3.1 ENSAYOS DE ACTIVIDAD INICIAL A TIEMPOS CORTOS.....	58
3.1.1 ACTIVIDAD DE CICLACION.....	58
3.1.2 ACTIVIDAD DE ACOPLAMIENTO.....	61
3.1.3 ACTIVIDAD DE TRANSFERENCIA.....	63

3.1.4 ACTIVIDAD DE HIDROLISIS.....	65
3.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD A TIEMPOS LARGOS.....	67
4. ESTUDIOS DE LA SELECTIVIDAD DE LA CGTasa EN FUNCION DEL pH .....	67
5. ESTUDIOS DE ACCESIBILIDAD DE LOS RESIDUOS DE LA CGTasa.....	68
6. ELIMINACION DEL DEXTRANO DE LA DEXTRANSACARASA.....	69
7. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA DEXTRANSACARASA.....	69
8. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA DEXTRANSACARASA.....	70
9. INMOVILIZACION COVALENTE DE LA DEXTRANSACARASA EN SILICE POROSA.....	71
9.1 AMINACION DE LA SILICE.....	71
9.2 ACTIVACION DEL SOPORTE CON GLUTARALDEHIDO.....	72
9.3 INMOVILIZACION DE LA ENZIMA.....	72
10. INMOVILIZACION DE LA DEXTRANSACARASA POR ATRAPAMIENTO EN ALGINATO.....	73
11. REACCION DE ACEPTOR.....	74
12. TECNICAS COMUNES A LOS DOS SISTEMAS ENZIMATICOS.....	75
12.1 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA.....	75
12.2 ELECTROFORESIS.....	75
12.3 ISOELECTROENFOQUE.....	76
<b>IV RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
1. PURIFICACION DE LA CGTasa.....	77
1.1 PURIFICACION CON LA MATRIZ AFFI-T.....	77
1.2 PURIFICACION CON LA MATRIZ DE AFINIDAD SEPHAROSA/ $\alpha$ -CICLODEXTRINA.....	79
2. MODIFICACION QUIMICA DE LA CGTasa.....	81
2.1 ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD DE LA REACCION EN FUNCION DEL pH.....	81
2.2 MODIFICACION DE LOS GRUPOS AMINO.....	82
2.2.1 CARACTERIZACION DE LAS ESPECIES MODIFICADAS.....	85
<i>a) Determinación del grado de modificación.....</i>	<i>85</i>
<i>b) Efecto de la acilación en el punto isoeléctrico.....</i>	<i>86</i>
2.2.2 EFECTO DE LA MODIFICACION SOBRE LAS ACTIVIDADES INICIALES.....	87
2.2.3 EFECTO DE LA MODIFICACION SOBRE LA PRODUCCION DE CICLODEXTRINAS Y OLIGOSACARIDOS.....	88
2.3 MODIFICACION DE LOS GRUPOS CARBOXILO.....	93
2.3.1 CARACTERIZACION DE LAS ESPECIES MODIFICADAS.....	97
<i>a) Determinación del grado de modificación.....</i>	<i>97</i>



2.3.2 EFECTO DE LA MODIFICACION SOBRE LAS ACTIVIDADES INICIALES.....	102
2.3.3 EFECTO DE LA MODIFICACION SOBRE LA PRODUCCION DE CICLODEXTRINAS Y OLIGOSACARIDOS.....	103
2.4 MODIFICACION DE LA CISTEINA.....	104
3. INMOVILIZACION DE LA DEXTRANSACARASA.....	107
3.1 INMOVILIZACION COVALENTE EN SILICE POROSA.....	107
3.1.1 ELIMINACION DEL DEXTRANO.....	107
<i>Determinación del peso molecular</i> .....	107
<i>Actividad y estabilidad</i> .....	108
3.1.2 INMOVILIZACION.....	108
3.1.3 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.....	109
3.2 INMOVILIZACION POR ATRAPAMIENTO EN ALGINATO.....	110
3.2.1 RENDIMIENTO DE LA INMOVILIZACION.....	110
3.2.2. ESTABILIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA.....	110
3.3 ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD EN PRESENCIA DE DISOLVENTES ORGANICOS.....	111
3.3.1 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD CATALITICA.....	111
3.3.2 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD.....	113
4. REACCION DE ACEPTOR DE LA DEXTRANSACARASA.....	115
4.1 EVOLUCION DE LA REACCION.....	116
4.2 REUTILIZACION DEL BIOCATALIZADOR.....	121
<b>V DISCUSION</b> .....	122
1. PURIFICACION DE LA CGTasa.....	122
2. MODIFICACION QUIMICA DE LA CGTasa.....	123
2.1 MODIFICACION DE LOS GRUPOS AMINO DE LA CGTasa.....	124
2.2.1 ACETILACION.....	124
2.1.2 SUCCINILACION.....	128
2.2 MODIFICACION DE LOS GRUPOS CARBOXILO DE LA CGTasa.....	129
2.2.1 SUBSITIOS DEL CENTRO ACTIVO.....	131
2.2.2 REGION DE INFLUENCIA DEL EJE DE CICLACION.....	131
2.3 MODIFICACION DE LA CYS DE LA CGTasa.....	133
3. INMOVILIZACION DE LA DEXTRANSACARASA.....	135
3.1 INMOVILIZACION COVALENTE EN SILICE POROSA.....	135

3.2 INMOVILIZACION POR ATRAPAMIENTO EN ESFERAS DE ALGINATO.....	138
3.3 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD EN PRESENCIA DE DISOLVENTES ORGANICOS.....	138
4. ESTUDIO DE LA REACCION DE ACEPTOR DE LA DEXTRANSACARASA.....	140
<b>VI CONCLUSIONES.....</b>	<b>143</b>
<b>VII BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>145</b>
<b>VIII ANEXOS.....</b>	<b>161</b>
ANEXO I: PROGRAMAS DE FPLC EMPLEADOS EN LA PURIFICACION DE LA CGTasa.....	161
ANEXO II: CALCULOS DE ACCESIBILIDADES ABSOLUTAS Y RELATIVAS DE LA CGTasa.....	163
ANEXO III: SECUENCIAS DE AMINOACIDOS DE LAS CGTasas DE <i>Thermoanaerobacter</i> sp. y <i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i> .....	185
ANEXO IV: PUBLICACIONES Y CONGRESOS A LOS QUE HA DADO LUGAR LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.....	188

# I. INTRODUCCION

## 1. GLICOSILTRANSFERASAS

### 1.1 LAS REACCIONES DE TRANSFERENCIA

## 2. CICLODEXTRIN GLICOSILTRANSFERASAS

### 2.1 LAS CICLODEXTRINAS

*Estructura*

*Propiedades*

*Aplicaciones*

*Producción industrial*

### 2.2 EL ALMIDON

### 2.3 FUNCION CELULAR DE LAS CGTasas

### 2.4 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CGTasas

### 2.5 ACTIVIDAD CATALITICA

### 2.6 ESTRUCTURA Y MECANISMO

#### 2.6.1 LOS DOMINIOS

#### 2.6.2 EL SITIO DE UNION DE ALMIDON

#### 2.6.3 EL CENTRO ACTIVO

*La tríada catalítica y los subsitios de unión del sustrato*

*La acción de la tríada catalítica*

*El eje de ciclación*

*El mecanismo de la reacción*

### 2.7 ESTRUCTURA FUNCION EN CGTasas. ESTUDIOS DE MUTAGENESIS DIRIGIDA Y MODIFICACION QUIMICA

### 2.8 CGTasa DE *Thermoanaerobacter* sp.

#### 2.8.1 PROPIEDADES DE LA ENZIMA

#### 2.8.2 CGTasa DE *Thermoanaerobacter* sp. COMO ENZIMA ALIMENTARIA

#### 2.8.3 VENTAJAS DEL EMPLEO INDUSTRIAL DE LA CGTasa DE *Thermoanaerobacter* sp. COMO ENZIMA TERMOESTABLE. PRINCIPALES APLICACIONES

*Licuefacción del almidón empleando la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp.*

*Producción de ciclodextrinas*

## 3. LAS DEXTRANSACARASAS

### 3.1 GLUCANSACARASAS Y DEXTRANOS QUE PRODUCEN

### 3.2 APLICACIONES DE LOS DEXTRANOS

### 3.3 PRODUCCION DE OLIGOSACARIDOS DE INTERES CON DEXTRANSACARASAS

*Los glucooligosacáridos*

*La leucrosa*

### 3.4 LA DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F

#### 3.4.1 CARACTERISTICAS GENERALES

#### 3.4.2 MECANISMO DE LA SINTESIS DE DEXTRANO

*Mecanismo de doble inserción*

*Síntesis de ramas*

*Reacción de aceptor*

### 3.5 INMOVILIZACION DE DEXTRANSACARASAS

Durante los últimos años, la biotecnología de carbohidratos, también conocida como glicotecnología, ha despertado un gran interés académico e industrial debido a la versatilidad que ofrece en las áreas agroquímicas, cosméticas, y particularmente en los sectores alimentarios y farmacéuticos (Quirasco y cols., 1995). Los oligosacáridos, además de su uso tradicional como fuente de energía o edulcorantes, presentan nuevas aplicaciones en la industria alimentaria como estabilizantes, emulsionantes o, recientemente, como componentes de la dieta que estimulan el crecimiento de bacterias beneficiosas de la microflora intestinal (Monsan y cols., 1995). Al profundizar en el conocimiento de las funciones de los carbohidratos en la superficie celular y en su posible utilización como sustancias glicoterapéuticas, se ha incrementado el interés por estas moléculas y se han abierto nuevas aplicaciones potenciales en inmunología, salud humana y animal -drogas, fenómenos inflamatorios, inmunoestimulación, etc.- (Remaud y cols., 1994).

El papel que desempeñan los oligosacáridos en los sistemas biológicos es fundamental; sin embargo, resulta extremadamente complicado progresar en tales estudios, debido a la gran dificultad encontrada a la hora de dilucidar la estructura de estos azúcares y producir eficientemente derivados estándar. De hecho, mientras que para la síntesis de 6 péptidos diferentes o 6 oligonucleótidos son necesarios 3 aminoácidos o 3 nucleótidos, si se partiese de 3 hexopiranosas se podrían obtener 720 trisacáridos diferentes. Esta enorme variedad estructural está relacionada con la misión que desempeñan los carbohidratos en los mecanismos específicos de reconocimiento celular (Monsan y Paul, 1995). Así pues, se hace necesario el desarrollo de rutas eficientes de síntesis, de fácil escalado, para la obtención de oligosacáridos con aplicaciones diversas. A este nivel, la excepcional estéreo- y regioselectividad que presentan las enzimas puede ser considerada como una herramienta complementaria o alternativa a la síntesis química, que requiere de laboriosos y sucesivos pasos de protección y desprotección (Nilsson, 1991).

La contribución de la enzimología a la producción de oligosacáridos se sustenta en tres pilares básicos:

a) La búsqueda de nuevas cepas de microorganismos capaces de crear enzimas de aplicación industrial.

b) La modificación química y la mutagénesis dirigida de las enzimas, como técnicas complementarias para la obtención de nuevos biocatalizadores con diferentes actividades y/o selectividades.

c) Mejorar el control y las condiciones de operación de las enzimas mediante el uso de tecnologías como la inmovilización, que permitan la recuperación del catalizador y trabajar en condiciones no convencionales (medios de reacción altamente concentrados, presencia de solventes orgánicos, etc.)

Recientemente se ha demostrado el uso potencial de las hidrolasas (glicosidasas, EC 3.2.) para la síntesis de oligosacáridos, en condiciones de control termodinámico. Sin embargo el bajo rendimiento de la reacción y la escasa especificidad de la mayoría de estas enzimas en procesos de síntesis limitan la aplicación de esta tecnología (Monsan, 1990; Monsan y Paul, 1990). Por lo tanto, la principal alternativa a la síntesis química de oligosacáridos son las reacciones de transferencia catalizadas por glicosiltransferasas (EC 2.4.). La industria emplea actualmente dichas reacciones en procesos de producción de ciclodextrinas y glucooligosacáridos (Castillo y cols., 1992).

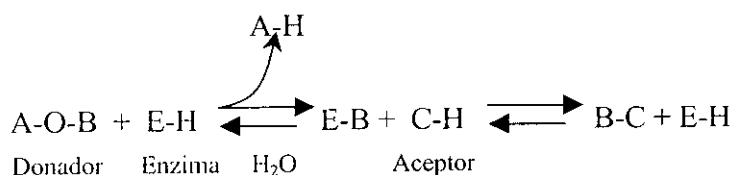
## 1. GLICOSILTRANSFERASAS

Las glicosiltransferasas (o transglicosidasas) pueden ser definidas como enzimas que transfieren un residuo glicosilo desde un donador a un sustrato aceptor; tales reacciones son catalizadas por glicosidasas, fosforilasas y, por supuesto, por transglicosidasas. Sin embargo, el papel de las dos primeras es considerado en la actualidad puramente degradativo, mientras que la alta especificidad hacia los donadores y aceptores de las glicosiltransferasas es la base fundamental para la síntesis específica de las cadenas de azúcar producidas en la célula. Es importante destacar que las glicosiltransferasas de mamíferos son difíciles de manejar, puesto que sus donadores llevan cofactores asociados (son azúcares nucleótidos) que resultan muy caros en el mercado. Sin embargo, las transglicosidasas de microorganismos no requieren dichos cofactores (Nilson, 1991). Dentro de las glicosiltransferasas (EC 2.4.) existen tres tipos diferentes, que se diferencian en la naturaleza del residuo de azúcar que transfieren:

- Hexosiltransferasas (2.4.1.).
- Pentosiltransferasas (2.4.2.).
- Otras enzimas que transfieran restos distintos a hexosas y pentosas (2.4.99.).

### 1.1 LAS REACCIONES DE TRANSFERENCIA

En este tipo de reacciones, se produce la transferencia de un grupo glicosilo, desde un donador (A-O-B) hacia un aceptor (C-H). El mecanismo catalítico conlleva la formación de un complejo covalente intermediario enzima-sustrato (E-B) (Monsan y Paul, 1990).



La energía necesaria para la síntesis del producto final (B-C) proviene de la ruptura inicial del enlace glicosídico, que se almacena en forma de complejo covalente intermedio (E-B), y posteriormente se emplea para transferir el grupo glicosilo al aceptor. Una gran variedad de carbohidratos pueden ser usados como aceptores: monosacáridos, oligosacáridos, y derivados de éstos, así como alcoholes aromáticos o alifáticos; por ello, pueden producirse un elevado número de compuestos diferentes a partir del glicosilo donado. Se ha comprobado que el propio donador glicosilo también puede actuar como aceptor. De este modo, y dependiendo del producto que queramos obtener, se usará una mayor cantidad de aceptor o de donador (Monsan y Paul, 1995). Algunas de estas enzimas catalizan también reacciones de hidrólisis, que pueden considerarse como un transferencia del grupo glicosilo desde el donador al agua (Robyt, 1996). En cualquier caso, la reacción de transglicosilación es estereoespecífica, conservándose la configuración anomérica del grupo glicosilo transferido, en el aceptor.

Para la aplicación industrial de las glicosiltransferasas es determinante poder utilizar carbohidratos baratos como sustratos. Por ello, la ciclodextrin glicosiltransferasa (EC 2.4.1.19.) y la dextransacarasa (EC 2.4.1.5.) son dos de las enzimas de transglicosilación con mejores perspectivas en la enzimología moderna. Esto se debe a que los sustratos que utilizan, almidón y sacarosa respectivamente, no sólo suponen una disminución de los costes, sino que también permiten la síntesis de una amplia variedad de productos de reacción, con distintas aplicaciones.

## 2. CICLODEXTRIN GLICOSILTRANSFERASAS

### 2.1 LAS CICLODEXTRINAS

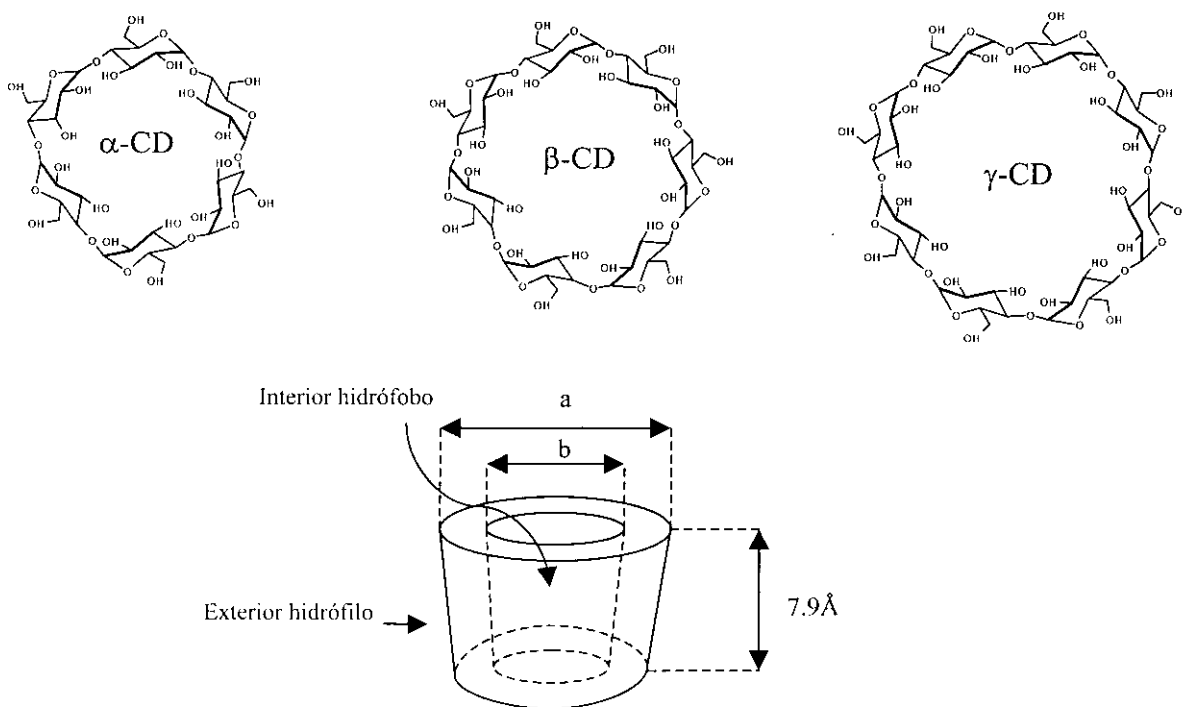
#### *Estructura*

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos no reductores constituidos por 6 ( $\alpha$ -ciclodextrina), 7 ( $\beta$ -ciclodextrina), 8 ( $\gamma$ -ciclodextrina) o más unidades de glucopiranosas, unidas mediante enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ , y formadas reversiblemente a partir de almidón o sustratos similares. Fueron descubiertas en 1891 por Villiers, cuando al estudiar la digestión del almidón por parte de *Bacillus amylobacter* (*Clostridium butyricum*), además de dextrinas reductoras obtuvo una pequeña cantidad de material cristalino, al que llamó celulosina. En el mismo año, se averiguó que Villiers probablemente empleó cultivos contaminados con *Bacillus macerans*, el cual fue el verdadero productor de estas primeras ciclodextrinas (Koch, 1891).

En 1903, Schardinger fue capaz de aislar dos productos cristalinos, dextrinas A y B, que fueron descritos en función de su falta de poder reductor. Sin embargo, no se especificó cuál fue la

bacteria responsable de la síntesis de estos productos. Algunos años más tarde, en 1911, el mismo investigador describió que la especie *Bacillus macerans* producía grandes cantidades de dextrinas cristalinas (25-30%) a partir del almidón. Schardinger llamó a su producto cristalino “dextrina  $\alpha$ -cristalizada” y “dextrina  $\beta$ -cristalizada”. En 1935 la  $\gamma$ -dextrina fue aislada por Freudenberg y Jacobi. Estos científicos también desarrollaron varios protocolos para la producción de ciclodextrinas. Hasta ese momento, la organización de estos compuestos era incierta, pero en 1942 las estructuras de la  $\alpha$ - y de la  $\beta$ -ciclodextrina fueron determinadas por cristalografía de rayos X (French y Rundle, 1942). Pocos años después, se dio a conocer la estructura de rayos X de la  $\gamma$ -ciclodextrina y se reconoció que las ciclodextrinas podían formar complejos de inclusión (Freudenberg y Cramer, 1948). En 1961, se demostró la existencia natural de  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ -ciclodextrina (9-12 residuos) (Pulley y French, 1961). No se conocen ciclodextrinas con menos de 6 unidades de glucosa, probablemente debido a razones estéricas.

A partir de los análisis de las estructuras de rayos X, se deduce que en las ciclodextrinas los hidroxilos secundarios (C2 y C3) están localizados en la cara interna del anillo y los hidroxilos primarios (C6) en la cara externa. Además, los hidrógenos apolares C3 y C5 así como los oxígenos de las uniones glicosídicas se encuentran en la región interna del anillo (Szejtli, 1990; Dijkhuizen y cols., 1995). Como resultado de todo ello, se tiene una molécula con una zona externa hidrófila, que puede disolverse en agua, y una cavidad hidrófoba que proporciona una matriz apolar (Saenger, 1984).



**Figura I.1.** Estructura de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -ciclodextrina y su forma tridimensional. Las longitudes de a y b se recogen en la Tabla I.1 para las distintas ciclodextrinas.

## Propiedades

La consecuencia más importante de la estructura de las ciclodextrinas es la capacidad que poseen para formar complejos de inclusión con gran variedad de moléculas (ácidos grasos, aminas, hidrocarburos alifáticos o aromáticos, etc.). Estas microencapsulaciones moleculares favorecen la solubilidad de moléculas hidrófobas en agua (Otero y cols., 1991) o confieren estabilidad a sustancias volátiles o lábiles (Szejtli, 1990).

**Tabla I.1.** Propiedades de las distintas ciclodextrinas (Bender, 1986; Uekama e Irie, 1987; Romberger, 1997).

Propiedad	$\alpha$ -ciclodextrina	$\beta$ -ciclodextrina	$\gamma$ -ciclodextrina
Número de unidades de glucopiranosas	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidad en agua 25°C (% p/v)	14.5	1.85	23.2
Diametro exterior (a) (Å)	14.6	15.4	17.5
Diametro de la cavidad (b) (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Profundidad de la cavidad (Å)	7.9	7.9	7.9
Volumen aproximado de la cavidad (Å <sup>3</sup> )	174	262	427

Aparte de las ciclodextrinas naturales, se han sintetizado numerosos derivados de éstas, que son normalmente producidos mediante aminaciones, esterificaciones o eterificaciones de los grupos hidroxilos primarios y secundarios de la ciclodextrina. Dependiendo del sustituyente, la solubilidad de los derivados de ciclodextrinas varía con respecto a las ciclodextrinas de las que proceden (Wenz, 1994; Kobayashi, 1996).

## Aplicaciones

Las moléculas encapsuladas en ciclodextrinas presentan ventajosos cambios en sus propiedades químicas y físicas, como son:

- Estabilización de sustancias sensibles a la luz o al oxígeno.
- Modificación de la reactividad química de las moléculas encapsuladas.
- Fijación de sustancias muy volátiles.
- Aumento de su solubilidad.
- Protección contra la degradación por microorganismos.
- Enmascaramiento de los malos olores y sabores.
- Enmascaramiento de los pigmentos o colores de las sustancias.



Todas estas propiedades, que las ciclodextrinas o sus derivados confieren a las moléculas que albergan, las hacen apropiadas para sus aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, artículos de droguería, química analítica y agricultura.

ALIMENTACION: el uso de las ciclodextrinas en alimentación fue aprobado por primera vez por el Ministerio Japonés de Salud en 1976 (se clasificaron como aditivos alimentarios naturales). En Japón la mayoría de las ciclodextrinas producidas se consumen en productos alimentarios. En 1986 el gobierno holandés aprobó la  $\beta$ -ciclodextrina para su uso en cualquier producto alimentario en el que estuvieran permitidos almidones modificados. El ejemplo holandés fue rápidamente seguido por varios países europeos -entre ellos España- (Korpela y cols., 1988).

La principal aplicación de las ciclodextrinas en alimentos se desarrolla en la estabilización de aromas, incluso a elevadas temperaturas y durante largos períodos de tiempo. De esta forma, los aromas se emplean en mucha menor cantidad cuando se encuentran encapsulados. La utilización de estos complejos aroma-ciclodextrina se han desarrollado en té, caramelos, chocolates, etc. siendo una técnica especialmente útil durante el procesado de productos alimentarios, evitando la rápida evaporación y oxidación de los aromas (Juhász y cols., 1988). Del mismo modo, las ciclodextrinas pueden estabilizar condimentos y especias cuando son sometidos a largos períodos de almacenamiento, protegiéndolos así contra la oxidación. Muchas especias, como los picantes, están comercialmente disponibles en Japón en forma de complejo de inclusión (Szente y cols., 1988; Vokk y cols., 1991).

Otra importante aplicación alimentaria es la eliminación o disminución de olores o sabores no deseados (Weiszfeiler y Szejtli, 1988). Un ejemplo característico es la reducción del amargor de los zumos de cítricos (Shaw y cols., 1984). Ciertos productos de pescadería desarrollan rápidamente olores y sabores peculiares, que proceden de aminas y ácidos grasos oxidados. Las ciclodextrinas, en concentraciones de 2-5%, son efectivas en enmascarar estos olores y al mismo tiempo mejoran la textura del alimento (Hashimoto, 1988).

La textura de los productos cárnicos y de los productos de confitería también puede mejorarse pulverizando ciclodextrinas sobre su superficie. Respecto a la carne, las ciclodextrinas afectan a la consistencia de ésta e intensifican la dureza de partes tipo gel. Estos efectos probablemente deriven de cambios en las interacciones de los complejos lípido-proteína (Juhász y cols., 1988). Estas propiedades pueden ser aprovechadas para el empleo de las ciclodextrinas con emulsiones y cremas batidas. Concretamente la mayonesa, la margarina y las cremas de mantequilla pueden estabilizarse con  $\beta$ -ciclodextrina (Hashimoto, 1988). Además, empleando  $\beta$ -ciclodextrina se puede eliminar el colesterol de la yema del huevo, de la leche y de la mantequilla para producir productos de consumo diario de bajo contenido en colesterol (Kohlrausch y

cols., 1994). Por último, son de interés los agentes antimicrobianos que se adicionan a los alimentos encapsulados en ciclodextrinas (por ejemplo, la yodina y el ácido benzoico). Los efectos de estas sustancias aumentan cuando están incluidos en la ciclodextrina, por lo que menor cantidad de ellos debe ser añadida al producto (Szejtli, 1982a).

La ingestión de ciclodextrinas no es perjudicial para el ser humano. Las ciclodextrinas presentes en los productos alimentarios son bastante resistentes a los enzimas que degradan el almidón, aunque pueden ser hidrolizadas con bajos rendimientos por  $\alpha$ -amilasas (Szejtli, 1982b). La  $\alpha$ -ciclodextrina prácticamente no es degradada, mientras que la  $\beta$ -, y sobre todo la  $\gamma$ -ciclodextrina son hidrolizadas con mayor facilidad debido a su tamaño y flexibilidad. Dicha descomposición no se lleva a cabo a través de las amilasas presentes en la saliva o en el páncreas, sino mediante  $\alpha$ -amilasas de microorganismos de la flora del colon. Los estudios de absorción revelan que únicamente el 2-4% de las ciclodextrinas ingeridas se absorben en el intestino delgado, y que el resto es degradado y recuperado como glucosa en el colon. Esto explica la baja toxicidad encontrada tras la ingestión de ciclodextrinas (Duchene, 1988; Bar y Ulitzur, 1994). La resistencia de la  $\alpha$ -ciclodextrina a la degradación por  $\alpha$ -amilasas puede ser aprovechada para sintetizar complejos de ácidos grasos con  $\alpha$ -ciclodextrina, con posibles aplicaciones dietéticas (Sato y cols., 1986).

**FARMACIA:** existen numerosas aplicaciones de las ciclodextrinas en la industria farmacéutica. Por ejemplo, la adición de  $\alpha$ - o  $\beta$ -ciclodextrina incrementa la solubilidad en agua de varias sustancias lipófilas como las prostaglandinas (Pitha, 1988). En algunos casos, esto supone una mayor vida media del medicamento, incrementando sus efectos farmacológicos y permitiendo una reducción en la dosificación de la droga suministrada (Bekers y cols., 1988). Los complejos de inclusión pueden también facilitar la manipulación de productos volátiles, proporcionando diferentes vías de administración de drogas, como por ejemplo en forma de tabletas o grageas. Las ciclodextrinas son empleadas para mejorar la estabilidad de sustancias aumentando su resistencia a la hidrólisis, oxidación, calor, luz y sales metálicas. La inclusión de productos irritantes en ciclodextrinas puede también proteger la mucosa gástrica en el caso de medicamentos de administración oral, y reducir alergias dérmicas en el caso de medicamentos de uso tópico. Además, las ciclodextrinas pueden aplicarse para reducir el sabor amargo y el mal olor de las drogas (Duchene, 1988; Szejtli, 1988).

**AGRICULTURA:** las ciclodextrinas retrasan la germinación de las semillas. En el grano tratado con  $\beta$ -ciclodextrina se inhiben algunas amilasas que degradan el almidón de reserva de las semillas. Inicialmente, las plantas crecen más lentamente, pero más tarde este retraso es compensado por una mejora en el rendimiento de desarrollo en un 20-45% (Saenger, 1980; Oakes y cols., 1991).

## ***Producción industrial***

Las ciclodextrinas tienen una importante aplicación industrial, y su uso en el mercado está aumentando aproximadamente 30-40% al año. Sin embargo, su precio actualmente es demasiado alto (1 kg de la ciclodextrina más barata -la  $\beta$ - cuesta 15-20 \$ USA). Aunque se ha estimado que el mercado potencial para las ciclodextrinas en Estados Unidos es de 32.000 toneladas por año (Starnes, 1990b), su consumo mundial durante 1995 alcanzó escasamente 5.500 toneladas; estas diferencias serán superadas únicamente cuando el precio de las ciclodextrinas disminuya de forma significativa (hasta 5 \$ USA por kilo) (Schmid, 1989). Se hace necesario, por tanto, el desarrollo de métodos de producción de ciclodextrinas más económicos. El mercado de las ciclodextrinas es todavía muy limitado, debido a la escasa disponibilidad de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina.

Las ciclodextrinas son producidas industrialmente a partir de almidón utilizando la enzima ciclodextrin glicosiltransferasa (CGTasa). Todas las CGTasas estudiadas producen una mezcla de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrinas, que dadas sus propiedades diferentes necesitan ser separadas. Tradicionalmente se suelen emplear dos enfoques muy diferentes para producir ciclodextrinas puras: la cristalización selectiva de  $\beta$ -ciclodextrina o la formación de complejos de inclusión de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina con disolventes orgánicos. La cristalización se basa en las diferencias de solubilidad de las ciclodextrinas (ver Tabla I.1). Después de la síntesis de las ciclodextrinas, la CGTasa es inactivada, el almidón residual es hidrolizado con una glucoamilasa, y la  $\beta$ -ciclodextrina es cristalizada. Como segunda posibilidad, algunos disolventes orgánicos (tolueno o ciclohexano) se emplean en el aislamiento de la  $\beta$ -ciclodextrina. Los disolventes conocidos para la  $\alpha$ -ciclodextrina tienen elevados puntos de ebullición (229°C para el 1-decanol) lo que supone una gran dificultad a la hora de eliminarlos del medio acuoso mediante evaporación. En cuanto a los empleados con la  $\gamma$ -ciclodextrina (p. ej. ciclododecanona) son demasiado caros para su uso comercial. Otras desventajas añadidas de la utilización de disolventes para la separación de ciclodextrinas son su toxicidad, su inflamabilidad, y la necesidad de un proceso efectivo de recuperación del disolvente (Pedersen, 1995). Las alternativas más innovadoras al empleo de los disolventes orgánicos son la utilización de resinas de intercambio iónico, resinas sintéticas de afinidad o membranas de ultrafiltración. Sin embargo, estos métodos no están optimizados, y parece poco probable que con ellos se puedan alcanzar rendimientos interesantes para una posterior aplicación industrial. Por todo ello, existe una gran demanda de procesos que permitan producir  $\alpha$ - y  $\gamma$ -ciclodextrinas puras, debido al enorme interés económico que suscitan estas moléculas. Además, los métodos que se emplean para la producción de  $\beta$ -ciclodextrina no son ideales. En consecuencia, la investigación se dirige actualmente hacia la obtención de CGTasas selectivas de uno de los tres tipos de ciclodextrinas, mediante la combinación de tres tecnologías complementarias: mutagénesis dirigida, modificación química y cristalografía de proteínas.

## 2.2 EL ALMIDON

El almidón es el polisacárido de reserva más abundante en plantas como el maíz, la patata, el trigo o la cebada, lo mismo que sucede con el glucógeno en animales.

El almidón se encuentra en dos formas, la amilosa y la amilopectina. La amilosa está constituida por cadenas largas no ramificadas, en las que todas las unidades de D-glucosa se hallan unidas mediante enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$ . Las cadenas son polidispersas y varían en peso molecular desde unos pocos cientos hasta 500.000. La amilopectina está muy ramificada; las ramificaciones se hallan constituidas por unas 12 unidades de glucosa y aparecen, por término medio, cada 20-25 unidades de glucopiranosas. Los enlaces glucosídicos del esqueleto son  $\alpha(1\rightarrow4)$ , pero los puntos de ramificación son enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Su peso molecular puede llegar al millón. Estos puntos de ramificación son resistentes a la hidrólisis por amilasas (Boyce, 1986).

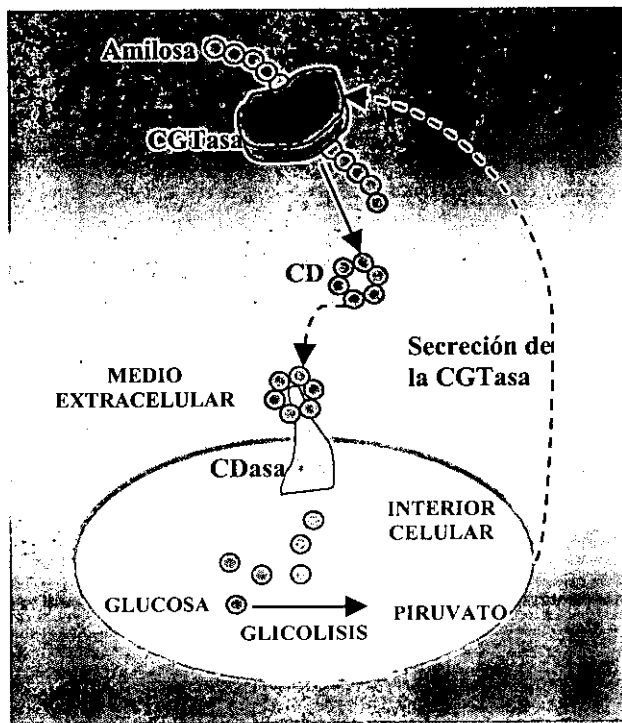
En las plantas, el almidón se deposita en forma de discretos gránulos citoplásmicos, de unos 100-400 Å de diámetro. Estos gránulos son insolubles en agua fría, lo cual es un inconveniente para su tratamiento industrial (ya que deben estar disueltos durante el ataque enzimático). En consecuencia, la pasta de almidón se suele calentar a temperaturas de 62 a 72°C -denominado punto de gelatinización-. La temperatura exacta para la gelatinización (y por lo tanto para la solubilización del almidón) dependerá del contenido relativo de amilosa y amilopectina. Dicha composición puede variar de un 11 a un 51% de amilosa dependiendo de la especie de planta, órgano, edad del órgano, y condiciones de crecimiento. En definitiva, algunos almidones son más fácilmente gelatinizados (por ejemplo, el almidón de la patata, que contiene un 20% de amilosa y un 80% de amilopectina) que otros (el almidón de maíz o de arroz) (Martin y Smith, 1995).

Hasta el momento, se han identificado más de 20 tipos diferentes de enzimas que emplean el almidón como sustrato (Svensson, 1994). En las pasadas décadas, el número de aplicaciones para estas enzimas, así como los niveles de producción se incrementaron enormemente. Como resultado, estos biocatalizadores actualmente abarcan más del 30% de la producción mundial de enzimas. La industria del almidón está, sin embargo, buscando nuevas enzimas más apropiadas y eficientes. Las enzimas termoestables son de especial interés industrial, ya que para la licuefacción del almidón es necesario trabajar a elevadas temperaturas (hasta 110°C) que permiten incrementar la solubilidad del almidón y reducir su viscosidad en agua (Starnes, 1991).

## 2.3 FUNCION CELULAR DE LAS CGTasas

Muchos microorganismos -bacterias y hongos- secretan enzimas al medio extracelular con la principal misión de degradar el almidón, facilitando el suministro de carbohidratos al interior celular. De todos ellos, un pequeño grupo de bacterias producen unas enzimas, las ciclodextrin glicosiltransferasas (CGTasas; EC 2.4.1.19), que tienen la virtud de convertir el almidón en ciclodextrinas mediante una transglicosilación intramolecular (Lawson y cols., 1994; Dijkhuizen y cols., 1995). Las ciclodextrinas sintetizadas en el exterior celular pueden desempeñar dos funciones muy diferentes:

a) Mediante la producción de ciclodextrinas el organismo dispone de una reserva externa de glucosa, que no es accesible para otras células debido a que no son capaces de metabolizar estos oligosacáridos cíclicos. Cuando el microorganismo requiera energía adicional, hidrolizará las ciclodextrinas extracelulares transformándolas en fuente de energía para su crecimiento. En este proceso interviene la enzima ciclomaltodextrinasa (CDasa; EC 3.2.1.54) asociada a la célula -concretamente a la membrana celular y localizada en la cara citosólica- que produce glucosa, maltosa y maltotriosa a partir de la ciclodextrina (Feederle y cols., 1996). El metabolismo posterior de la glucosa tiene lugar en el interior celular mediante las rutas glicolíticas, dando como producto final piruvato (Saha y Zeikus, 1990).



**Figura I.2.** Representación esquemática de la acción conjunta de la CGTasa y la CDasa. La CGTasa es secretada por la bacteria y crea una ciclodextrina a partir de una cadena de amilosa. La CDasa asociada a la célula convierte la ciclodextrina en glucosa y otros oligosacáridos. A continuación, la glucosa se emplea en la glicólisis para producir piruvato y ATP. Los círculos naranjas indican los residuos de glucosa.

b) Las ciclodextrinas creadas por estas bacterias son empleadas para formar complejos de inclusión con sustancias tóxicas que se encuentren próximas a ellas, o con compuestos necesarios para el crecimiento, tales como el hexadecano (Aeckersberg y cols., 1991).

## 2.4 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CGTasas

Hasta el momento, al menos 38 CGTasas han sido identificadas y purificadas, y sus correspondientes genes clonados, principalmente de especies Gram positivas del género *Bacillus*, aunque también de especies de *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Micrococcus*, y de *Klebsiella*, la única Gram negativa productora de CGTasa.

Aunque todas las CGTasas descritas tienen similitudes en la composición de aminoácidos (tienen en común alrededor de un 60% de la cadena polipeptídica), sus características enzimáticas son diferentes. La relación molar de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina obtenida, así como sus propiedades físico-químicas (estabilidad, pH y temperatura óptimos) varían dependiendo de la bacteria productora de la enzima (Haga y cols., 1994).

Las CGTasas estudiadas pueden ser clasificadas como  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -CGTasas en función de cual sea el producto principal que sintetizan. Existen numerosas  $\alpha$ - y  $\beta$ -CGTasas, aunque muy pocos casos de  $\gamma$ -CGTasas. Por ejemplo, la CGTasa de *Bacillus macerans* es una  $\alpha$ -CGTasa (Delbourg y cols., 1993), mientras que la CGTasa de *Bacillus circulans* es una  $\beta$ -CGTasa (Lawson y cols., 1990). *Bacillus subtilis* (cepa 313) es el único microorganismo conocido capaz de sintetizar  $\gamma$ -CGTasa (Horikoshi, 1988). Sin embargo, su producción de  $\gamma$ -ciclodextrina es muy limitada, por lo que se recurre a otras CGTasas. Este es el caso concreto de la CGTasa de *Bacillus ohbensis* que se utiliza a nivel industrial para la obtención de  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina, ya que además de sintetizar como producto principal  $\beta$ -ciclodextrina produce grandes cantidades de  $\gamma$ -ciclodextrina (no se detecta la presencia de  $\alpha$ -ciclodextrina) (Sin y cols., 1993; Sin y cols., 1994). La CGTasa de *Bacillus firmus* es una de las últimas CGTasas descubiertas (Goel y Nene, 1995) y de la que se está optimizando la producción de la enzima por parte del microorganismo (Gawande y cols., 1998).

Tabla I.2. Características más importantes de las principales CGTasas (Kobayashi, 1996). n.d: (no descrito)

Microorganismo	Peso molecular	n° aminoácidos	pH óptimo	Estabilidad frente al pH	Temperatura óptima (°C)	Selectividad
<i>B. circulans</i>	68000	686	5.2-5.7	7.0-9.0	55	$\beta > \gamma > \alpha$
<i>B. licheniformis</i>	72000	684	5.5	n.d.	65-70	$\alpha > \beta > \gamma$
<i>B. macerans</i>	75000	686	5.2-5.7	8.0-10.0	60	$\alpha > \beta > \gamma$
<i>B. megaterium</i>	75000	n.d.	5.2-6.2	7.0-10.0	55	$\beta > \gamma > \alpha$
<i>B. ohbensis</i>	70000	675	5.5	6.5-9.5	60	$\beta > \gamma$
<i>B. stearothermophilus</i>	68000	683	6.0	8.0-10.0	70-75	$\alpha > \beta > \gamma$
<i>B. subtilis</i> 313	64000	501	8.0	6.0-8.0	65	$\gamma$
<i>Bacillus sp. alcalófilos:</i>						
<i>Neutros</i>	88000	686	7.0	6.0-8.0	50	$\beta > \alpha > \gamma$
<i>Ácidos</i>	88000	686	4.5-4.7	6.0-10.0	45	$\beta > \alpha > \gamma$
<i>Klebsiella oxytoca</i>	69000	n.d.	6.0-7.2	5.0-7.5	n.d.	$\alpha > \beta > \gamma$
<i>Thermoanaerobacter sp.</i>	75000	683	5.8	5.0-6.7	90-95	$\beta > \alpha > \gamma$
<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i>	75000	683	6.0	n.d.	85	$\beta > \alpha > \gamma$

## 2.5 ACTIVIDAD CATALITICA

La CGTasa es la única glicosiltransferasa que cataliza de forma reversible transglicosilaciones  $\alpha(1\rightarrow4)$  inter- e intramoleculares a partir de almidón, presentando cuatro actividades bien diferenciadas: ciclación, acoplamiento, transferencia e hidrólisis (Jamuna y cols., 1993; Nakamura y cols., 1993).

Concretamente dichas actividades se caracterizan por:

**Ciclación:** transferencia intramolecular de un extremo reductor (donador) del azúcar, a un extremo no reductor de la misma cadena (aceptor), formándose un compuesto cíclico (ciclodextrina).

**Acoplamiento:** es la reacción en la que una molécula de ciclodextrina (donador) se combina con oligosacáridos lineares (aceptor) para producir una cadena más larga que la del oligosacárido inicial.

**Transferencia:** transferencia intermolecular entre dos cadenas de oligosacáridos lineares, una de ellas actúa como donador y la otra como acepto.

**Hidrólisis:** transferencia del extremo reductor del azúcar al agua (aceptor).

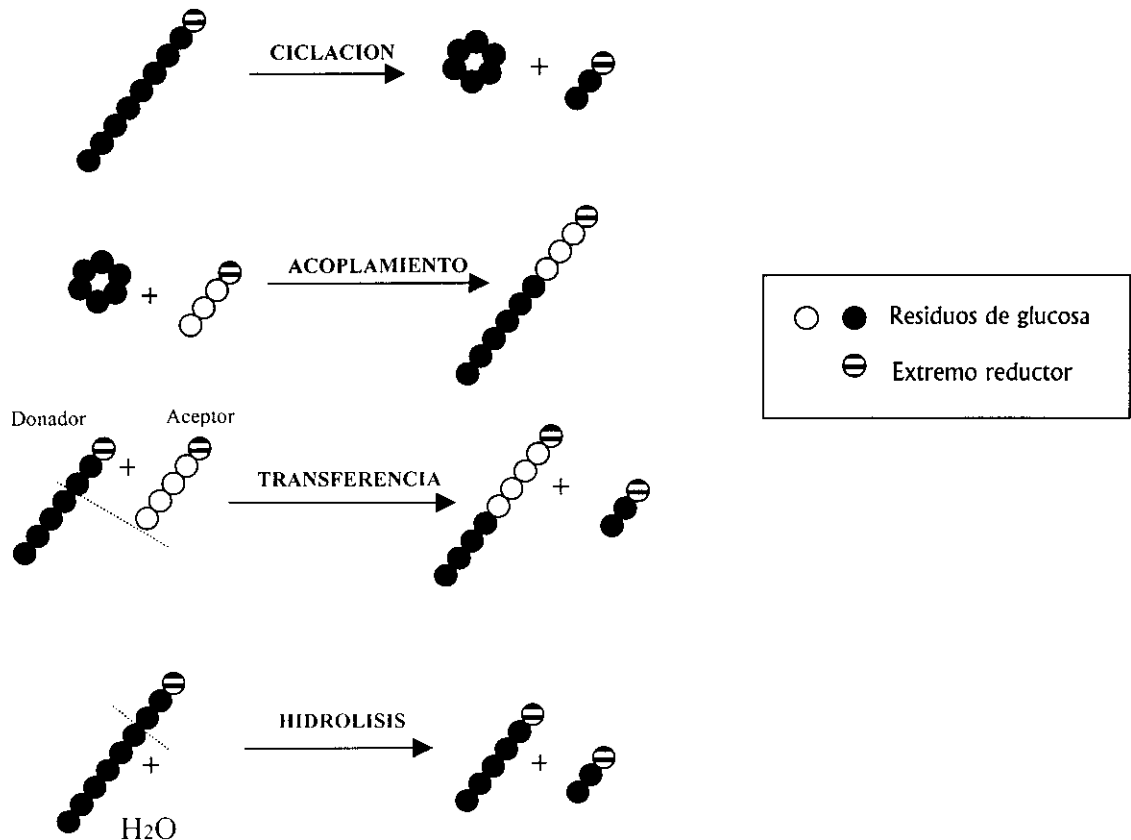
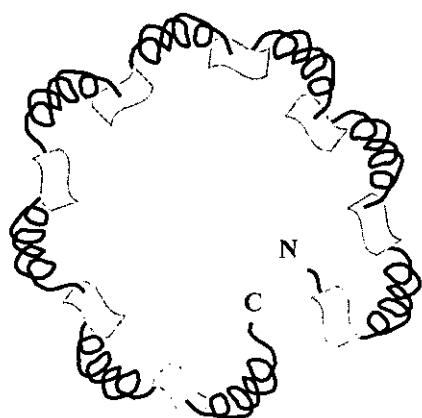


Figura I.3. Representación esquemática de las diferentes actividades de la ciclodextrin glicosiltransferasa.



## 2.6 ESTRUCTURA Y MECANISMO

La CGTasa es una enzima multifuncional (Kim y cols., 1995), estrechamente relacionada con las  $\alpha$ -amilasas. Concretamente, ambas enzimas comparten alrededor del 30% de su secuencia de aminoácidos. Las estructuras tridimensionales de las  $\alpha$ -amilasas y de las CGTasas, muestran una clara similitud en la región N-terminal de aproximadamente 400 residuos, los cuales se presentan en forma de estructura “tonel”  $(\beta/\alpha)_8$  (del inglés  $(\beta/\alpha)_8$  *barrel*) y comprende los dominios A, B, y C (Lawson y cols., 1994). Esta agrupación se organiza mediante 8 cadenas  $\beta$  paralelas rodeadas por 8  $\alpha$ -hélices (Janecek, 1994), fue por primera vez encontrada en la estructura de la isomerasa triosafosfato de músculo de pollo, denominándose TIM (del inglés *triosephosphate isomerase*).



**Figura I.4.** Representación esquemática de la estructura tonel  $(\beta/\alpha)_8$ . Las hebras negras representan las  $\alpha$ -hélices, y las grises cadenas  $\beta$ . N y C indican los extremos N-terminal y C-terminal.

Sin embargo, en contraste con las  $\alpha$ -amilasas, las CGTasas poseen dos dominios C-terminal adicionales -dominios D y E- que se pliegan constituyendo cadenas  $\beta$ . Por eso la masa molecular de las CGTasas está en torno a 70-75 kDa, mientras que la de las  $\alpha$ -amilasas es de 45-55 kDa (Dijkhuizen y cols., 1995). Debido a las similitudes existentes en las estructuras primaria y terciaria de las CGTasas y de las  $\alpha$ -amilasas, se consideran pertenecientes a la misma familia estructural: familia glicosil-hidrolasa nº13, también llamada familia  $\alpha$ -amilasa (Nakamura y cols., 1994a). Existen muchos casos de clasificación “en falso” de CGTasas que en principio fueron descritas como  $\alpha$ -amilasas. Por ejemplo, las consideradas  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus circulans* cepa F2, y *Bacillus. sp* cepa B1018 fueron más tarde reclasificadas como CGTasas (Wind y cols., 1998b). La  $\alpha$ -amilasa de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 fue recientemente catalogada como una CGTasa con inusual y elevada actividad hidrolítica (Wind y cols. 1995).



**Figura I.5.** Estructura de la CGTasa. Los cilindros rojos representan las  $\alpha$ -hélices y las flechas azules las cadenas  $\beta$ . Obsérvese la complicada topología TIM localizada en la zona central de la proteína. Estructura tridimensional procesada con el programa de simulación molecular WebLab ViewerLite 3.10 (MSI).

Todos los conocimientos obtenidos respecto a la estructura y funcionamiento de la CGTasa proceden de estudios cristalográficos de la enzima en presencia de diferentes sustratos o inhibidores, realizados a partir de CGTasas nativas o modificadas (química o genéticamente). Hasta el momento se ha completado el estudio cristalográfico de las CGTasas de las siguientes especies: *Bacillus stearothermophilus* (Kubota y cols., 1991), *Bacillus circulans* cepa 8 y su mutante D229A (Klein y cols., 1992), *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (Knegtel y cols., 1996), *Bacillus. circulans* cepa 251 y cuatro mutantes de ésta (Knegtel y cols., 1995; Strokopytov y cols., 1996). Desde este momento, se utilizará la numeración de la CGTasa de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (Tabium-CGTasa), cuya estructura ha sido resuelta, presentando una homología superior al 90% en la secuencia de aminoácidos con respecto a la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 (la enzima con la que he realizado mis estudios).

## 2.6.1 LOS DOMINIOS

La estructura de la CGTasa presenta 5 dominios denominados A, B, C, D y E (Lawson y cols., 1994; Wind y cols. 1998b). El dominio A (del aminoácido 1 al 144, y del aminoácido 206 al 406), tiene una topología TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. En este dominio se localiza la tríada catalítica fundamental para la actividad de cualquier CGTasa, constituida por los residuos Asp230, Glu258 y Asp329. El dominio B (del aminoácido 145 al 205) es un extenso lazo entre la tercera cadena  $\beta$  y la tercera  $\alpha$ -hélice del dominio A siendo un estructura secundaria muy pequeña, que interrumpe el dominio A. Los otros tres dominios tienen estructura de cadena  $\beta$ . El dominio C (del aminoácido 407 al 495) se dispone tras la finalización del tonel ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> y está formado por 4 cadenas  $\beta$ . El dominio D (del aminoácido 496 al 580) es una gran cadena  $\beta$ , y el dominio E (del aminoácido 581 al 683) está compuesto de dos cadenas  $\beta$  (ver Fig. I.6). Las funciones de cada uno de estos dominios son las siguientes: los dominios A y el B contienen el centro activo con la tríada catalítica, el eje de ciclación, así como los residuos que contribuyen a la unión del sustrato al sitio catalítico. Las funciones de los dominios C y D no se conocen con certeza. Por último, el dominio E está involucrado en la unión del almidón a la CGTasa. Para ser exactos se han descrito en este dominio dos sitios de unión de maltosa. El primero de ellos se encarga de unir el almidón, y el otro de guiar y orientar la cadena de almidón hacia el centro activo (Fig. I.7 y I.8).

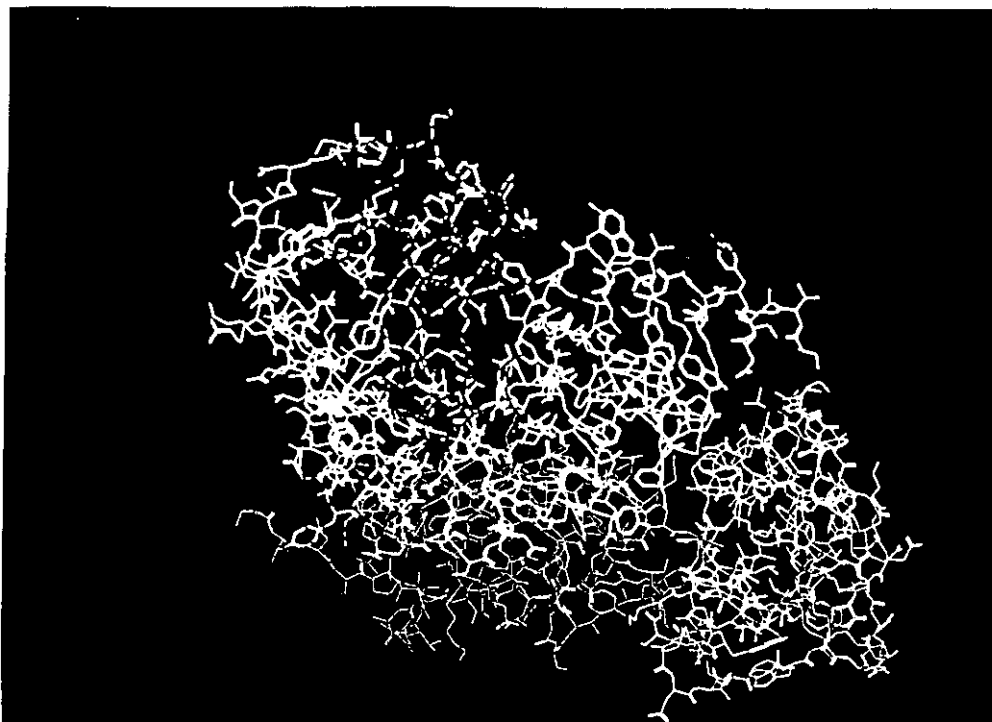
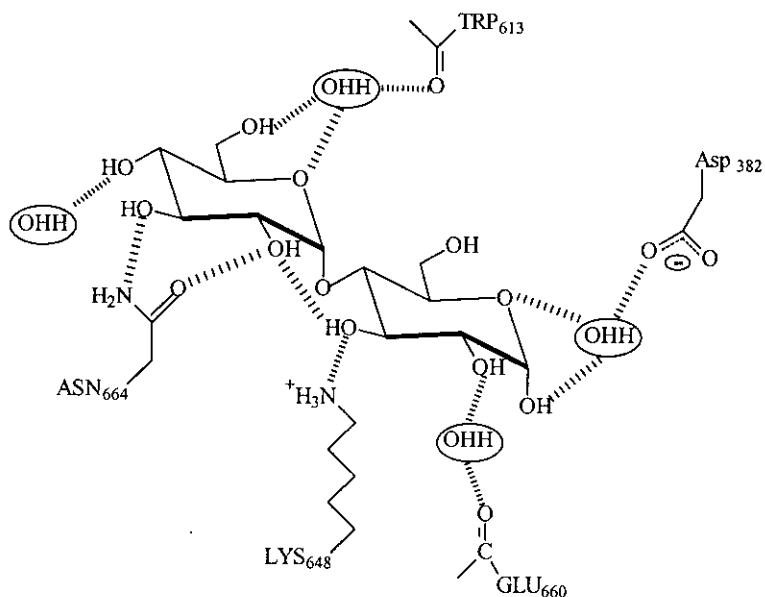
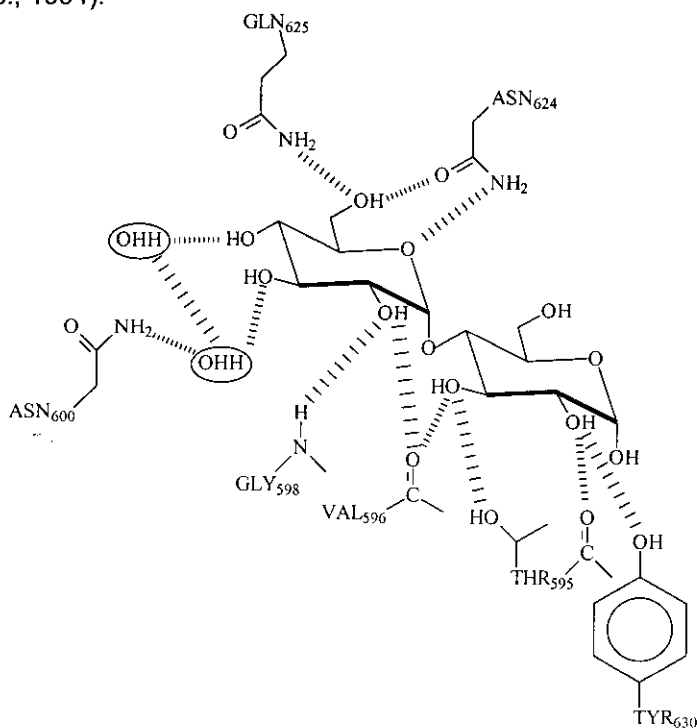


Figura I.6. Los cinco dominios de la CGTasa. En color rojo (aminoácidos 1-144) y blanco (aminoácidos 206-406), el dominio A; el dominio B en color verde; el dominio C en color azul; el dominio D en color rosa; el dominio E en color amarillo. Estructura tridimensional procesada con el programa de simulación molecular WebLab ViewerLite 3.10 (MSI).



**Figura I.7.** En el primer sitio de unión de maltosa los dos anillos de glucosa establecen contactos hidrófobos con las cadenas laterales del Trp613 y el Trp659. Existen tres puentes de hidrógeno directos con la proteína en los que participan la Asn664 y la Lys648. Además, este sitio de unión tiene tres moléculas de agua que forman puentes de hidrógeno entre la proteína y la maltosa (Lawson y cols., 1992; Lawson y cols., 1994).



**Figura I.8.** En el segundo sitio de unión de maltosa, el azúcar está dispuesto con su extremo reductor sobre el anillo aromático de la Tyr630. En los puentes de hidrógeno participan: la Thr595 y el oxígeno de la unión peptídica, así como los aminoácidos Val596, Gly598, Asn624, y Gln625. Se aprecian dos moléculas de agua formando puentes de hidrógeno, una de las cuales lo crea de manera indirecta empleando para ello la Asn600 (Lawson y cols., 1992; Lawson y cols., 1994).

## 2.6.2 EL SITIO DE UNIÓN DE ALMIDÓN

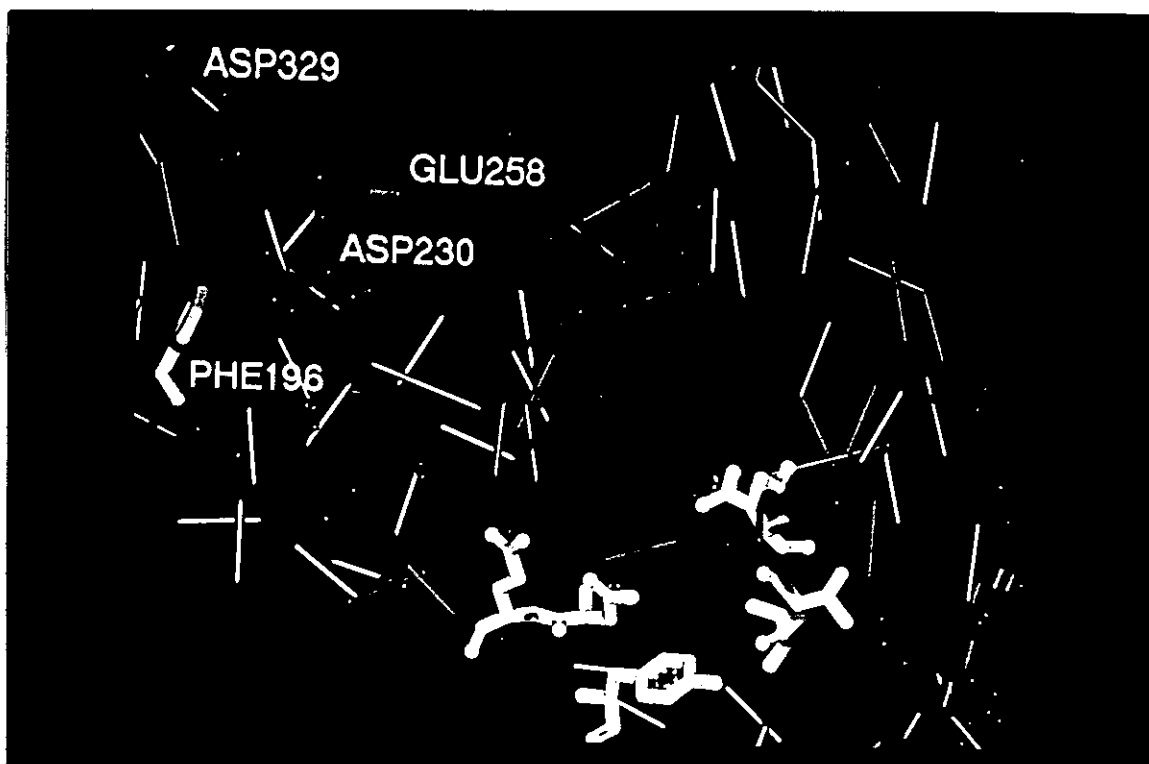
Los dos sitios de unión de maltosa forman parte de una estructura superior, el sitio de unión de almidón, que se localiza en una zona alejada del centro activo. Dicha región, comprende una limitada secuencia de gran homología en toda la familia  $\alpha$ -amilasa (Svensson y cols., 1989; Dalmia y cols., 1995). Está constituida por 95 residuos, localizados en el dominio E, de los cuales 11 son estrictamente conservados:

Thr 595 Gly 598 Gly 605 Leu 610 Gly 611 Trp 613 Pro 631 Trp 633 Lys 648 Trp 659 Asn 664

Cuatro de los 11 residuos estrictamente conservados del sitio de unión de almidón (Trp613, Lys648, Trp659 y Asn664) forman parte del primer sitio de unión de maltosa, mientras que Thr595, Gly598 y Trp633 son parte del segundo sitio de unión de maltosa. Los residuos estrictamente conservados restantes (Gly605, Leu610, Gly611 y Pro631) no se encuentran directamente involucrados en la unión de maltodextrinas, pero probablemente sean necesarios como soporte estructural del dominio de unión de almidón.

Los estudios de modelado molecular sugieren que la cadena de amilosa puede disponerse en una extensa conformación en cinta interaccionando con ambos sitios de unión de maltosa (Dijkhuizen y cols., 1995). Además, mediante estudios cristalográficos adicionales, se ha descubierto la existencia de un largo canal, que enlaza el centro activo con el sitio de unión de almidón, y en el que se pueden acomodar de 9 a 10 residuos de glucopiranosas.

En resumen, la unión del almidón se produce en una región alejada del centro activo: el sitio de unión de almidón, en el que participan dos sitios de unión de maltosa (Fig. I.9). La cadena de almidón, unida en su región específica, se conecta con el centro activo a través de un largo canal (Lawson y cols., 1994).



**Figura I.9.** Disposición de los sitios de unión de maltosa con respecto al centro activo de la CGTasa (Asp329, Glu258, Asp 230, Phe196). En verde, el primer sitio de unión, y en blanco el segundo. Estructura tridimensional procesada con el programa de simulación molecular WebLab ViewerLite 3.10 (MSI).

### 2.6.3 EL CENTRO ACTIVO

#### *La tríada catalítica y los subsitios de unión del sustrato*

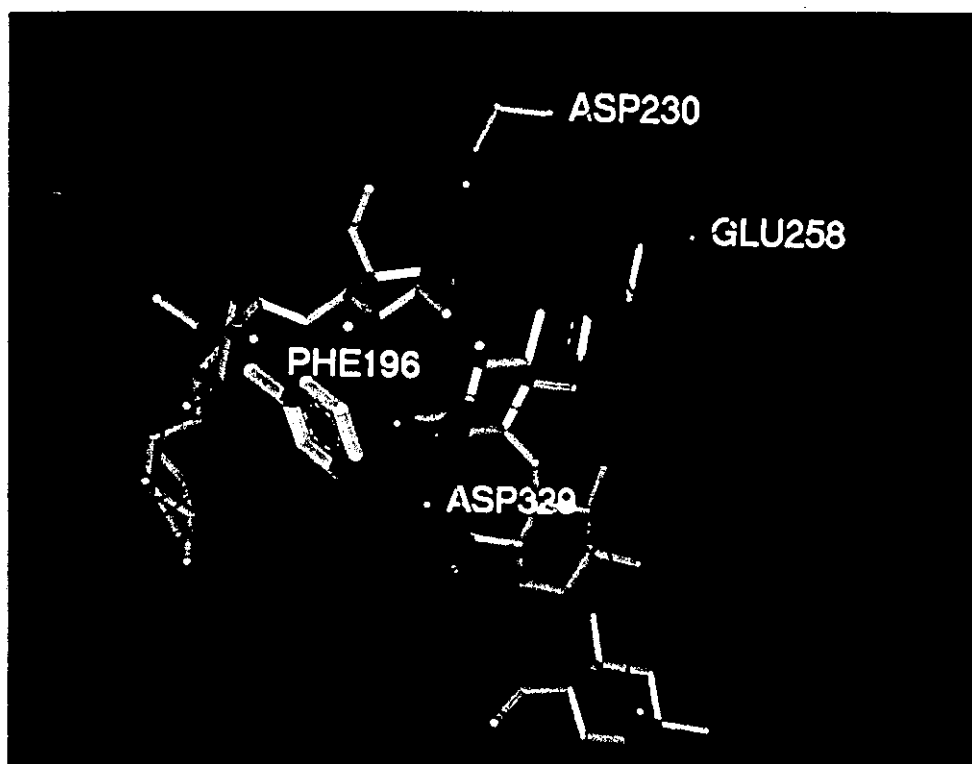
El centro activo de la CGTasa está compuesto por tres residuos ácidos: Asp230, Glu258 y Asp329. Esta tríada catalítica está localizada en el fondo de una cavidad situada al final de la estructura TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, en el dominio A. El Glu258 está rodeado por la mayoría de los residuos hidrófobos del centro activo (Tyr260, Phe284, y Leu282), mientras que el Asp329 y el Asp230 se encuentran en un ambiente más polar (Klein y cols., 1992; Lawson y cols., 1994).

El sustrato se ensambla en el centro activo de la enzima mediante 7 subsitios (denominados desde el extremo reductor al no reductor de la cadena de amilosa como 2', 1', 1, 2, 3, 4, 5) (Klein y cols., 1992; Nakamura y cols., 1994b). Cada residuo de glucosa del sustrato polimérico se une a su subsitio con una alta especificidad. Las interacciones de los residuos de glucosa con cada subsitio pueden ser de tres tipos: puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o interacciones hidrofóbicas, estas últimas producidas por el desplazamiento de moléculas de agua que se encontraban unidas al centro activo en ausencia de sustrato (Knegtel y cols., 1995).

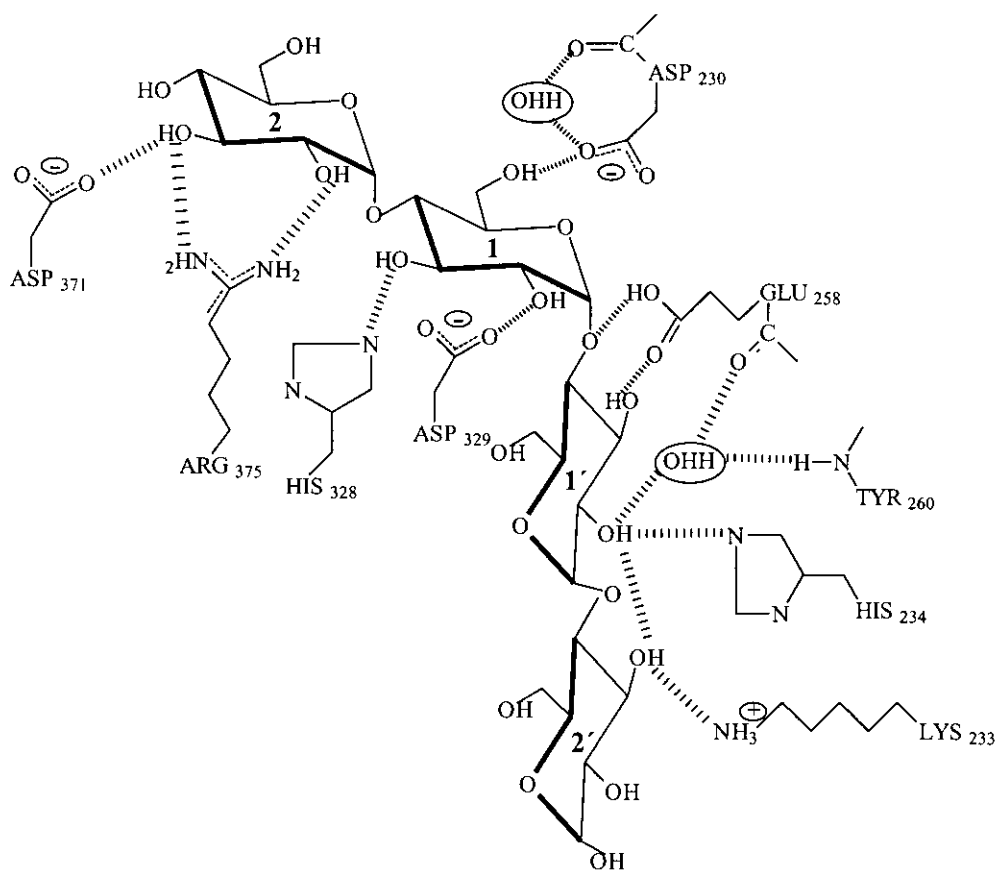
### *La acción de la tríada catalítica*

En la CGTasa nativa existe un fuerte puente de hidrógeno (2.5 Å) entre los grupos Glu258 y Asp329, indicando que uno de los dos carboxilatos está protonado, probablemente el Glu258. Cuando la amilosa se une al centro activo, el Asp329 se mueve hacia el azúcar y se forma un puente de hidrógeno entre la cadena lateral del Asp329 y el hidroxilo del C2 de la glucosa del subsitio 1. Por lo tanto, el puente de hidrógeno entre el Asp329 y el Glu258 se rompe. A continuación, la cadena lateral del Glu258 se desplaza hacia una nueva posición, estableciendo un puente de hidrógeno con respecto al oxígeno de la unión glicosídica entre los residuos de los subsitios 1 y 1'. De esta manera, escinde la unión entre ambas glucopiranosas dando comienzo la reacción.

En resumen, el Glu258 es el donador de protones que inicia la reacción. El Asp329 está involucrado en la unión del sustrato. Es muy probable que el Asp329 tenga una función adicional de mantener el grupo carboxilato del Glu258 protonado a valores altos de pH, permitiendo así a la enzima ser activa en medios moderadamente alcalinos. Por último, el Asp230 actúa como base general o nucleófilo y también participa en la unión del sustrato (Strokopytov y cols., 1995).



**Figura I.10.** Acción de la tríada catalítica (en verde) sobre la maltohexaosa (en rosa). Obsérvese la escisión de la unión glicosídica. Estructura tridimensional procesada con el programa de simulación molecular WebLab ViewerLite 3.10 (MSI).



**Figura I.11.** Diferentes contactos de los residuos de amilosa en el centro activo. Subsitio 2: existen interacciones hidrofóbicas con las cadenas laterales de la His99, Tyr101, Trp102 y Leu198. Se forman tres puentes de hidrógeno con el Asp371 y la Arg375. La posición de las cadenas laterales de estos residuos está fijada mediante puentes de hidrógeno con aminoácidos vecinos. Subsitios 1 y 1': las interacciones de los residuos en dichas posiciones juegan un papel clave para explicar la unión y escisión del sustrato. La glucosa del subsitio 1 establece gran cantidad de puentes de hidrógeno con aminoácidos cercanos al centro activo, incluyendo dos de los tres residuos catalíticos (Asp 230 y Asp329). Además, interacciona a través de fuerzas de van der Waals con la His141. La glucosa situada en el subsitio 1' se une al centro activo gracias a los enlaces con la His234 y el Glu258. Por último, la hexosa localizada en el subsitio 2' presenta un puente de hidrógeno con la Lys233 (Strokopytov y cols., 1995; Strokopytov y cols., 1996; Wind y cols., 1998a).

### *El eje de ciclación*

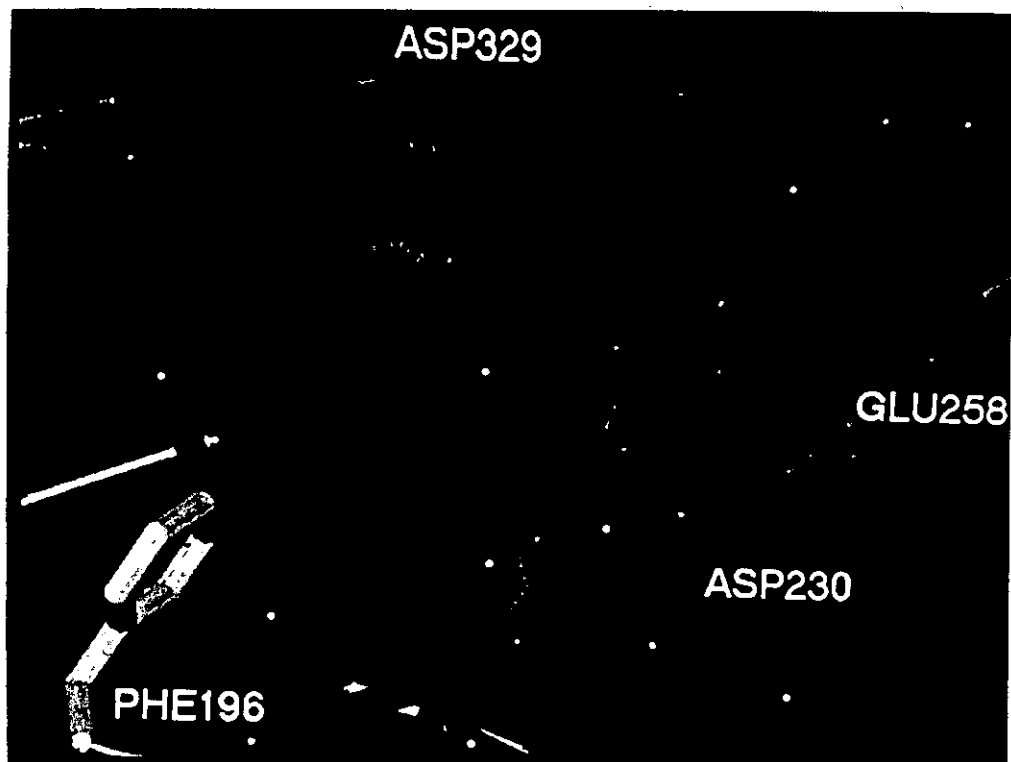
La tríada catalítica del centro activo aparece tanto en las CGTasas como en las  $\alpha$ -amilasas, por lo que la diferencia en el comportamiento de ambas enzimas debe atribuirse a otras circunstancias. Concretamente, el aminoácido aromático Phe196 está presente en una situación dominante en la zona central del sitio activo (ver Fig. I.12), y es el residuo clave que diferencia la actividad CGTasa de la  $\alpha$ -amilasa. Dicha posición se conoce con el nombre de eje



de ciclación (Dijkhuizen y cols., 1995; Pedersen y cols., 1995). Todas las  $\alpha$ -amilasas poseen un pequeño residuo en ese lugar (Gly, Leu, Ser, Thr, Val) en contraste con las CGTasas que tienen un voluminoso residuo aromático en posición equivalente (Tyr o Phe) (ver Tabla I.3) (Wind y cols., 1998b). De esta manera, la actividad de la CGTasa es modulada por el eje de ciclación que interacciona especialmente con sustrato cíclicos (en reacciones de acoplamiento) y con sustratos lineares que van a ser convertidos en productos cíclicos. El tamaño del residuo en la posición 196 es fundamental para la selectividad de la reacción (Nakamura y cols., 1994b). Un claro ejemplo de ello es la CGTasa de *Bacillus subtilis* cepa 313, una CGTasa exclusiva, con un residuo de Leu como eje de ciclación. Se trata de la única  $\gamma$ -CGTasa descrita, que produce  $\gamma$ -ciclodextrina y maltooligosacáridos lineares en la fase inicial de la reacción con almidón. Esta  $\gamma$ -CGTasa, puede ser considerada como el eslabón que permite relacionar filogenéticamente las  $\alpha$ -amilasas con las CGTasas.

**Tabla I.3.** Comparación de los residuos que aparecen en la posición 196 de diferentes CGTasas y  $\alpha$ -amilasas (Peninga y cols., 1995).

TIPO DE ENZIMA	ESPECIE	RESIDUO 196
$\beta$ -CGTasa	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	Phe
	<i>T. termosulfurigenes</i>	Phe
	<i>B. circulans</i> cepa 251	Tyr
	<i>B. circulans</i> cepa 8	Tyr
	<i>B. circulans</i> cepa F-2	Tyr
	<i>Bacillus</i> alcalófilo cepa 17.1	Tyr
	<i>Bacillus</i> alcalófilo cepa 1011	Tyr
	<i>Bacillus</i> alcalófilo cepa 38.2	Tyr
	<i>Bacillus</i> alcalofilo cepa 1-1	Tyr
$\alpha/\beta$ -CGTasa	<i>B. ohbensis</i>	Tyr
	<i>B. licheniformis</i>	Tyr
$\alpha$ -CGTasa	<i>B. macerans</i>	Tyr
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Phe
	<i>B. sterothermophilus</i>	Phe
$\gamma$ -CGTasa	<i>B. subtilis</i> 313	Leu
$\alpha$ -amilasa	Taka amilasa A <i>Aspergillus oryzae</i>	Gly
	$\alpha$ -amilasa de cerdo	Val
	$\alpha$ -amilasa de saliva humana	Ser



**Figura I.12.** El centro activo de la CGTasa. En azul, la tríada catalítica. En amarillo, el eje de ciclación; obsérvese su localización dominante en el centro activo. Estructura tridimensional procesada con el programa de simulación molecular WebLab ViewerLite 3.10 (MSI).

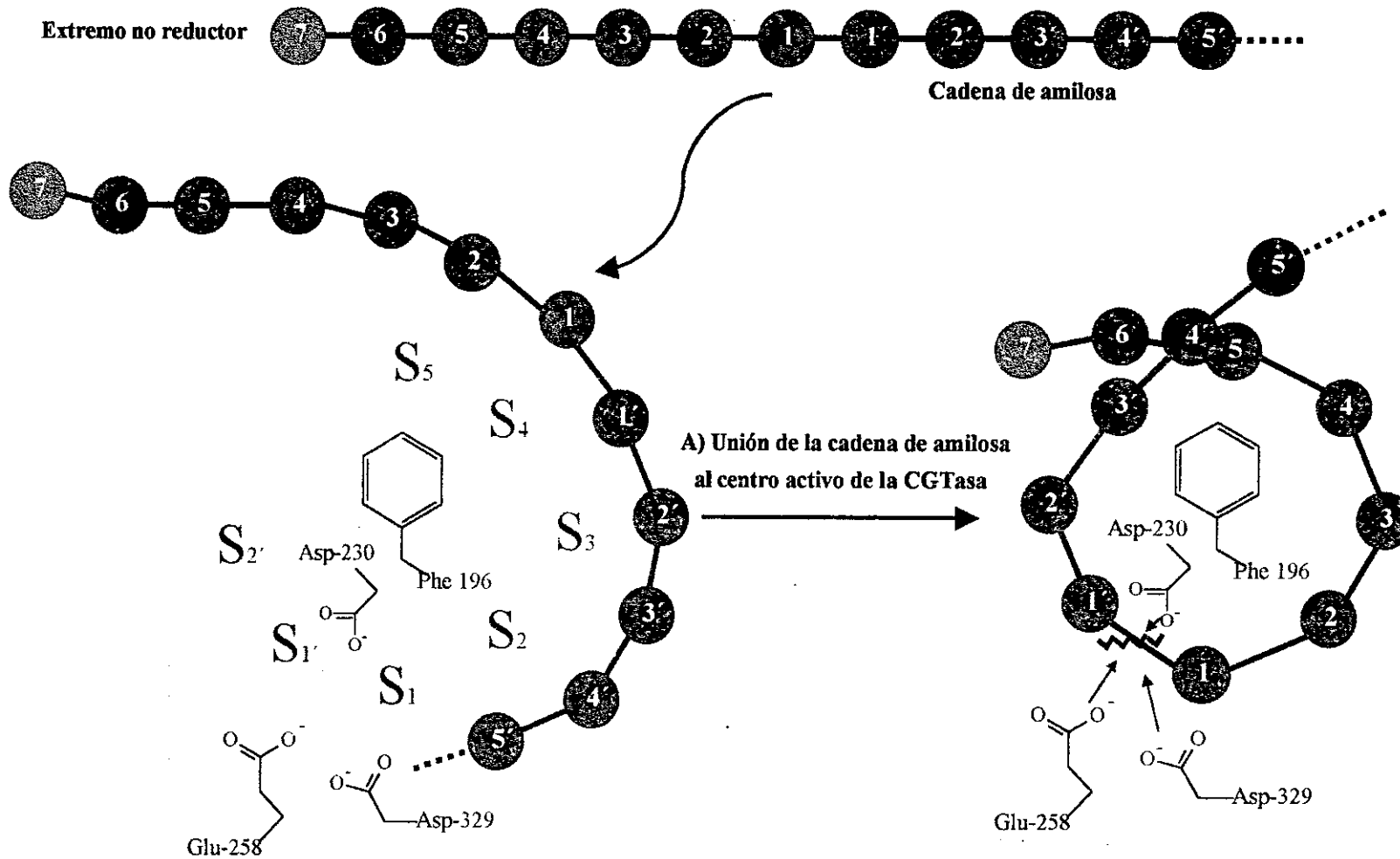
### *El mecanismo de la reacción*

En la Fig. I.13 se representa el mecanismo de acción de la CGTasa para la reacción de ciclación. La cadena de amilosa se une a la CGTasa en forma de espiral, debido a la capacidad de la Phe196 para formar un complejo de inclusión con ella. La CGTasa escinde la unión glicosídica  $\alpha(1\rightarrow4)$  de la amilosa gracias a la acción de la tríada catalítica. La reacción de transglicosilación de la CGTasa opera mediante un mecanismo de *ping-pong bi bi* (Nakamura y cols., 1994a), el cual establece que la transglicosilación ocurre después de que el extremo reductor de la amilosa escindida (donador) ha sido liberado de la enzima. La ciclodextrina se forma cuando el extremo no reductor de la amilosa (aceptor) se sitúa en los subsitios  $S_1'$  y  $S_2'$  (anteriormente ocupados por el extremo reductor de la amilosa) (Nakamura y cols., 1994b).

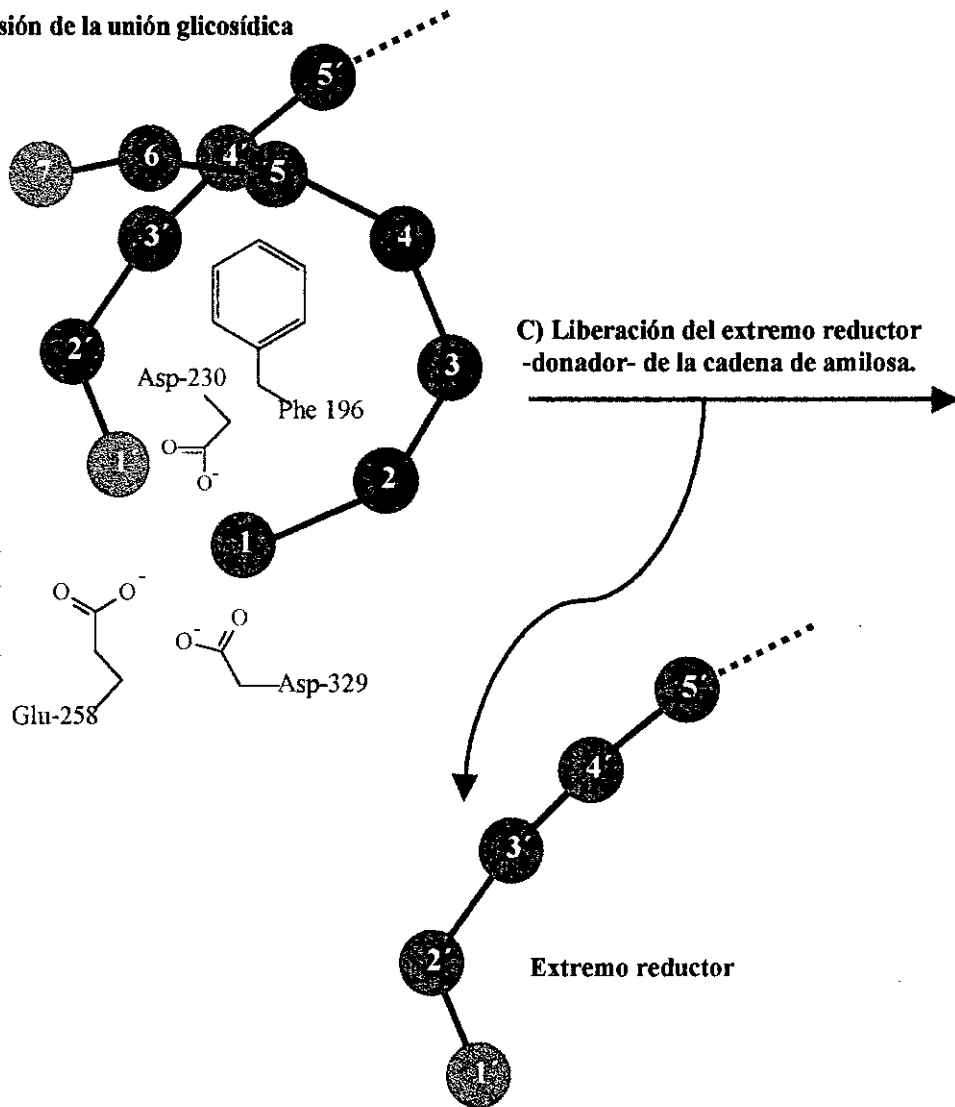
La transglicosilación intermolecular tendrá lugar cuando otro aceptor se una a los subsitios  $S_1'$  y  $S_2'$ . Si el agua actúa como aceptor tendrá lugar la reacción de hidrólisis. Sin embargo, si el aceptor es una cadena de oligosacárido, se producirá la reacción de transferencia.

Por último, la reacción de acoplamiento puede explicarse del siguiente modo. Si en el centro activo se acomoda una ciclodextrina, se producirá la ruptura de ésta mediante el ataque de la tríada catalítica, abriendo la molécula. A continuación, se unirá a los subsitios  $S_1'$  y  $S_2'$  un maltooligosacárido, liberándose como producto final una cadena de dextrina con mayor unidades de glucosa que la ciclodextrina de partida.

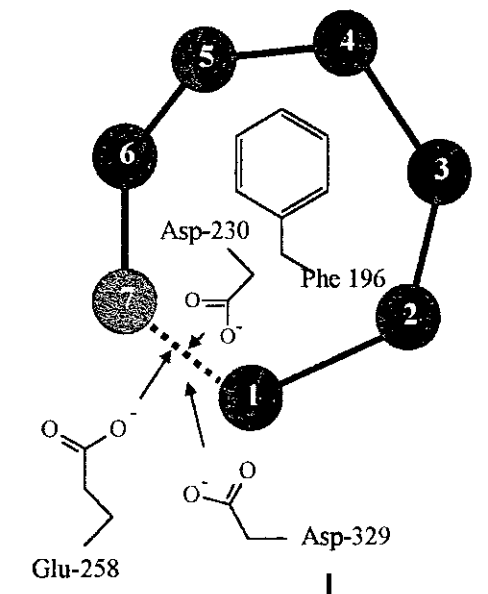
Figura I.13. Mecanismo de acción de la CGTasa



**B) Escisión de la unión glicosídica**



**D) Unión del extremo no reductor -aceptor- de la cadena de amilosa al centro activo.**



## 2.7 ESTRUCTURA-FUNCION EN CGTasas. ESTUDIOS DE MUTAGENESIS DIRIGIDA Y MODIFICACION QUIMICA

En los últimos años, se ha realizado un enorme esfuerzo en lo que se refiere a mutagénesis dirigida de la CGTasa, con el propósito de conocer el mecanismo de acción de esta enzima e intentar conseguir biocatalizadores con selectividades hacia una ciclodextrina determinada, o reducir ciertas reacciones laterales (especialmente el acoplamiento). Por ello, se han mutado los residuos de la tríada catalítica (Strokopytov y cols., 1995), el eje de ciclación, así como cadenas laterales aromáticas en posiciones cercanas al centro activo o a la región de unión de almidón (Nakamura y cols., 1994). Se ha estudiado el comportamiento de la enzima modificada genéticamente en presencia de determinados sustratos o inhibidores:  $\alpha$ -ciclodextrina (Lawson y cols., 1992), acarbosa (Strokopytov y cols., 1995), maltohexaosa (Strokopytov y cols., 1996) maltoheptaosa (Knegtel y cols., 1995), etc. La finalidad de estas investigaciones es conocer las interacciones que se producen entre el sustrato o inhibidor y la enzima, apoyándose en algunos casos en datos de cristalografía de rayos X del complejo enzimático formado.

Otra herramienta importante que se empezó a desarrollar hace bastantes años para llevar a cabo estudios estructura-función, y en ocasiones para obtener preparaciones con mejores propiedades que la enzima nativa, es la modificación química de proteínas (Means y Feeney, 1971; Zeffren y Hall, 1973; Glazer y cols., 1975; Lundblad, 1991). Probablemente, el principal objetivo de la mayoría de los experimentos de modificación química es identificar aminoácidos que estén involucrados en la actividad enzimática. En general, estos residuos contienen cadenas laterales con grupos funcionales que participan en la reacción mediante la formación o ruptura de uniones. Además, se debe incluir dentro del grupo de aminoácidos implicados en la catálisis, no sólo aquellos que participan directamente en la reacción (formando parte del centro activo), sino también los que intervienen en la unión del sustrato a la proteína. Al tratarse de una metodología tan general, se pueden obtener informaciones globales acerca de qué tipo de residuos están implicados en la catálisis o en una determinada propiedad del biocatalizador, para posteriormente aplicar las tecnologías de mutagénesis y cristalografía consiguiendo resultados muy interesantes. Los estudios de modificación química de CGTasas se han centrado principalmente en los residuos de triptófano (Ohnishi y cols., 1994a ; Ohnishi y cols., 1994b), histidina (Jeang y Lin, 1994; Villette y cols., 1992), tirosina (Villette y cols., 1993), arginina ( Mattson y cols., 1992), y más recientemente cisteína (Alcalde y cols., 1996), lisina (Alcalde y cols., 1996, Alcalde y cols., 1999), glutámico y aspártico (Alcalde y cols., 1998a).

## 2.8 CGTasa DE *Thermoanaerobacter* sp.

En 1985 uno de los grupos de investigación de la empresa Novo Nordisk aisló una enzima procedente de especies de *Thermoanaerobacter*, microorganismos anaeróbicos termófilos, que degradaba el almidón y era estable a altas temperaturas y bajos valores de pH. Al principio pensaron que la enzima era una  $\alpha$ -amilasa, debido a su rapidez y efectividad en la licuefacción del almidón. Sin embargo, cuando examinaron los carbohidratos producidos a partir del almidón hidrolizado pudieron ver que se trataba sin duda alguna de una CGTasa. Los principales productos de la reacción eran  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina y no había restos de oligosacáridos de bajo peso molecular en las fases iniciales de la digestión. (Starnes y Katkocin, 1990a; Norman y Jorgensen, 1992).

### 2.8.1 PROPIEDADES DE LA ENZIMA

La CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. es una proteína monomérica de 683 aminoácidos con una masa molecular de 75.5 kDa. Está precedida por un péptido señal de 27 aminoácidos. La similitud en la secuencia de aminoácidos con respecto a las CGTasas del género *Bacillus* es del 58%.

Su temperatura óptima es de 90-95°C a pH 5.8, reteniendo el 95-100% de su actividad cuando se incubaba a 75°C sin sustrato durante 60 min. Además, es suficientemente estable a 105°C en presencia de almidón, para emplearla en procesos industriales de licuefacción. Esta CGTasa puede convertir alrededor del 20% de una dispersión de almidón al 25% (p/v) en ciclodextrinas. La enzima conserva más del 80% de su actividad en el intervalo de pH 5.0-6.7. El gen de *Thermoanaerobacter* sp. ha sido transferido a un huésped de *Bacillus* y la CGTasa es hoy en día un producto comercial (Norman y Jorgensen, 1992; Pedersen y cols., 1995).

Por último, añadir que su secuencia de aminoácidos ha sido recientemente patentada, siendo muy parecida a la de la CGTasa de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (91% de homología), al igual que sus propiedades (Wind y cols., 1995).

### 2.8.2 CGTasa DE *Thermoanaerobacter* sp. COMO ENZIMA ALIMENTARIA

Las enzimas alimentarias procedentes de microorganismos genéticamente modificados han sido empleadas comercialmente durante muchos años. Ejemplos de ello son la amilasa maltogénica para la producción de jarabes de maltosa, la lipasa de *Mucor miehei* para la interesterificación de grasas, y la acetolactato descarboxilasa para la maduración de la cerveza.

Todas las enzimas que normalmente se utilizan en procesos alimentarios deben ser seguras para el consumo. Esto quiere decir que la enzima, tanto en su forma activa como en la inactiva, no debe ser causa en ningún caso de reacciones toxicológicas en humanos.

Las enzimas alimentarias son producidas mediante el cultivo puro de cepas, cuidadosamente seleccionadas, de microorganismos que sean capaces de crecer sobre sustancias naturales esterilizadas actuando como fuente de energía. Tanto las condiciones de fermentación como las condiciones de recuperación de las enzimas deben ser meticulosamente controladas para asegurar que los requisitos de la GMP (*good manufacturing practice*) se cumplan durante su producción. El producto final debe reunir todos los criterios establecidos por la FAO/WHO, el comité experto sobre aditivos alimentarios (JECFA, *Joint Expert Committee on Food Additives*) y el código de química alimentaria (FCC, *Food Chemicals Codex*).

La JECFA clasifica las enzimas alimentarias de origen microbiano en tres clases de acuerdo con el tipo de organismo del que proceden y su uso tradicional. La mayor parte de las enzimas producidas industrialmente suelen pertenecer a la clase B (es el caso de la CGTasa y de la dextranasa), que se define como: “enzimas derivadas de microorganismos no patógenos comúnmente encontrados como contaminantes de los alimentos. Estas enzimas son consideradas alimentarias siempre y cuando se establezcan las especificaciones químicas y microbiológicas oportunas y se realicen cortos estudios que aseguren la ausencia de toxicidad. Cada preparación es evaluada individualmente y debe establecerse un consumo diario aceptable”.

La CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. fue introducida en 1996 por Novo Nordisk como enzima alimentaria debido a sus peculiares propiedades. La enzima se incluyó en la lista de sustancias GRAS (*generally recognize as safe*). Al reunir todos los requisitos establecidos por la GMP, fue admitida como segura para su uso en la producción de ciclodextrinas (Pedersen y cols., 1995).

### **2.8.3 VENTAJAS DEL EMPLEO INDUSTRIAL DE LA CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. COMO ENZIMA TERMOESTABLE. PRINCIPALES APLICACIONES**

Muchas de las enzimas recientemente descubiertas poseen termoestabilidades superiores a las enzimas tradicionales. El interés que existe en enzimas termoestables crece día a día, debido al hecho de que la mayoría de las enzimas involucradas en procesos industriales trabajan a temperaturas elevadas. Su principal ventaja se relaciona con que, en la mayoría de los casos, a medida que se incrementa la temperatura del proceso, aumenta el rendimiento de la reacción.

Por otro lado, las altas temperaturas inhiben el crecimiento microbiano, siendo menor el riesgo de contaminación. Otra virtud del empleo de altas temperaturas en la industria es que se favorece el mezclado y la solubilización de los productos, disminuyendo la viscosidad y permitiendo trabajar a elevadas concentraciones de reactivos (Zamost y cols., 1991). El manejo de enzimas termoestables se ha incrementado en los últimos años, gracias a la capacidad de clonar los genes de los microorganismos termófilos en cepas mesófilas.

La suma de todos estos factores ha conducido a disponer de una amplia variedad de enzimas termoestables que están reemplazando paulatinamente a las enzimas termolábiles. Por ejemplo, las amilasas termoestables de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus stearothermophilus* han reemplazado a las amilasas termolábiles de *Bacillus subtilis*.

Desde un punto de vista estructural, las principales diferencias entre las enzimas procedentes de fuentes termófilas y mesófilas aparecen en la superficie de estas proteínas. Las enzimas termoestables contienen menos lazos flexibles, tienen mayor número de puentes salinos, puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas. Todo ello hace que la proteína sea más rígida que su homóloga mesófila. Esta rigidez explica la baja eficacia catalítica de las enzimas termoestables a temperatura ambiente, ya que sólo alcanzarán la flexibilidad requerida para la catálisis a elevadas temperaturas (Knegtel y cols., 1996).

La CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. muestra la termoestabilidad más alta descrita para cualquier CGTasa hasta el momento. Posee una temperatura óptima de 95°C, más elevada que la de la CGTasa de *B. stearothermophilus* (70°C), o la de *T. thermosulfurigenes* (85°C). Esta excepcional resistencia térmica la confieren numerosas aplicaciones industriales, que pueden revolucionar las metodologías tradicionales, especialmente en los campos de licuefacción del almidón y producción de ciclodextrinas.

### ***Licuefacción del almidón empleando CGTasa de Thermoanaerobacter sp.***

La producción de jarabes de alto contenido en fructosa a partir de almidón, requiere de tres pasos denominados licuefacción, sacarificación e isomerización.

La industria del almidón ha adoptado unas condiciones estándar de licuefacción en dos etapas consecutivas. La primera de ellas constituye la llamada gelatinización o licuefacción primaria de una pasta de almidón al 35-40% (p/v) a 105°C durante 5 min. A continuación tiene lugar la segunda fase conocida como dextrinización o licuefacción secundaria, en la que la mezcla se somete a temperaturas de 95°C durante 90 min (Starnes y cols., 1991). La licuefacción es generalmente llevada a cabo por una  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* o *B. stearothermophilus* a pH 6.0-6.5. A continuación se realiza la sacarificación a pH de 4.5 catalizada por una amilogucosidasa, dando lugar a jarabes de alto contenido en glucosa.



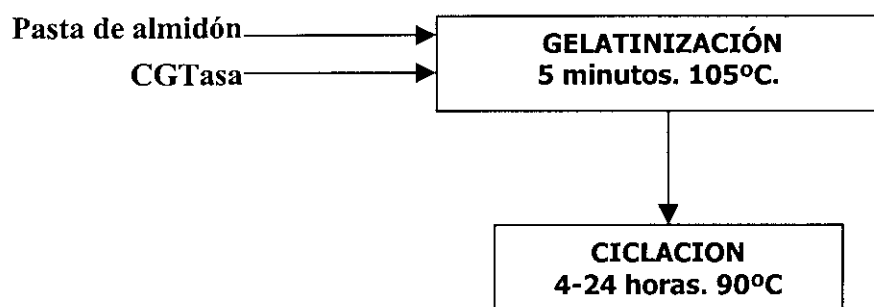
Como resultado de estas incompatibilidades de pH, la industria del almidón ha realizado una extensa búsqueda de enzimas que licúen el almidón y que sean a su vez capaces de operar en el mismo valor de pH de la posterior sacarificación para, de este modo, eliminar la necesidad de ajustar el pH del almidón sucesivas veces (Norman y Jorgensen, 1992). Actualmente se están empezando a desarrollar estudios de la aplicación de CGTasas en la licuefacción del almidón, como alternativa al empleo de las  $\alpha$ -amilasas. De los microorganismos conocidos como productores de CGTasas ninguno de ellos es suficientemente termoestable para su utilización en la industria de la licuefacción del almidón, a excepción de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. Esta propiedad, unida a su excelente actividad a bajos valores de pH, permite la licuefacción del almidón a pH 4.5, por lo que se puede realizar la sacarificación consecutivamente, eliminando de este modo la necesidad de un ajuste de pH (además, el almidón procedente de procesos de molido-húmedo tiene un pH de 4-5, por lo que es necesario ajustarlo a 6.0 para que la  $\alpha$ -amilasa trabaje en la licuefacción, pero utilizando la CGTasa tan sólo es necesario un leve ajuste de pH a 4.5). En definitiva, los ajustes de pH serán mucho menores que en el caso de las  $\alpha$ -amilasas, con el consiguiente ahorro en el empleo de ácidos o bases. Por otro lado, el bajo nivel de sales generadas por los ajustes de pH reducen la necesidad de emplear agentes químicos e iones de intercambio en la purificación del jarabe. Por último, se evita la formación de compuestos coloreados y subproductos no deseables, como la maltulosa, que contaminan el jarabe (Nielsen, 1991).

Si después de este tratamiento, el almidón se enfría a 60°C y se le añade una amiloglucosidasa durante 48 h, se produce glucosa con un rendimiento similar al que se obtiene comercialmente empleando  $\alpha$ -amilasas para la licuefacción del almidón (Zamost y cols., 1991). En cualquier caso, en los procesos de licuefacción industrial se requiere gran cantidad de enzima. Las bacterias termofílicas son pobres productores de enzimas. Por consiguiente es necesario clonar el gen de la CGTasa dentro de un huésped apropiado para producir la suficiente enzima (Pedersen y cols., 1995).

### ***Producción de ciclodextrinas***

Las ciclodextrinas fueron por primera vez sintetizadas a escala industrial en 1976. El método tradicional de producción incluía tres pasos: 1) licuefacción del almidón, 2) formación de ciclodextrinas a partir del almidón licuado, 3) separación y purificación de las ciclodextrinas (Su y Yang, 1990). El proceso clásico descrito por Tilden y Hudson, emplea la CGTasa de *Bacillus macerans* para sintetizar estos azúcares cíclicos. Sin embargo, esta CGTasa no es capaz de licuar el almidón a alta temperatura, lo que se traduce en una serie de inconvenientes. En primer lugar, el almidón debe ser solubilizado mediante un pretratamiento con una  $\alpha$ -amilasa. Después de

esta licuefacción, la  $\alpha$ -amilasa debe ser inactivada para obtener buenos rendimientos de ciclodextrinas. Además, la CGTasa de *B. macerans* no es suficientemente termoestable para ser empleada a altas temperaturas. Consecuentemente, la conversión de almidón a ciclodextrinas requiere un amplio tiempo de reacción antes de que se alcancen rendimientos aceptables. Por último, la contaminación microbiana puede suponer un problema añadido (Zamost y cols., 1991). La utilización de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. en la producción de ciclodextrinas solventa la mayoría de estas dificultades. Al tratarse de una enzima termoestable, permite la integración en un solo paso de la licuefacción del almidón más la conversión del almidón licuado en ciclodextrinas. En definitiva, se elimina una etapa de la reacción -el tratamiento previo a la adición de la CGTasa, con  $\alpha$ -amilasas, para hidrolizar el almidón parcialmente-. Además, la alta termoestabilidad permite tiempos de producción de ciclodextrinas muy cortos, lo que significa mayores rendimientos que los obtenidos por la CGTasa de *B. macerans*. El tiempo de reacción de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. es menor que el de cualquier CGTasa termolábil (Starnes y cols., 1990a; Nielsen, 1991; Pedersen y cols., 1995).



**Figura I.14.** Esquema del proceso de producción de ciclodextrinas con la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp.

### 3. LAS DEXTRANSACARASAS

#### 3.1 GLUCANSACARASAS Y DEXTRANOS QUE PRODUCEN

Las glucansacararasas son un grupo de enzimas, sintetizadas por la familia Lactobacillaceae, que catalizan la síntesis de glucanos con diferentes estructuras a partir de sacarosa (Sidebotham, 1974). Los glucanos que tienen la cadena principal constituida por uniones  $\alpha(1\rightarrow6)$  entre glucosas se conocen como dextranos, y las enzimas que los sintetizan se llaman dextransacararasas (EC 2.4.1.5). Las dextransacararasas son enzimas inducibles, extracelulares, producidas por bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. De las tres especies del género

*Leuconostoc* (*L. mesenteroides*, *L. dextranicum* y *L. citrovorum*) la última no produce dextranosa (Miller y Robyt, 1984; Pennell y Barker, 1992). Los dextranos se diferencian unos de otros dependiendo del tipo de unión que presenten en sus puntos de ramificación  $\alpha(1\rightarrow2)$ ,  $\alpha(1\rightarrow3)$ , ó  $\alpha(1\rightarrow4)$ -, del porcentaje de dichas ramificaciones y de su disposición en la cadena.

**Tabla I.4.** Especies de bacterias que sintetizan dextranos (Sidebotham, 1974).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>L. acidophilus</i>		<i>S. bovis</i>
<i>L. brevis</i>		<i>S. challis</i>
<i>L. casei</i>	<i>L. dextranicum</i>	<i>S. faecalis</i>
<i>L. musicus</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>S. mitis</i>
<i>L. pastorianus</i>		<i>S. mutants</i>
<i>L. viridescens</i>		<i>S. sanguis</i>
		<i>S. viridans</i>

Existen glucanos que no encajan dentro de la definición de dextrano. En concreto hay glucanos que tienen uniones  $\alpha(1\rightarrow3)$  en la cadena principal y glucanos que alternan las uniones  $\alpha(1\rightarrow6)$  y  $\alpha(1\rightarrow3)$  en la cadena principal.

La bacteria *Leuconostoc mesenteroides* B-512F produce un sólo tipo de dextrano que tiene 95% de uniones  $\alpha(1\rightarrow6)$  en la cadena principal y 5% de puntos de ramificación  $\alpha(1\rightarrow3)$ . Las ramas de dicha especie pueden ser de dos tipos: simples unidades de glucosa (la mayoría de las veces), o cadenas relativamente largas con enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  -de 2 a 50 residuos glucosilo- unidas a la estructura principal mediante el punto de ramificación  $\alpha(1\rightarrow3)$ . Otros dextranos contienen un porcentaje mucho más alto de puntos de ramificación  $\alpha(1\rightarrow3)$ . Por ejemplo, el dextrano S (soluble) de *Leuconostoc mesenteroides* B-742 tiene 50% de uniones  $\alpha(1\rightarrow6)$  en la cadena principal y 50% de puntos de ramificación  $\alpha(1\rightarrow3)$ , de los cuales la mayoría son residuos de glucosa. Este caso representa el más alto grado de ramificación que puede tener un dextrano. La estructura resultante es una especie de peine bifurcado, en el que cada una de las glucosas enlazadas a la cadena principal mediante uniones  $\alpha(1\rightarrow3)$  constituirían los “dientes” del peine y la cadena principal sería el “eje” de dicho peine (ver Fig. I.15). Los dextranos de este tipo son altamente resistentes a la hidrólisis por endo-dextranasas. *Leuconostoc mesenteroides* B-742 también produce otro dextrano que tiene un 7% de puntos de ramificación  $\alpha(1\rightarrow4)$  en vez de los frecuentes  $\alpha(1\rightarrow3)$ . *Streptococcus mutants* 6715 elabora dos tipos distintos de glucansacarasa: una de ellas es una dextranosa (a veces llamada glucosiltransferasa-soluble o GTF-S) que sintetiza un dextrano soluble en agua con un 35% de ramas (la mayoría glucosas) unidas a la

cadena principal mediante puntos de ramificación  $\alpha(1\rightarrow3)$ . Este dextrano tiene la particularidad de que el grado de ramificación supone que uno de cada dos residuos de glucosa de la cadena principal contiene ramificación. Como consecuencia de esta distribución uniforme, adquiere forma de peine bifurcado y alterno. Esta estructura también es resistente a la hidrólisis por endodextranasas. La segunda enzima elaborada por *Streptococcus mutans* 6715 sintetiza un glucano insoluble en agua que tiene una cadena principal con uniones  $\alpha(1\rightarrow3)$  en lugar de las clásicas  $\alpha(1\rightarrow6)$ , y obviamente no es un dextrano. Es totalmente resistente a la acción de las endodextranasas, se le denomina glucano-mutante, y a la enzima se le llama mutansacarasa (también a veces llamada glicosiltransferasa insoluble o GTF-I). Por último, *Leuconostoc mesenteroides* B-1355 también elabora dos glucansacarasas: la primera enzima sintetiza un dextrano muy similar en estructura al de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F. La segunda enzima, sin embargo, sintetiza un glucano que presenta una variación en las uniones de la cadena principal. Concretamente alterna consecutivamente uniones  $\alpha(1\rightarrow3)$  con  $\alpha(1\rightarrow6)$ , y presenta un 11% de puntos de ramificación  $\alpha(1\rightarrow3)$ . Este polisacárido tampoco se puede considerar un dextrano. Se le llama alternante y a su enzima alternansacarasa. Los alternantes también son totalmente resistentes a la hidrólisis por endo-dextranasas.

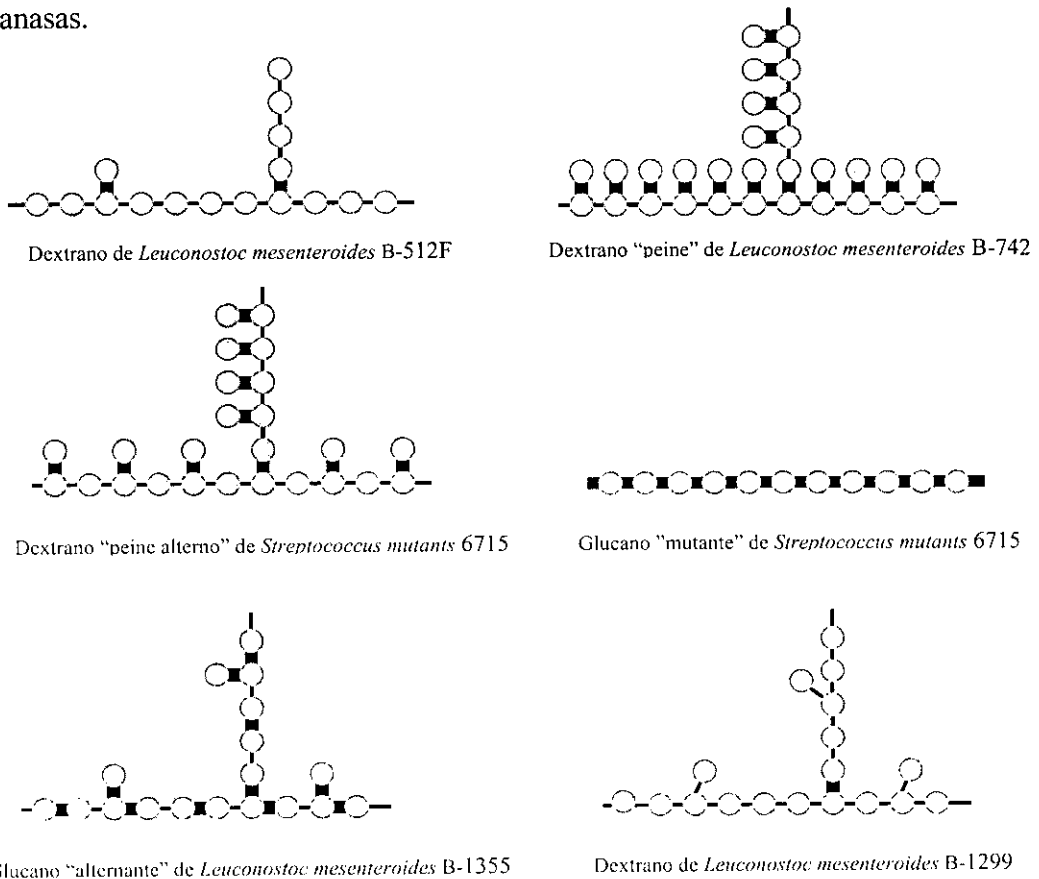


Figura 1.15. Representación esquemática los principales tipos de glucano. Residuo de Glucosa,  $\bigcirc$  ; Enlace  $\alpha(1\rightarrow6)$ , — ; Enlace  $\alpha(1\rightarrow3)$  ■ ; Enlace  $\alpha(1\rightarrow2)$  /

**Tabla I.5.** Principales glucanos sintetizados por glucansacararas (Robyt, 1995).

Especie	% de Unión				
	Cadena principal		Puntos de ramificación		
	$\alpha(1\rightarrow6)$	$\alpha(1\rightarrow3)$	$\alpha(1\rightarrow3)$	$\alpha(1\rightarrow2)$	$\alpha(1\rightarrow4)$
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-512F	95		5		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-742 I	93				7
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-742 II	50		50		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-1299 I	66		1	27	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-1299 II	65			35	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-1355 I	95		5		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-1355 II	54	35	11		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-1191	94		2		4
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-1308	95				5
<i>Streptococcus</i> sp. B-1526	83				17
<i>Streptococcus viridans</i> B-1351	89		11		
<i>Streptococcus mutans</i> 6715 I	65		35		
<i>Streptococcus mutans</i> 6715 II	4	96	2		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-523		100			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B-1149		100			

### 3.2 APLICACIONES DE LOS DEXTRANOS

El mercado de producción de dextrano es de unas 1000 toneladas por año (Monsan, 1990), y el principal dextrano comercializado es el producido por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F por ser no patógeno, altamente soluble y relativamente estable (Soetaert y cols., 1995). Es probablemente el primer biopolímero obtenido a escala industrial por fermentación. En la síntesis de este polisacárido no se requieren ATP o cofactores, ya que toda la energía para llevar a cabo la reacción proviene de la unión que existe entre la fructosa y la glucosa antes de ser escindidas. Los dextranos se obtienen mediante fermentación en un medio rico en sacarosa, produciéndose la secreción inducida de la enzima al medio. El proceso finaliza cuando toda la sacarosa ha sido consumida y el pH del medio alcanza valores próximos a 5.2 (Lazic y cols., 1991; Barker y Ajongwen, 1991; Dols y cols., 1997a; Dols y cols., 1998a).

Los dextranos se llevan produciendo por fermentación desde 1950, en forma de polímeros de elevados pesos moleculares ( $10^6$ - $10^7$ ). Sin embargo, la industria necesita biopolímeros de menor tamaño (40.000 o 70.000 Da), que se pueden obtener por hidrólisis ácida de los dextranos iniciales, seguida de una precipitación con alcohol (Soetaert y cols., 1995).

En lo que respecta a sus aplicaciones, ciertas soluciones de dextrano pueden presentar propiedades osmóticas semejantes a las del plasma sanguíneo, por lo que se emplean para aumentar el volumen sanguíneo en caso de hemorragias (dextranos de peso molecular 70.000) y para regular el torrente sanguíneo (dextrano de 40.000). El dextrano es igualmente útil en sus formas derivadas: el dextrano-sulfato por sus cualidades anticoagulantes y el ferro-dextrano por paliar las deficiencias anémicas. El DEAE-dextrano disminuye los niveles de colesterol en sangre. Por último el dextrano es la base estructural de numerosas matrices de cromatografía, así como un estabilizante de emulsiones fotográficas (Pennell y Barker, 1992)

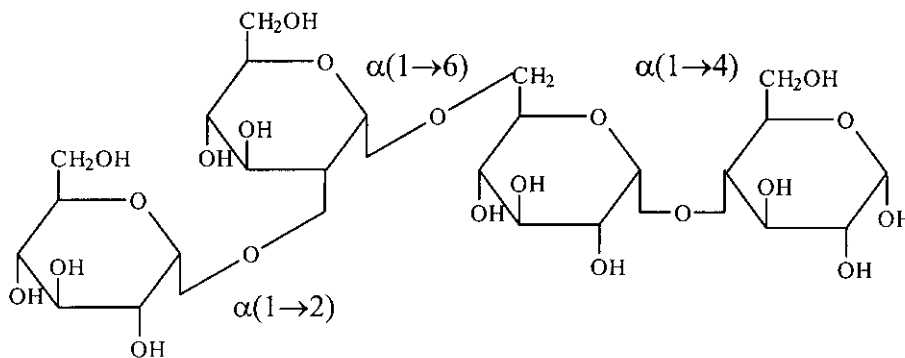
Existen numerosas evidencias que indican que la dieta de sacarosa es el principal agente promotor de la caries dental. La extrema cariogenicidad de la sacarosa se debe a que actúa como sustrato para la síntesis de un elevado número de polisacáridos bacterianos extracelulares, que incluyen los dextranos y los levanos. Por lo tanto, la posibilidad de controlar la síntesis de tales dextranos es un tema de gran interés. Se piensa que el dextrano puede actuar a tres niveles: i) los dextranos promueven la caries ya que facilitan la colonización por parte de las bacterias cariogénicas de la superficie dental (las bacterias lácticas ácidas -esencialmente *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutants*-); ii) son componentes estructurales de la placa dental; iii) son reserva de carbohidratos para las bacterias.

Todo ello ha estimulado la búsqueda de alternativas dirigidas a la disminución de la presencia del dextrano, para lo cual, se hace uso de agentes clínicos que degraden el dextrano o que prevengan su síntesis. Las dextranasas son enzimas que escinden las uniones  $\alpha(1\rightarrow6)$  en los dextranos, y por lo tanto, si se añaden a la comida, actúan como agentes anticaries que rompen las matrices de placas cariogénicas, o previenen la colonización de la superficie dental por parte de las bacterias. De momento estos experimentos están en vía de desarrollo, y se está trabajando in vitro con placas dentales artificiales, así como con animales.

### 3.3 PRODUCCION DE OLIGOSACARIDOS DE INTERES CON DEXTRANSACARASAS

#### *Los glucooligosacáridos*

Los glucooligosacáridos (GOS) son azúcares de pequeña longitud, cuya síntesis es catalizada por la dextransacarasa en presencia de los aceptores adecuados (Remaud y cols., 1991). Dentro de los glucooligosacáridos destacan los producidos por la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-1299, que sintetiza oligosacáridos con uniones  $\alpha(1\rightarrow2)$  mediante la reacción con maltosa como aceptor (Dols y cols, 1997b). Los azúcares obtenidos son  $\alpha$ -glucooligosacáridos con un grado de polimerización de 3 a 10 y finalizados en un residuo maltosilo en el extremo reductor. La cadena lineal esta formada por residuos glucosilo unidos mediante enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  y conteniendo al menos una unión  $\alpha(1\rightarrow2)$  en el extremo no reductor, así como una o dos uniones  $\alpha(1\rightarrow2)$  en los puntos de ramificación, dependiendo del grado de polimerización (Paul y cols., 1992). Estos glucooligosacáridos son altamente resistentes a los enzimas glicolíticos digestivos, lo cual genera una enorme variedad de aplicaciones en la industria alimentaria.



**Figura I.16.** Estructura de un glucooligosacárido ( $2^3$ - $\alpha$ -D-glucopiranosil panosa) producido por la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. La unión  $\alpha(1\rightarrow2)$  del extremo no reductor, le confiere una gran resistencia frente a la acción hidrolítica de las glucoamilasas.

En alimentación humana, los glucooligosacáridos, al no ser absorbidos a través de las microvellosidades intestinales, alcanzarán el colon y podrán interactuar con la microflora bacteriana intestinal. Afortunadamente estos contactos son muy selectivos. Los glucooligosacáridos son específicamente metabolizados por la microflora bacteriana beneficiosa (*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*), favoreciendo el crecimiento de estos microorganismos, sin presentar ningún tipo de interacción con la microflora potencialmente

patógena. Actualmente se está estudiando la posibilidad de promover el crecimiento de las bacterias beneficiosas del intestino de recién nacidos que tengan problemas digestivos (Valette y cols., 1993).

Por otro lado, los glucooligosacáridos son no cariogénicos (no producen caries, porque las enzimas salivares no reconocen la inusual unión  $\alpha(1\rightarrow2)$ ). Además, se consideran productos bajos en calorías porque no son metabolizados (al ser resistentes al ataque de los enzimas digestivos de humanos y animales); por lo que se pueden utilizar como alimentos dietéticos bajos en calorías mezclados con fuertes endulcorantes como el aspartamo (Newsome, 1993; Quirasco y cols., 1995).

En alimentación animal este nuevo tipo de glucooligosacáridos tienen interesantes aplicaciones, especialmente en *Ecological Health Control Product* (E.H.C.P.): en granjas de animales (aves de corral, cerdos, y vacuno) es posible limitar el empleo sistemático de antibióticos sencillamente mediante la adición de glucooligosacáridos como ingredientes de la dieta que equilibren la microflora intestinal. La adición de estos azúcares en los piensos (aproximadamente en una proporción del 1%) supone una significativa mejora en peso diario del animal y estado de salud. Estos productos están evaluándose en varios países (Monsan y Paul, 1995).

También se han desarrollado aplicaciones farmacéuticas (Lamothe y cols., 1991); así, estos azúcares promueven el crecimiento de las bacterias lácticas beneficiosas de la piel, previniéndose de esta forma el desarrollo de microorganismos perjudiciales que puedan inducir problemas dérmicos (acné, irritaciones, etc.). En 1993 la multinacional Merck (concretamente Liphaderm, una filial de Merck) lanzó dos líneas de dermocosméticos con glucooligosacáridos como principios activos.

Actualmente los glucooligosacáridos se sintetizan a escala industrial (40 Tn/año) (Dols y cols., 1998a). Dichas producciones están destinadas a aplicaciones nutricionales y dermocosméticas, y se diseñan empleando reactores continuos de lecho fijo, empaquetados con dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-1299 inmovilizada en bolas de alginato cálcico (Dols y cols., 1998b). Se consiguen conversiones de sacarosa del 100%. Los glucooligosacáridos producidos pueden ser separados eficientemente de la fructosa residual mediante cromatografía empleando resinas de intercambio iónico. El producto final puede ser presentado como un jarabe concentrado o como un spray seco.

### ***La leucrosa***

Otro producto de interés que puede obtenerse con la dextranasa es la leucrosa (5-O-( $\alpha$ -D-glucopiranosil)- $\beta$ -D-fructopiranososa), utilizando fructosa como aceptor (Böker y cols., 1994).

Este disacárido tiene numerosas aplicaciones por ser no cariogénico (ya que las enzimas de la boca humana no son capaces de romper uniones  $\alpha(1\rightarrow5)$ ). Por lo tanto, la leucrosa es



reabsorbida fácilmente y sin ningún tipo de incompatibilidad (aún si se consume diariamente), al ser hidrolizada en glucosa y fructosa por las enzimas del intestino delgado, de la misma manera que hacen con la sacarosa. (Soetaert y cols., 1995).

El proceso industrial de producción de leucrosa se basa en el empleo de reactores continuos de lecho fijo con la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F inmovilizada en bolas de alginato cálcico, obteniéndose conversiones del 90%. La leucrosa sintetizada se separa por cromatografía, se concentra y cristaliza (Reh y cols., 1996).

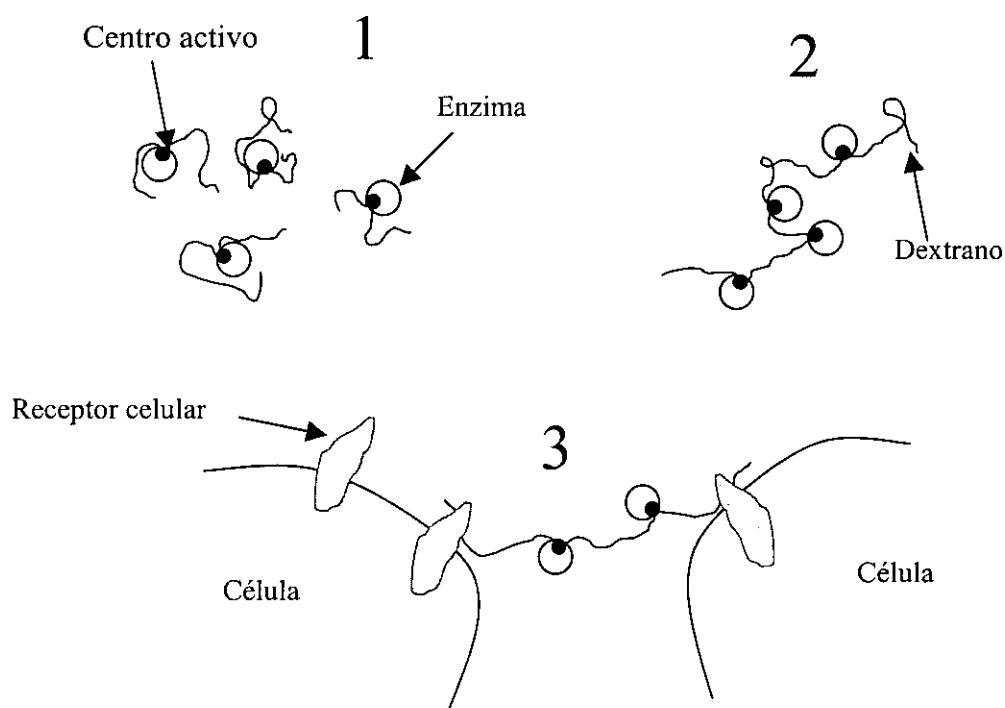
### **3.4 LA DEXTRANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F**

#### **3.4.1 CARACTERISTICAS GENERALES**

*Leuconostoc mesenteroides* es una bacteria láctica heterofermentativa, Gram-positiva, anaeróbica facultativa y cocoide (Kobayashi y Matsuda, 1986). Sin embargo, la principal particularidad de esta especie es que necesita sacarosa en el medio de cultivo para inducir la formación de la enzima, mientras que *Streptococcus* no requiere sacarosa para crear la enzima. Así, las cepas de *Leuconostoc* se consideran inducidas para la formación de las dextransacarasas, y las de *Streptococcus* son constitutivas para la formación de dichas enzimas (Kim y Robyt, 1995a; Dols y cols., 1998c).

Como resultado de la inducción con sacarosa, la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* contiene una gran cantidad de dextrano envolvente, que la permite aparecer de tres formas distintas simultáneamente:

- 1) Asociación enzima-dextrano, en forma de complejo covalente estable dextranosil-enzima (Robyt y cols., 1974).
- 2) Agregados intermoleculares: a partir de una forma enzimática monomérica, pueden ser constituidas estructuras de tamaño superior, mediante la asociación con moléculas de dextrano, y por unión con otras moléculas de enzima (Kobayashi y Matsuda, 1986).
- 3) Asociación célula-dextrano-enzima: ciertas actividades se detectan en la superficie de la bacteria. Se han descrito la existencia de receptores proteicos que fijan el dextrano a la superficie de las células. Esto explica el papel esencial que juega el dextrano en los fenómenos de aglutinación y adherencia celular (Germaine y Schachtele, 1976).



**Figura I.17.** Diferentes complejos dextranosil-enzima. 1) Enzima asociada covalentemente con el dextrano; 2) Agregados intermoleculares. 3) Interacción enzima-dextrano-célula (cohesión celular).

Con el objeto de conocer las características físico-químicas de la enzima, es necesario eliminar la cubierta de dextrano que se encuentra estrechamente asociada a la proteína, y que afecta a sus propiedades. Para ello se hace uso de un complejo sistema de purificación, que incluye una previa incubación con la enzima dextranasa (Robyt y Walseth, 1979; Auriol, 1985; Miller y cols., 1986; Fu y Robyt, 1990). Las soluciones finales obtenidas carecen de dextrano, pero son de difícil manipulación, debido a los agregados multienzimáticos que se forman cuando se ha eliminado el dextrano.

El tamaño de las moléculas de dextranasa, caracterizadas por electroforesis, varía dependiendo del método de purificación seguido. En cualquier caso, parece que el tamaño molecular elemental corresponde a una banda de 65.000 kDa, acompañada de otras de mayor tamaño -cercanas a 200.000-. La formación de agregados, así como la presencia de productos de degradación generados por la acción de proteasas, contaminan la preparación (Willemot, 1993).

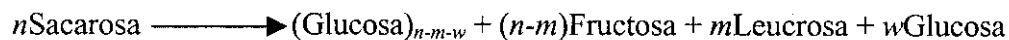
La alternativa a la inducción con sacarosa es la obtención de cepas mutantes que sean constitutivas para la formación de la enzima. Para ello se suelen suspender las células en presencia de agentes como el metanosulfonato de etilo o la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Kim y Robyt, 1994a y 1994b; Mizutani y cols., 1994; Kim y Robyt, 1995b).

Concretamente, Kitaoka y Robyt (1998) han conseguido un mutante constitutivo de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, que se desarrolla en un medio nutritivo de glucosa, por lo que la enzima que produce carece de dextranos, lo que facilita en gran medida su purificación.

La dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F posee una secuencia de 1527 aminoácidos. El análisis de dicha secuencia revela una región, extendida desde el aminoácido 268 hasta el 1134, esencial para la actividad de síntesis de dextrano, e incluye además un sitio característico para la hidrólisis de la sacarosa (Monchois y cols., 1998). Mediante modificación química y mutagénesis dirigida se han identificado los aminoácidos esenciales en la actividad de la dextransacarasa (Asp511, Asp513, Asp551 y la His661), y estudios de predicciones estructurales sugieren que, como en las  $\alpha$ -amilasas, los dominios catalíticos de la dextransacarasa presentan la estructura tonel ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (Funane y cols., 1993; Monchois y cols., 1997).

### 3.4.2 MECANISMO DE LA SINTESIS DE DEXTRANO

La reacción de la dextransacarasa pueden simplificarse mediante la siguiente fórmula:



La reacción es esencialmente irreversible. El principal producto son dextranos ((Glucosa)<sub>n-m-w</sub>) de alto peso molecular ( $1 \times 10^7$  Da) y fructosa; los productos minoritarios son glucosa y leucrosa (donde  $n \gg m$  ó  $w$ ). La glucosa se produce mediante una reacción de aceptor con agua, y la leucrosa se forma mediante la reacción de aceptor con la fructosa liberada en la reacción (Roby, 1995).

El mecanismo de síntesis de dextranos se basa en la formación de complejos covalentes glucosil o dextranosil-enzima a partir de sacarosa. Concretamente se trata de un mecanismo de inserción de dos sitios, que permite la transferencia de unidades glucosilo desde la sacarosa, al extremo reductor de la cadena de dextrano en crecimiento. Al igual que ocurre con la CGTasa, el mecanismo de reacción sigue un modelo de *ping-pong bi bi* (Funane y cols., 1993).

### ***Mecanismo de doble inserción***

La dextranasa posee un centro activo con dos sitios de unión de sacarosa, y dos lugares de polimerización de dextrano (Fig. I.18.1 y I.18.2). Estos últimos están ocupados por dos nucleófilos, presumiblemente dos aniones carboxilato, que atacan a las dos moléculas de sacarosa produciendo dos intermediarios covalentes glucosil-enzima, -mediante uniones tipo éster entre el hidroxilo del carbono 1 de la glucosa y el grupo carboxilo del nucleófilo (Funane y cols., 1995)-, liberándose fructosa como subproducto (Fig. I.18.3).

A continuación, el hidroxilo del carbono 6 de uno de estos intermediarios glucosil-enzima realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono 1 del intermediario glucosilo vecino, con la formación de una unión glicosídica  $\alpha(1\rightarrow6)$  y el consiguiente intermediario isomaltosil-enzima (Fig. I.18.4 y I.18.5). El nucleófilo vecino quedará así libre para atacar a una nueva molécula de sacarosa, dando lugar a otro intermediario glucosil-enzima. Seguidamente, el hidroxilo del carbono 6 del recién formado intermediario glucosil-enzima atacará al carbono 1 del intermediario isomaltosil-enzima (Fig. I.18.6 y I.18.7), sintetizando una segunda unión  $\alpha(1\rightarrow6)$  y un intermediario isomaltotriosil-enzima (Tanriseven y Robyt, 1993). El proceso continúa de este modo entre los dos sitios (Fig. I.18.8), mediante la inserción de unidades de glucosa entre la enzima y el extremo reductor de la cadena de dextrano en crecimiento (Roby y cols., 1974). En definitiva, este mecanismo supone que, la cadena de dextrano es transferida de un sitio a otro del centro activo, a medida que se va polimerizando. La cadena, sin embargo, no se mueve una gran distancia (ya que sólo uno o dos de los residuos glucosilo en el extremo reductor de la cadena se desplazan unos pocos angstroms para efectuar la transferencia).

### ***Síntesis de ramas***

Una cadena de dextrano actúa como aceptor atacando a un complejo dextranosil-enzima, y liberándose una estructura final en la que el dextrano aceptor constituye la cadena principal y la cadena de dextrano que se encontraba unida a la enzima será el punto de ramificación. Para ser exactos, en el caso de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F el hidroxilo del carbono 3 de un residuo interior de glucosa de un dextrano aceptor realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono 1 de un complejo dextranosil-enzima (Fig. I.18.8a) o sobre el carbono 1 de un complejo glucosil-enzima (Fig. I.18.8b). Por lo tanto se forma una unión  $\alpha(1\rightarrow3)$  por desplazamiento del dextrano o de la glucosa del nucleófilo del centro activo de la enzima (Roby y Taniguchi, 1976).

### *Reacción de aceptor*

A principios de los años 50, Koepsell y sus colaboradores observaron que la introducción de algunos azúcares en la mezcla de reacción de la dextransacarasa en presencia de sacarosa, conducía a la síntesis de oligosacáridos a expensas de la producción de dextranos. De este modo, los residuos de glucosa de la sacarosa eran transferidos por la dextransacarasa a los hidroxilos libres de aquellos azúcares, que se denominaron aceptores (Paul y cols., 1986).

Se ha determinado que el centro activo de la dextransacarasa, además de los dos sitios de unión de sacarosa, y los dos sitios de polimerización del dextrano, presenta un sitio de unión de aceptor (Fig. I.18.8c) el cual, para su correcto funcionamiento, es dependiente solamente de uno de los dos sitios de unión de sacarosa (Robyt y Walseth, 1978).

Existen dos clases de aceptores, aquellos que sólo forman un único producto que presenta un residuo de glucosa más que el aceptor inicial, y los que dan una serie homóloga de oligosacáridos, en la que cada uno difiere del anterior en un residuo de glucosa (Remaud y cols., 1992). En este último caso, el aceptor suele ser un monosacárido o un disacárido (D-glucosa, celobiosa, maltosa, isomaltosa) formándose normalmente una serie de oligosacáridos llamados productos de aceptor.

La presencia de aceptores de bajo peso molecular desplaza la reacción desde la síntesis de dextranos hacia la formación de productos de aceptor. Cuando la D-glucosa, el metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido, la maltosa o la isomaltosa son los aceptores, la glucosa que procede de la sacarosa es transferida al hidroxilo del carbono 6 del monosacárido, o al hidroxilo del carbono 6 de la glucosa no reductora del disacárido, dando una serie de isomaltodextrinas con un grado de polimerización de 2 a 10 residuos de glucopiranososa (Robyt, 1995).

Por ejemplo, el primer producto en la serie con isomaltosa es isomaltotriosa y el primer producto en la serie con maltosa es panosa ( $6^2$ - $\alpha$ -D-glucopiranosil maltosa). Cuando la concentración del primer producto de aceptor se hace suficientemente alta, éste puede actuar a su vez como aceptor dando el siguiente homólogo en la serie. Los miembros posteriores de la serie de la maltosa tienen cadenas de maltodextrina que incrementan su grado de polimerización sucesivamente. El porcentaje de cada oligosacárido en la mezcla de reacción disminuye a medida que aumenta su grado de polimerización (Su y Robyt, 1993). Las eficiencias relativas de las maltodextrinas (de maltosa a maltooctaosa) como aceptores disminuyen de un 100% para maltosa a 6.2% para maltooctaosa. Es decir cuanto más grande es la cadena de oligosacárido menor es su eficiencia como aceptor (Robyt, 1995).

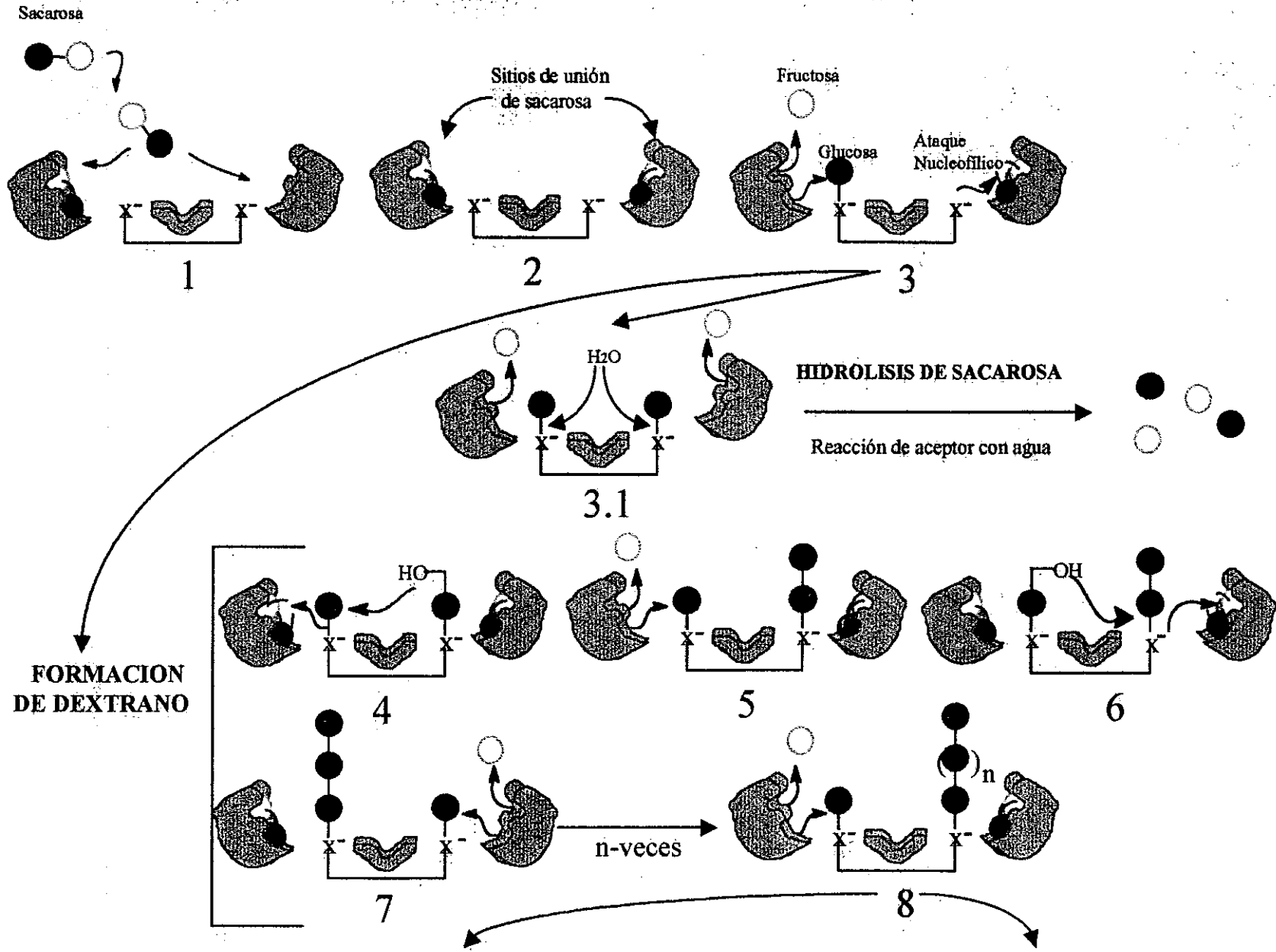
Se ha comprobado que el aceptor más efectivo para favorecer la disminución en la producción de dextrano es la maltosa. El resto de aceptores más importantes para la dextransacarasa, se recogen en la Tabla I.6.

**Tabla I.6.** Relación de aceptores más efectivos para la dextransacarasa. El rendimiento se evalúa con respecto a la maltosa (a la que se le atribuye el valor 100).

<b>Aceptor</b>	<b>Rendimiento como aceptor (%)</b>
Maltosa	100
Isomaltosa	89
Nigeriosa	58
Metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido	52
D-glucosa	17
Turanosa	13
Lactosa	11
Celobiosa	9
D-fructosa	6.4

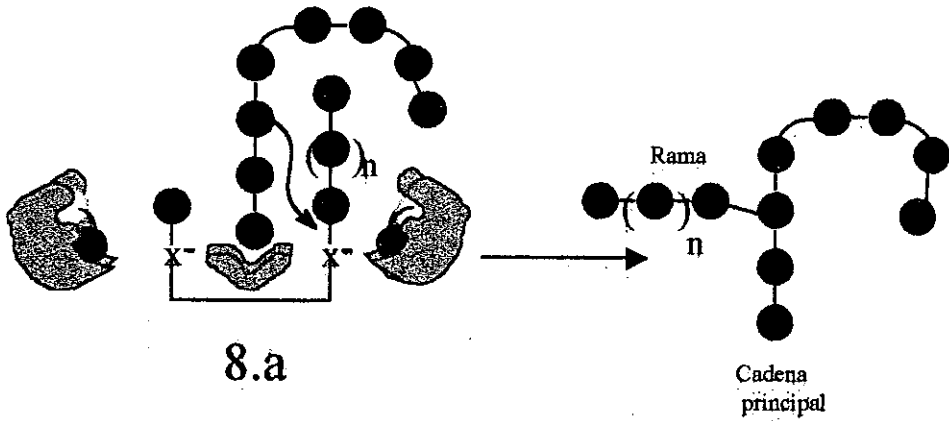
En resumen, la cadena de dextrano se libera del centro activo por reacción con distintos aceptores. Cuando el aceptor es otra cadena de dextrano, se forman ramificaciones; si el aceptor es un carbohidrato de bajo peso molecular, el dextrano se libera con el aceptor unido a su extremo reductor (Fig. I.18.8c1 y I.18.8c2). Finalmente, una pequeña cantidad de glucosa se forma cuando el agua actúa como aceptor (Fig. I.18.3.1); esta reacción representa la hidrólisis de la sacarosa (Robyt, 1996).

Figura I.18. MECANISMO DE LA REACCIÓN DE LA DEXTRANSACARASA



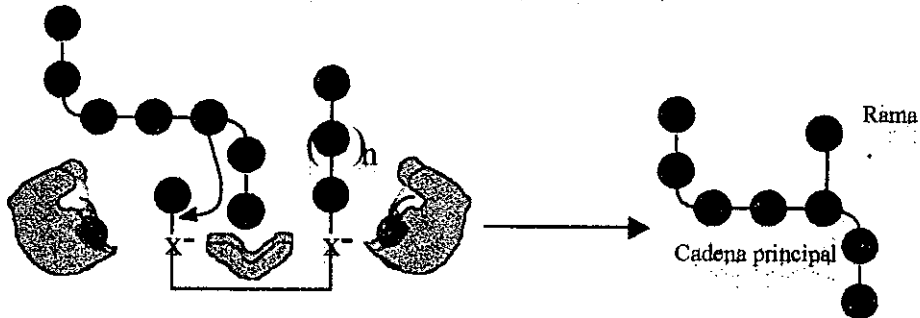
## SINTESIS DE RAMAS

Ataque sobre el complejo dextranosil-enzima:



8.a

Ataque sobre el complejo glucosil-enzima:

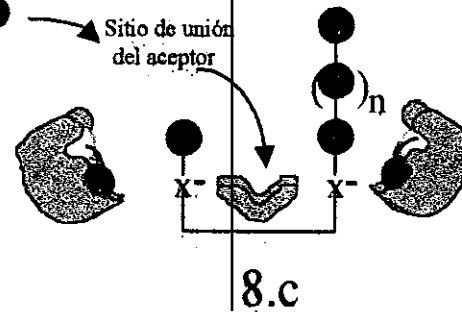


8.b

## REACCION DE ACEPTOR

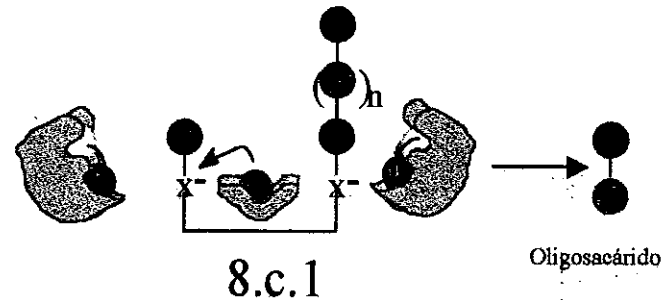
Aceptor

Sitio de unión del aceptor



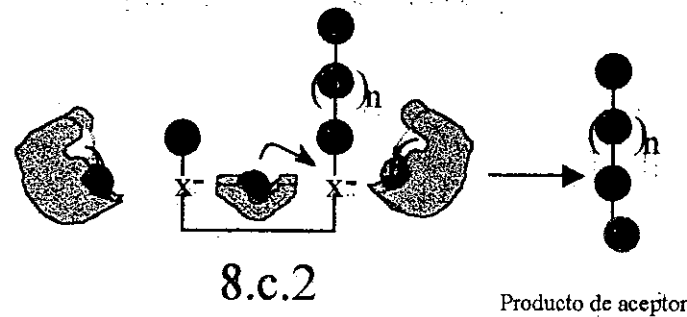
8.c

Ataque sobre el complejo glucosil-enzima:



8.c.1

Ataque sobre el complejo dextranosil-enzima:



8.c.2



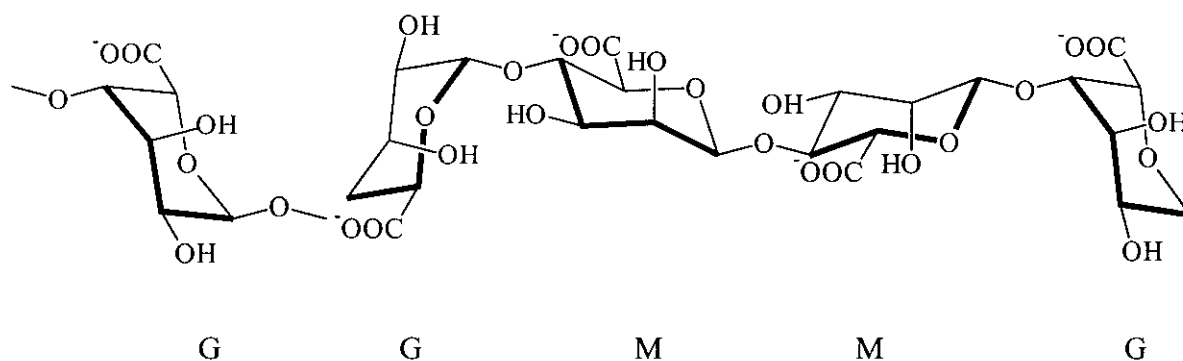
### 3.5 INMOVILIZACION DE DEXTRANSACARASAS

La búsqueda de productos de aceptor sintetizados por la dextransacarasa requiere como paso fundamental la inmovilización de la enzima, que permitirá una mayor estabilidad operacional (mayor vida media de la enzima), una mayor productividad y una fácil recuperación del biocatalizador. Sin embargo, todos los intentos de inmovilizar la dextransacarasa por métodos clásicos han sido notablemente infructuosos. Cuando la enzima se inmoviliza por adsorción sobre hidroxapatito se conserva completamente su actividad catalítica, pero la enzima se separa del soporte con facilidad (Parnaik y cols., 1983). Los intentos de inmovilización con glutaraldehído sobre sílice porosa aminada con alquilamina no fueron positivos -el rendimiento de la inmovilización fue inferior al 10%- (Kaboli y Reilly, 1980). Mediante adsorción hidrofóbica a matrices de fenoxiacetil-celulosa se incrementó la actividad de la enzima inmovilizada, pero no su estabilidad (Chang y cols., 1981). Se han descrito altos rendimientos de inmovilización por adsorción sobre Sephadex G-200; no obstante, la estabilidad de dichas preparaciones no se ha estudiado (Kobs, 1991).

Uno de los métodos más desarrollados para la inmovilización de la dextransacarasa es la unión covalente sobre sílice porosa silanizada y activada con glutaraldehído. Con este sistema se obtienen aceptables rendimientos de actividad; sin embargo, existen problemas difusionales debido al dextrano formado durante la reacción (que llega a obturar los poros). Quizás por ello no se han descrito resultados de estabilidad de las preparaciones inmovilizadas en sílice y en soportes relacionados (López y Monsan, 1980; Monsan y López, 1981a; Monsan y López, 1981b; Monsan y cols., 1987).

Todas estas dificultades pueden ser superadas mediante la inmovilización de la dextransacarasa por atrapamiento en esferas de alginato cálcico. El polímero de alginato se encuentra en la naturaleza formando parte de algas pardas (división Phaeophyta) aunque también es producido por algunas bacterias como *Azotobacter vinelandii* y varias especies de *Pseudomonas*. El alginato que aparece en las algas pardas es el polímero más abundante de éstas y alcanza cerca del 40% del peso seco del alga. Está localizado en la matriz intercelular como un gel que contiene sodio, calcio, magnesio, estroncio y bario, y su principal función es la de soporte, actuando como un "esqueleto" que confiere flexibilidad y consistencia a la hoja del alga. Debido a su capacidad para retener el agua, y a sus propiedades gelificantes y estabilizantes, el alginato es ampliamente empleado en industria (Thu y cols., 1996).

En términos moleculares, el alginato es una familia de copolímeros binarios no ramificados de uniones  $\beta$ -D(1 $\rightarrow$ 4) entre el ácido manurónico y el ácido gulurónico. La variación en la composición y estructura secuencial depende del organismo del que proceda y de la hoja que se aísle.



**Figura I.19.** Estructura del polímero de alginato: G (ácido gulurónico), M (ácido manurónico)

El alginato ideal es aquél que posea alta estabilidad mecánica y química, propiedades controlables de hinchamiento, un tamaño de poro definido así como un bajo contenido de contaminantes inmunogénicos y sustancias tóxicas.

La inmovilización en alginato es un método muy prometedor y versátil que permite inmovilizar en un sólo paso y bajo condiciones muy suaves -por consiguiente compatibles con la mayoría de las células (El-Sayed y cols., 1990a; El-Sayed y cols., 1990b, Roca y cols., 1996)-. En líneas generales, la inmovilización con alginato se basa en un mezclado de células con un polímero soluble en agua, y a continuación la gelificación del polímero mediante agentes de entrecruzamiento como el calcio o estroncio. Goteando la mezcla alginato-célula en la solución que contenga los cationes multivalentes, se forman instantáneamente esferas por gelación ionotrópica, quedando las células atrapadas dentro de un polímero tridimensional (Vogelsang y Ostgaard, 1996).

Como se ha descrito, la aplicación de este tipo de inmovilización está restringida a células completas o partes de éstas, y en principio no es válido para proteínas globulares (Hartmeier, 1984). De hecho, los intentos de atrapamiento de enzimas en esta matriz han sido numerosos: (inulasa, glucosa oxidasa, o quimotripsina) y todos ellos con muy bajos rendimientos (Kierstan y Bucke, 1977; Reischwithz y cols., 1995). Sin embargo la dextranosa puede ser inmovilizada gracias a su única estructura supramolecular, que le confiere el dextrano que la envuelve, y que en definitiva, impide que escape a través de los poros de la esfera. Con esta técnica de inmovilización se consiguen unos rendimientos excelentes (cerca del 90%) y unas vidas medias superiores a los 60 días (Buchholz y cols., 1991; Reischwithz y cols., 1995).

## **II. OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Las glicosiltransferasas son uno de los grupos enzimáticos de mayor interés actual, debido a su aplicación inmediata en la síntesis de oligosacáridos nuevos (neosacáridos), con alto valor añadido. La Memoria de Investigación que se presenta pretende contribuir al estudio del binomio estructura-función en dos glicosiltransferasas, la ciclodextrin glicosiltransferasa (CGTasa) y la dextransacarasa. Se trata de dos enzimas con notables diferencias (en cuanto al sustrato de partida, especificidad de enlace, estabilidad, etc.) pero que comparten su actividad catalítica en reacciones de transferencia utilizando aceptores. No obstante, se han seguido dos líneas de trabajo distintas, aplicadas a cada uno de los sistemas enzimáticos.

El principal objetivo establecido en este trabajo con la CGTasa fue determinar que factores rigen la selectividad de producción de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina. Para ello se empleó como herramienta la modificación química. Estos estudios se han realizado en colaboración con los grupos de cristalografía de proteínas de la Universidad de Groningen (Profesores B. Dijkstra y L. Dijkhuizen) y los de mutagénesis dirigida de la empresa Novo Nordisk (Profesores S. Pedersen y C. Andersen).

En primer lugar, se planteó la modificación de los residuos de Lys de la proteína empleando dos reactivos diferentes (anhídridos acético y succínico) que dan lugar a cadenas laterales con distintas propiedades de carga.

Por otra parte, se consideró interesante la modificación de los residuos de Glu y Asp de la CGTasa mediante la reacción promovida por una carbodiimida y utilizando distintos nucleófilos (taurina, éster metílico de norleucina y éster etílico de glicina), que originan especies con diferentes propiedades de carga e hidrofobicidad.

Tanto en la modificación de los grupos amino como en la de los grupos carboxilo, se procedió a una caracterización de los productos de reacción. Otro de los objetivos de este trabajo fue el intentar contribuir a la optimización de algunas metodologías de modificación química, mediante la búsqueda de las mejores condiciones de reacción y caracterización de las especies modificadas.

Respecto a la dextransacarasa, su enorme versatilidad en reacciones con aceptores la convierten en una enzima idónea para la obtención de oligosacáridos de interés industrial. Por ello, se planteó el estudio de las reacciones de aceptor de esta enzima mediante la tecnología de la inmovilización enzimática, que permite su estabilización y/o reutilización.

El principal objetivo de esta parte de la investigación se centró, en definitiva, en encontrar un método de inmovilización adecuado para las reacciones en presencia de aceptores. Se ensayó la inmovilización covalente de la enzima, en sílice de diferentes diámetro de poro, así como el atrapamiento en geles de alginato cálcico. Se utilizó tanto la enzima nativa, recubierta por una capa de dextrano, como la preparación libre de éstos (obtenida por tratamiento con dextranasas). Estos estudios se han desarrollado en colaboración con el grupo de ingeniería de proteínas del Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas de Toulouse (Profesores P. Monsan, M. Remaud y R. M. Willemot). Una vez evaluadas las propiedades de las enzimas inmovilizadas (estabilidad, actividad, resistencia a disolventes orgánicos), se estudió la reacción de aceptor en presencia de maltosa (tanto de la enzima nativa como de la inmovilizada) con el fin de conocer el funcionamiento de esta reacción y optimizar el proceso de producción, siendo los objetivos destacados de este trabajo. Se establecieron las condiciones de reacción más adecuadas para la síntesis de productos de aceptor.

# III. MATERIALES Y METODOS

## MATERIALES

## METODOS

1. PURIFICACION DE LA CGTasa
  - 1.1 PURIFICACION CON LA MATRIZ AFFI-T
  - 1.2 PURIFICACION CON LA MATRIZ DE AFINIDAD  $\alpha$ -CICLODEXTRINA/SEPHAROSA
    - 1.2.1 ACTIVACION DEL GEL
    - 1.2.2 PROTOCOLO DE PURIFICACION
2. MODIFICACION QUIMICA DE LA CGTasa
  - 2.1 MODIFICACION DE LOS GRUPOS AMINO
    - 2.1.1 *Determinación del grado de modificación*
  - 2.2 MODIFICACION DE LOS GRUPOS CARBOXILO
    - 2.2.1 *Determinación del grado de modificación*
  - 2.3 MODIFICACION DE LA CISTEINA
3. MEDIDAS DE ACTIVIDAD CATALITICA DE LA CGTasa
  - 3.1 ENSAYOS DE ACTIVIDAD INICIAL A TIEMPOS CORTOS
    - 3.1.1 ACTIVIDAD DE CICLACION
    - 3.1.2 ACTIVIDAD DE ACOPLAMIENTO
    - 3.1.3 ACTIVIDAD DE TRANSFERENCIA
    - 3.1.4 ACTIVIDAD DE HIDROLISIS
  - 3.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD A TIEMPOS LARGOS
4. ESTUDIOS DE SELECTIVIDAD DE LA CGTasa EN FUNCION DEL pH
5. ESTUDIOS DE ACCESIBILIDAD DE LOS RESIDUOS DE LA CGTasa
6. ELIMINACION DEL DEXTRANO DE LA DEXTRANSACARASA
7. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA DEXTRANSACARASA
8. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA DEXTRANSACARASA
9. INMOVILIZACION COVALENTE DE LA DEXTRANSACARASA EN SILICE POROSA
  - 9.1 AMINACION DE LA SILICE
  - 9.2 ACTIVACION DEL SOPORTE CON GLUTARALDEHIDO
  - 9.3 INMOVILIZACION DE LA ENZIMA
10. INMOVILIZACION DE LA DEXTRANSACARASA POR ATRAPAMIENTO EN ALGINATO CALCICO
11. REACCION DE ACEPTOR
12. TECNICAS COMUNES A LOS DOS SISTEMAS ENZIMATICOS
  - 12.1 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA
  - 12.2 ELECTROFORESIS
  - 12.3 ISOELECTROENFOQUE

## MATERIALES

### ENZIMAS Y PROTEINAS

La CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 fue suministrada por el Dr. Sven Pedersen de Novo Nordisk. La dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F fue proporcionada por el Dr. Pierre Monsan del *Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse* (INSA).

La amiloglucosidasa A 3514 (EC 3.2.1.3) y la seroalbumina bovina (BSA) procedían de Sigma. La  $\alpha$ -glucosidasa (EC 3.2.1.20) de Boehringer Mannheim.

### REACTIVOS, AGENTES MODIFICANTES Y PATRONES

La casa comercial Sigma suministró los siguientes productos:

Anhídrido acético, anhídrido succínico, 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodimida (EDC), éster etílico de glicina, éster metílico de norleucina, taurina, disulfuro de 2,2'-dipiridilo, ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), fenolftaleina, verde de bromocresol,  $\alpha$ -  $\beta$  y  $\gamma$ -ciclodextrina; malto-oligosacáridos (G1-G7), isomalto-oligosacáridos (G2-G4), metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido, almidón de patata (soluble), hidroxilamina, 2-metil-2-butanol (alcohol *tert*-amílico), cianoborohidruro sódico, borohidruro sódico y fluorescamina.

El resto de productos procedieron de las siguientes casas comerciales:

De Fluka: el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el ácido 2,4,6-trinitro-benceno sulfónico (TNBS), el  $\gamma$ -aminopropil trimetoxisilano y el glutaraldehído.

De Merck: la sacarosa, el dimetilsulfóxido (DMSO) y la N,N-dimetilformamida (DMF).

De Boehringer Mannheim el reactivo GOD-Perid-Glucosa MPR2 y el 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltoheptaósido-4,6-O-etilideno (EPS).

De Scharlau la acetona y la N, N-dimetilacetamida (DMA).

De Aldrich el naranja de metilo y el 1,4 butanodiol diglicidil éter (diglicidil éter).

De Bayer la acarbosa; de Avebe (Foxhol, Holanda) el Paselli SA2 (almidón de patata parcialmente hidrolizado); de ICN la L-norleucina; de Kem-en-Tec la matriz de agarosa AFFI-T (Copenhague, Dinamarca); de Biosepra las sílices porosas X200 y X030, y de Bioeurope el alginato SG-300.

La casa comercial Pharmacia suministró los kits de bajo y alto peso molecular para electroforesis, así como el gel del Sepharosa 6 Fast Flow (6FF). El resto de los reactivos usados en los experimentos de electroforesis, isoelectroenfoque y determinación de proteína procedieron de Bio-Rad.

Todos los demás reactivos utilizados fueron de la máxima calidad disponible en el mercado.

## **METODOS**

### **1. PURIFICACIÓN DE LA CGTasa**

En todos los métodos de purificación desarrollados, se utilizó un FPLC (fast protein liquid chromatography) de la casa Pharmacia (modelo LCC-500 CI) compuesto por los siguientes módulos: una unidad de control UV-1, acoplada a un sistema de bombas P-500, con un detector UV-1 con filtro de 280 nm, y un colector FRAC-100. El equipo estaba automatizado, utilizándose para su control un ordenador en el que se implementó el software FPLC-Manager (Pharmacia). En el Anexo I se recogen los programas diseñados para cada purificación.

Las muestras comerciales de CGTasa contenían otras enzimas (proteasas,  $\alpha$ -amilasas, etc.) y numerosos pigmentos que contaminaban la preparación. Por lo tanto, se ensayaron varios métodos de purificación para obtener CGTasa con el máximo grado de pureza. Se compararon dos metodologías distintas.

#### **1.1 PURIFICACIÓN CON LA MATRIZ AFFI-T**

Este método, desarrollado por la División de Procesos Enzimáticos de la empresa Novo Nordisk, hace uso en una matriz de afinidad AFFI-T. Se trata de una agarosa tiofílica especialmente diseñada para la purificación de inmunoglobulinas y otras proteínas o enzimas (Porath y Belew, 1987; Hutchens y Porath, 1987). Tiene una capacidad de 10-50 mg proteína/ml de matriz. El gel fue activado y empaquetado en una columna C16 de Pharmacia (1.6 x 20 cm).



El protocolo de purificación fue el siguiente:

1) Equilibrado de la columna: se lava la matriz 40 min con agua (flujo de 0.5 ml/min), y a continuación con sulfato amónico 1.5 M (pH 7.0) durante 40 min al mismo flujo.

2) Se añade sulfato amónico a la preparación de CGTasa (hasta el 20% de saturación), y se carga la muestra empleando una bomba peristáltica (modelo LKB de Pharmacia) a un flujo de 0.5 ml/min.

3) Se lava la matriz con la enzima ligada, con tampón sulfato amónico 1.5 M (pH 7.0) durante 70 min. Seguidamente se lava 50 min con tampón borato 10 mM (pH 7.0) y por último con una mezcla tampón borato 10 mM (pH 7.0) : isopropanol, 1/1 (v/v), durante 60 min. En los tres casos el flujo de trabajo es 1 ml/min. La columna se regenera fácilmente mediante lavado con agua destilada o con NaCl 0.1 M. La muestra de CGTasa purificada, se somete a diálisis exhaustiva en tampón Tris 20 mM (pH 7).

## **1.2 PURIFICACION CON LA MATRIZ DE AFINIDAD $\alpha$ -CICLODEXTRINA/SEPHAROSA**

Este protocolo de purificación se basa en la afinidad que presenta la CGTasa hacia el anillo de ciclodextrina (Peninga y cols., 1995; Wind y cols., 1995).

### **1.2.1 ACTIVACIÓN DEL GEL**

En primer lugar se activa el gel de Sepharosa (Tipo 6, fast flow 6FF) en base al procedimiento descrito por Sundberg y Porath (1974):

Se lava la Sepharosa con agua destilada. A continuación se secan 50 g de Sepharosa y se le añaden 25 ml de diglicidil éter, 75 ml de NaOH 0.45 N y 150 mg de NaBH<sub>3</sub>. La mezcla se incuba a 25°C durante 10 h en un baño con agitación orbital, tras lo cual se filtra en una membrana de 0.45  $\mu$ m. Se disuelven 20 g de  $\alpha$ -ciclodextrina en 200 ml de NaOH 0.1 N y se añaden sobre la Sepharosa epoxi-activada seca. Se homogeneiza la solución y se mantiene con agitación orbital a 45°C durante 20 h. Se lava el gel con tampón bicarbonato 0.1 M (pH 8.0), posteriormente con tampón acetato 0.1 M (pH 4.0) y finalmente con agua destilada.

Para bloquear los grupos epóxido que no han reaccionado, se añaden 100 ml de etanolamina 1 M al material seco, y se incuba con agitación lenta durante 3 h a 45°C. Por último, se lava con tampón acetato 0.1 M (pH 4.0) en NaCl 0.5 M; tampón borato 0.1 M (pH 8.0) en NaCl 0.5 M; agua destilada, y finalmente con tampón acetato 10 mM (pH 5.5). La capacidad final de la matriz de afinidad es de 3.5 mg CGTasa/ml de gel.

### 1.2.2 PROTOCOLO DE PURIFICACION

1) Se carga la solución enzimática en una columna (1.6 x 20 cm) -empaquetada con el gel de afinidad- a un flujo de 2.5 ml/min.

2) Se lava la columna con 200-300 ml de tampón acetato 10 mM (pH 5.5).

3) La CGTasa se extrae mediante elución -en sentido inverso a la aplicación de la muestra enzimática- con 100 ml de tampón acetato 10 mM (pH 5.5) conteniendo 1% de  $\alpha$ -ciclodextrina. El flujo de trabajo es de 2.5 ml/min.

4) La CGTasa purificada puede guardarse en estas condiciones (en presencia de  $\alpha$ -ciclodextrina) durante largos períodos de tiempo a -20°C.

5) La columna puede ser regenerada lavando con 100 ml de tampón acetato 10 mM (pH 5.5) conteniendo NaCl 3 M y 2% de  $\beta$ -ciclodextrina, y posteriormente con 200 ml de tampón acetato 10 mM (pH 5.5).

## 2. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA CGTasa

Todos los protocolos de modificación química que se describen en este apartado se ensayaron previamente con una proteína patrón, la seroalbúmina bovina (BSA), a fin de obtener las condiciones óptimas de modificación. Para mantener el pH constante durante las reacciones de modificación de grupos amino (apartado 2.1) y de grupos carboxilo (apartado 2.2) se empleó un pH-stato de Radiometer con autobureta ABU-80 y titulador TTT-80.

### 2.1 MODIFICACION DE LOS GRUPOS AMINO

Para la modificación de los grupos amino de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501, se estudiaron dos reactivos diferentes: el anhídrido acético (produce un cambio de carga del grupo modificado de positiva a neutra) y el anhídrido succínico (en este caso, la carga positiva es reemplazada por un grupo carboxilato cargado negativamente).

El protocolo de acetilación que se utilizó se basa en el método tradicional descrito por Riordan y Vallee (1967a) con algunas modificaciones (Alcalde y cols., 1999):

Se preparan 1 l de disolución de CGTasa purificada (0.265 mg/ml, 3.5  $\mu$ M) en tampón fosfato 10 mM (pH 8.0). Se añade anhídrido acético o anhídrido succínico (este último disuelto en acetona seca) en porciones (hasta completar 52.4  $\mu$ moles). Se emplea una relación molar 20:1 de reactivo con respecto al total de residuos de Lys y Tyr de la proteína. La reacción se mantiene con agitación a 4°C y pH 8.0 mediante el uso de un pH-stato con NaOH 0.2 N. Las adiciones de las distintas porciones de anhídrido se efectúan cuando cesa el consumo de sosa. El tiempo total de la reacción es aproximadamente 1 h. La mezcla de reacción se dializa en tampón fosfato 10 mM (pH 7.0) a 4°C para eliminar las sales y el exceso de agente acilante. Las O-acetiltirosinas se hidrolizan por incubación con hidroxilamina 0.5 M (pH 7.0) durante 5 h a 25°C. La desacilación va acompañada de un incremento de la absorbancia a 278 nm ( $\epsilon_{278} = 1160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Riordan y Vallee, 1967b). Finalmente, la muestra se vuelve a dializar en tampón fosfato 10 mM (pH 7.0) a 4°C. Se prepara un control paralelo de CGTasa pura y se la somete al mismo protocolo, en ausencia de anhídrido acético o succínico.

### 2.1.1 Determinación del grado de modificación.

Se utilizaron dos métodos diferentes:

**Método del ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) (Habeeb, 1966).** Se determinó el número de grupos amino en la proteína (antes y después de la modificación) por reacción con el TNBS. La reacción se siguió espectrofotométricamente a 340 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar para los grupos TNB-amino de  $\epsilon_{340} = 9950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

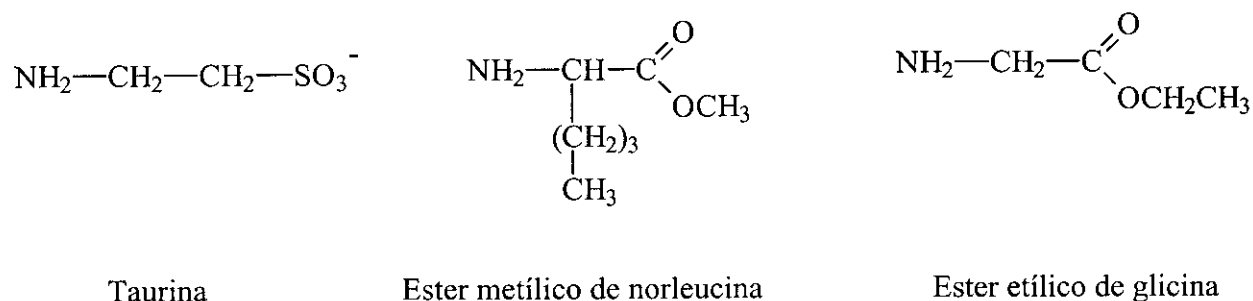
**Método de la fluorescamina (Stocks y cols., 1986).** La fluorescamina es un reactivo no fluorescente que reacciona rápidamente con los grupos amino primarios en aminoácidos, péptidos y proteínas formando compuestos altamente fluorescentes. Se midió la intensidad de la emisión de fluorescencia a 475 nm tras la excitación a 390 nm utilizando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS50B. El porcentaje de sustitución se estimó a partir del cociente de las pendientes de las gráficas que representan emisión de fluorescamina vs concentración de proteína:

$$\text{Grado de sustitución (\%)} = \frac{\text{Emisión / } \mu\text{g proteína modificada}}{\text{Emisión / } \mu\text{g proteína nativa}} \times 100$$

## 2.2 MODIFICACIÓN DE LOS GRUPOS CARBOXILO

Los grupos carboxilo de las proteínas pueden ser transformados en amidas mediante una reacción en dos pasos con carbodiimida soluble en agua y una amina nucleófila (Means y Feeney, 1971; Carraway y Koshland, 1972; Lundblad, 1991).

Las propiedades químicas, de carga y tamaño del nucleófilo empleado en la reacción pueden variar considerablemente el resultado final de la modificación. Se utilizaron tres nucleófilos diferentes: taurina, éster metílico de norleucina y éster etílico de glicina.



**Figura III.1.** Estructura de los nucleófilos empleados en la modificación de la CGTasa.

La reacción se desarrolló en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida (EDC) siguiendo el protocolo descrito por Hoare y Koshland (1967) con diversas modificaciones.

*Se incuban 5 ml de CGTasa pura (0.5 mg/ml, 6.6 μM) en tampón MES 10 mM (pH 4.75) conteniendo KCl 10 mM, a 25°C con agitación magnética. Se añade el nucleófilo correspondiente (sólido) hasta una concentración de 198 mM. La relación molar nucleófilo/grupos carboxilo es de 500:1. Seguidamente se añade acarbosa hasta una concentración 1.32 mM (para proteger los grupos carboxilo del centro activo). La relación molar acarbosa/proteína es de 200:1. Se ajusta el pH de la solución a 4.75 con HCl 0.2 N. Por último, se adiciona EDC (sólido) hasta una concentración 19.8 mM, comenzando la reacción. La relación molar EDC/grupo carboxilo es de 50:1. La reacción se mantiene a pH 4.75 mediante el uso de un pH-estato con NaOH 0.2 N. El tiempo total de la reacción fue aproximadamente 3 h. La mezcla de reacción se incuba en presencia de hidroxilamina 0.5 M (pH 7.0) durante 5 h a 25°C. De esta forma se regeneran las tirosinas que hayan reaccionado, y se degrada el EDC remanente. Finalmente, la muestra se dializa en tampón fosfato 10 mM (pH 7.0) a 4°C. Se prepara un control paralelo de CGTasa pura y se la somete al mismo protocolo, en ausencia de EDC.*

Para comprobar que la diálisis eliminó el nucleófilo que no había reaccionado, se realizó una cromatografía en capa fina de las muestras, utilizando placas de TLC de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> de la casa Merck. El sistema de elución estaba formado una mezcla acetato de etilo/metanol/H<sub>2</sub>O (2:1:1). El revelado de las placas se llevó a cabo por calentamiento a 100°C tras inmersión de las mismas en una disolución de ninhidrina al 0.5% en etanol/acético 85:15.

### **2.2.1 Determinación del grado de modificación.**

Para la cuantificación del grado de modificación de los grupos carboxilo se empleó la técnica de análisis de aminoácidos, en colaboración con la Prof. Cristina Carreño de la Universidad de Barcelona. El protocolo seguido fue el siguiente:

*500 µl de cada muestra (1-5 nmoles) se liofilizan en un tubo de hidrólisis. Se añaden 200 µl de HCl 6 N (conteniendo 1% de fenol) y se hidrolizan a 155°C durante 60 min en un tubo cerrado. La muestra se evapora a sequedad y el residuo se disuelve en 300 µl de tampón citrato 10mM (pH 2.0). Se inyectan en el analizador 50 µl de cada muestra. La calibración del analizador (STD 131098) se realiza inyectando una muestra patrón comercial (Beckman) compuesta por 5 nmoles/50 µl de cada aminoácido. Los nucleófilos utilizados en la modificación (taurina, éster metílico de norleucina y éster etílico de glicina) se sometieron a las mismas condiciones de hidrólisis ácida para determinar su respuesta en el analizador.*

Si el nucleófilo empleado es el éster etílico de glicina, la diferencia entre el número de residuos de glicina en la proteína modificada respecto a los residuos de glicina en la nativa corresponde al grado de modificación. Cuando el nucleófilo utilizado fue taurina o el éster metílico de norleucina, el grado de sustitución se cuantificó por la aparición de un pico de taurina o norleucina respectivamente.

## **2.3 MODIFICACION DE LA CISTEINA**

Para la modificación de la única Cys de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 se escogieron dos reactivos diferentes.

**Disulfuro de 2,2'-dipiridilo.** Se empleó el método espectrofotométrico de Brocklehurst y Little (1973), analizando la formación de piridina-2-tiona a 343 nm, con  $\epsilon_{343} = 8080 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Stuchbury y cols., 1975).

El protocolo fue el siguiente:

Sobre 0.8 ml de CGTasa (0.5 mg/ml) en tampón fosfato 10 mM (pH 7) se adicionan 0.2 ml de una solución 1.65 mM de disulfuro de 2,2'-dipiridilo. Se analiza la variación de la absorbancia a 343 nm durante 30 min.

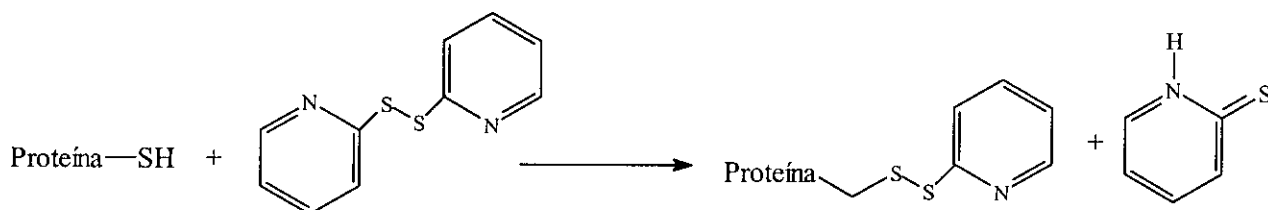


Figura III.2. Esquema de la reacción con disulfuro de 2,2'-dipiridilo.

**Acido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB).** El DTNB reacciona con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, liberándose el ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico ( $\epsilon_{410} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Means y Feeney, 1971). Se siguió el siguiente protocolo:

Sobre 0.8 ml de CGTasa (0.5 mg/ml) en tampón fosfato 10 mM (pH 8), se adicionan 80  $\mu\text{l}$  de una solución 10 mM de DTNB. Se analizó la variación de absorbancia durante 8 h a 410 nm. Se ensayó el mismo protocolo con CGTasa en condiciones desnaturalizantes (SDS 2% + Urea 1 M).

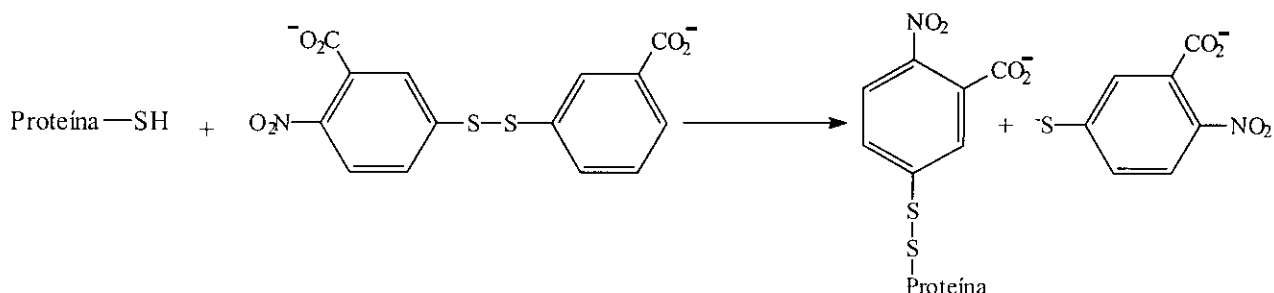


Figura III.3. Esquema de la modificación con DTNB.

### 3. MEDIDAS DE ACTIVIDAD CATALITICA DE LA CGTasa

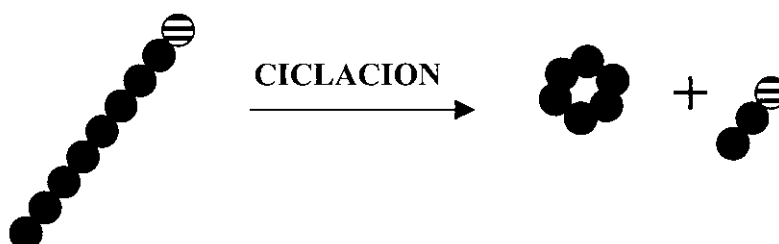
#### 3.1 ENSAYOS DE ACTIVIDAD INICIAL A TIEMPOS CORTOS

Las diferentes actividades de la CGTasa fueron medidas por incubación de la enzima durante 5 min a 85°C con agitación magnética, en la correspondiente solución de sustrato en tampón citrato 10 mM (pH 5.5) conteniendo CaCl<sub>2</sub> 0.15 mM (“*tampón de trabajo*”). A intervalos de 1 min (desde 0 hasta 5 min) se extrajeron alícuotas y se añadieron a los correspondientes reactivos. Todas las medidas colorimétricas se realizaron en un espectrofotómetro Kontron 930 equipado con agitación magnética y termostatzado.

##### 3.1.1 ACTIVIDAD DE CICLACIÓN

En todos los ensayos de formación de ciclodextrinas se utiliza como sustrato Paselli SA2 (almidón de patata parcialmente hidrolizado, con un grado de polimerización de 50). Se prepara una solución de Paselli al 10% en tampón de trabajo. Se disuelve mediante calentamiento y agitación vigorosa. La solución es estable durante 2-3 h a 40-50°C.

Cada vez que se prepara una nueva disolución de Paselli, es necesario realizar una nueva curva de calibrado. En estos ensayos es conveniente trabajar en un intervalo determinado de unidades enzimáticas. Para ello, se realizó el ensayo de actividad con distintas diluciones enzimáticas, hasta obtener un valor adecuado de U/ml dentro del rango de la Tabla III.1. Una unidad de actividad ciclación se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, o  $\gamma$ -ciclodextrina (según el ensayo realizado) por minuto, en las condiciones de reacción.



**Figura III.4.** Reacción de ciclación (transferencia intramolecular). Círculos negros, residuos de glucosa; círculo rayado extremo reductor.

La determinación de las actividades de formación de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -ciclodextrina se basa en la afinidad de cada una de las ciclodextrinas hacia determinados reactivos:

**-Ciclación a  $\alpha$ -ciclodextrina:** la  $\alpha$ -ciclodextrina puede encapsular el naranja de metilo produciendo una disminución del color de éste (Hirai y cols., 1981).

**-Ciclación a  $\beta$ -ciclodextrina:** la fenolftaleína, a valores de pH básicos, es de color púrpura. La  $\beta$ -ciclodextrina forma complejos de inclusión con este reactivo, produciéndose una disminución cuantificable del color (Peninga y cols., 1995).

**-Ciclación a  $\gamma$ -ciclodextrina:** el verde de bromocresol puede ser encapsulado por la  $\gamma$ -ciclodextrina, intensificándose el color de este reactivo (Kato y Horikoshi, 1984).

Concretamente, los protocolos experimentales para cada una de las actividades fueron los siguientes:

Ciclación a  $\alpha$ -ciclodextrina: la mezcla de reacción (Tabla III.1) -sin la CGTasa- se incuba durante 10 min a 85°C. La reacción comienza tras la adición de la CGTasa. A intervalos de 1 min, se hacen extracciones de 840  $\mu$ l y se añaden a microcubetas que contienen 60  $\mu$ l HCl 1.5 M (parando de este modo la reacción). Inmediatamente después se mide la absorbancia (de las alícuotas de reacción y de la curva de calibrado) a 490 nm, que corresponden al máximo de absorción del naranja de metilo a pH 1.5.

Ciclación a  $\beta$ -ciclodextrina: la mezcla de reacción (Tabla III.1) -sin la CGTasa- se incuba durante 10 min a 85°C. La reacción comienza tras la adición de la CGTasa. A intervalos de 1 min, se hacen extracciones de 100  $\mu$ l y se añaden a microcubetas que contienen 900  $\mu$ l de disolución de fenolftaleína. Inmediatamente después se mide la absorbancia (de las alícuotas de reacción y de la curva de calibrado) a 552 nm, que corresponde al máximo de absorción de la fenolftaleína a pH 9.6.

Ciclación a  $\gamma$ -ciclodextrina: la mezcla de reacción (Tabla III.1) -sin la CGTasa- se incuba durante 10 min a 85°C. La reacción comienza tras la adición de la CGTasa. A intervalos de 1 min, se hacen extracciones de 100  $\mu$ l y se añaden a microcubetas que contienen 900  $\mu$ l de disolución de verde de bromocresol. Inmediatamente después se mide la absorbancia (de las alícuotas de reacción y de la curva de calibrado) a 630 nm, que corresponde al máximo de absorción del verde de bromocresol a pH 4.2.



La preparación de las curvas de calibrado y las composiciones de las mezclas de reacción se recogen en la siguiente tabla:

**Tabla III.1.** Curvas de calibrado y mezclas de reacción empleadas para medir las tres actividades de ciclación de la CGTasa.

ACTIVIDAD	CURVA DE CALIBRADO		MEZCLA DE REACCION	
	Reactivos	Volumen	Reactivos	Volumen
<i>Ciclación a <math>\alpha</math></i>	$\alpha$ -ciclodextrina 0.37 mM en tampón de trabajo	0-616 $\mu$ l	CGTasa <sup>d</sup>	100-500 $\mu$ l (Concentración final: 0.03 U/ml)
	Tampón de trabajo	616-0 $\mu$ l	Disolución de Paselli al 10 %	1620 $\mu$ l (Concentración final: 2 %)
	Disolución de naranja de metilo <sup>a</sup>	56 $\mu$ l	Disolución de naranja de metilo <sup>a</sup>	540 $\mu$ l (Concentración final: 33 mM)
	HCl 1.5 N	60 $\mu$ l	Tampón de trabajo	Completar hasta 8100 $\mu$ l
	Disolución de Paselli al 10%	168 $\mu$ l		
<i>Ciclación a <math>\beta</math></i>	$\beta$ -ciclodextrina 2 mM en tampón de trabajo	0-50 $\mu$ l	CGTasa <sup>d</sup>	0-50 $\mu$ l (Concentración final: 0.1-0.2 U/ml)
	Tampón de trabajo	50-0 $\mu$ l	Disolución de Paselli al 10%	500 $\mu$ l (Concentración final: 5%)
	Disolución de fenolftaleína <sup>b</sup>	900 $\mu$ l	Tampón de trabajo	Completar hasta 1 ml
	Disolución de Paselli al 10%	50 $\mu$ l		
<i>Ciclación a <math>\gamma</math></i>	$\gamma$ -ciclodextrina 2 mM en tampón de trabajo	0-50 $\mu$ l	CGTasa <sup>d</sup>	0-50 $\mu$ l (Concentración final: 0.3-0.4 U/ml)
	Tampón de trabajo	50-0 $\mu$ l	Disolución de Paselli al 10%	500 $\mu$ l (Concentración final: 5%)
	Disolución de verde de bromocresol <sup>c</sup>	900 $\mu$ l	Tampón de trabajo	Completar hasta 1 ml
	Disolución de Paselli al 10%	50 $\mu$ l		

<sup>a</sup> Disolución de naranja de metilo 0.5 M en tampón de trabajo.

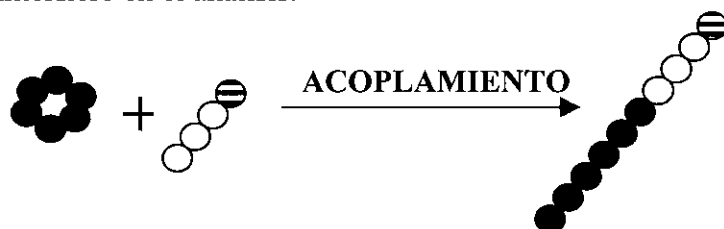
<sup>b</sup> Disolución de fenolftaleína: 1.5 ml de una disolución stock de fenolftaleína 3.75 mM en 100 ml de etanol 100%, se mezclan con 100 ml de tampón Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M (pH 9.6).

<sup>c</sup> Disolución de verde de bromocresol: 2 ml de una disolución stock de verde de bromocresol 5 mM en 100 ml de etanol al 20%, se mezclan con 80 ml de tampón citrato 0.2 M (pH 4.2).

<sup>d</sup> En tampón de trabajo.

### 3.1.2 ACTIVIDAD DE ACOPLAMIENTO

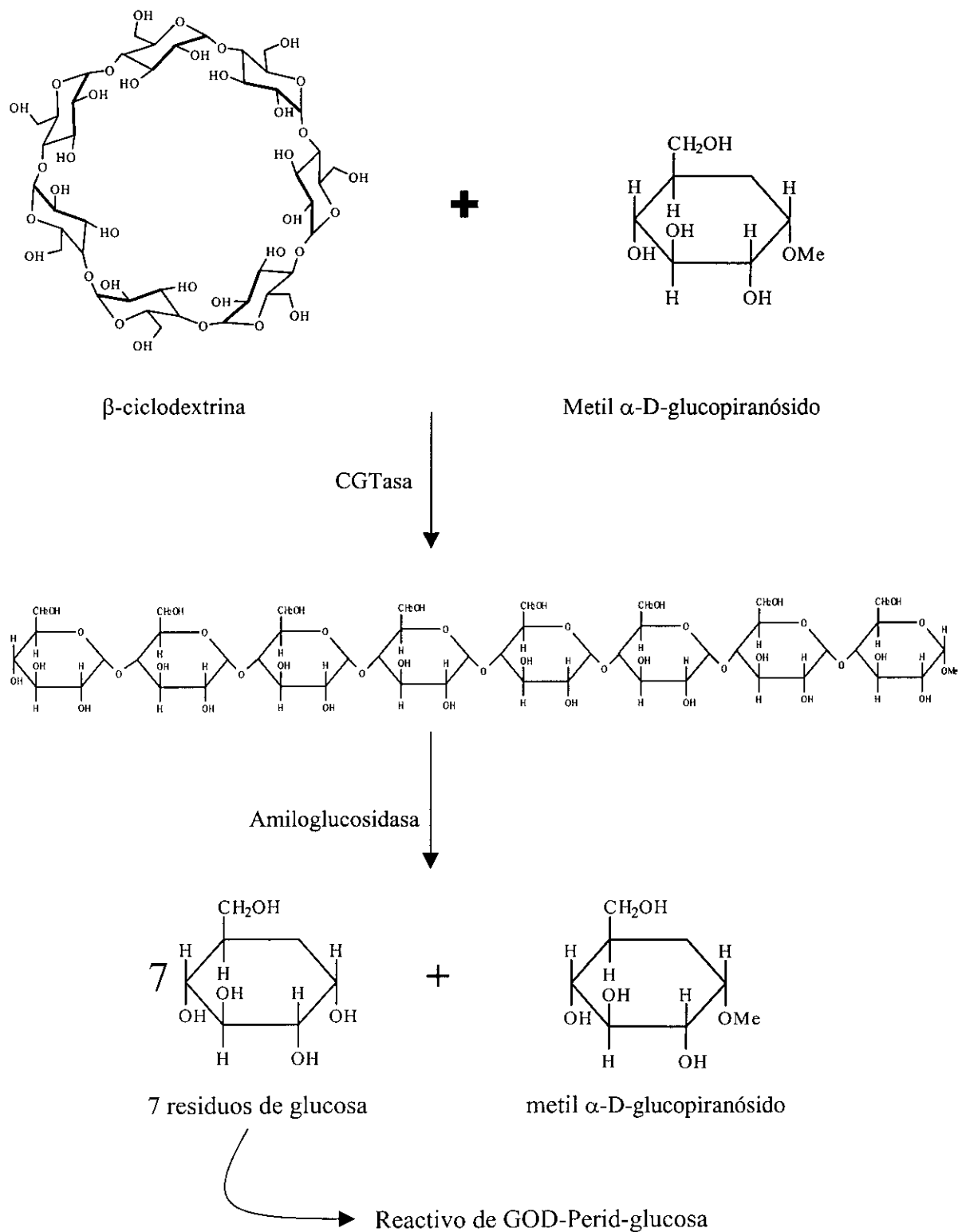
Para determinar la actividad de acoplamiento, se utilizó un protocolo basado en el empleo de  $\alpha$ - o  $\beta$ -ciclodextrina como donador y metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido como aceptor. La actividad acoplamiento de  $\gamma$ -ciclodextrina no puede ser cuantificada por este método porque la  $\gamma$ -ciclodextrina interfiere en el análisis.



**Figura III.5.** Esquema general de la reacción de acoplamiento (transferencia intermolecular). Círculos negros y blancos, residuos de glucosa; círculo rayado, extremo reductor.

**Acoplamiento de  $\beta$ -ciclodextrina :** en esta reacción, se forma un oligosacárido lineal (con 7 residuos de glucopiranososa, procedentes de la  $\beta$ -ciclodextrina y finalizado en un residuo adicional de metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido). Este azúcar puede ser hidrolizado en unidades de glucopiranososa gracias a la acción de una amiloglucosidasa (Fig. III.6). Es conveniente trabajar en un intervalo de concentración enzimática de 0.006-0.014 U/ml de actividad acoplamiento de  $\beta$ -ciclodextrina. La cantidad de glucosa producida se detecta con el reactivo de GOD-Perid-glucosa (Boehringer). El protocolo seguido fue el siguiente:

*La mezcla de reacción (Tabla III.2) -exceptuando la CGTasa- se incubaba durante 10 min a 85°C. La reacción comienza tras la adición de la CGTasa. A intervalos de 1 min, se hacen extracciones de 100  $\mu$ l y se añaden a 20  $\mu$ l de HCl 1.2 N a 4°C. Las muestras acidificadas se incuban durante 10 min a 60°C. Seguidamente, se enfrían en hielo y se neutralizan con 20  $\mu$ l de NaOH 1.2 N. Los oligosacáridos lineales formados se convierten en glucosa mediante la adición de 60  $\mu$ l (1 unidad) de amiloglucosidasa diluida en tampón acetato 170 mM (pH 4.5). A continuación las muestras se incuban en hielo durante 30 min. Posteriormente, se añade 1 ml de reactivo de GOD-Perid-glucosa a las muestras y a los puntos de la curva de calibrado (Tabla III.2). Se incuban 1 h a temperatura ambiente adquiriendo una tonalidad verde. Se mide la absorbancia a 737 nm. Una unidad de actividad  $\beta$ -acoplamiento es la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1  $\mu$ mol de  $\beta$ -ciclodextrina por minuto en las condiciones descritas.*



**Figura III.6.** Protocolo de la reacción de acoplamiento. Los azúcares reductores liberados por la acción de la amiloglucosidasa, son fácilmente cuantificables colorimétricamente.

**Acoplamiento de  $\alpha$ -ciclodextrina:** el protocolo es exactamente el mismo que para la detección de la actividad de acoplamiento de  $\beta$ -ciclodextrina. La única diferencia es que se emplea como sustrato en la mezcla de reacción  $\alpha$ -ciclodextrina.

**Tabla III.2.** Curvas de calibrado y mezclas de reacción empleadas para medir las actividades de acoplamiento de la CGTasa.

ACTIVIDAD	CURVA DE CALIBRADO		MEZCLA DE REACCION	
	Reactivos	Volumen	Reactivos	Volumen
<i>Acoplamiento</i>	Disolución de glucosa 0.5 mM en tampón de trabajo	0-200 $\mu$ l	CGTasa en tampón de trabajo	0-50 $\mu$ l (Concentración final: 0.006-0.014 U/ml) <sup>c</sup>
	Tampón de trabajo	200-0 $\mu$ l		
	Disolución de GOD-Perid-Glucosa	1000 $\mu$ l	Disolución de $\alpha$ - o $\beta$ -ciclodextrina <sup>a</sup> , según ensayo.	250 $\mu$ l
			Disolución de metil $\alpha$ - D-glucopiranosido <sup>b</sup>	250 $\mu$ l
		Tampón de trabajo	Completar hasta 1 ml	

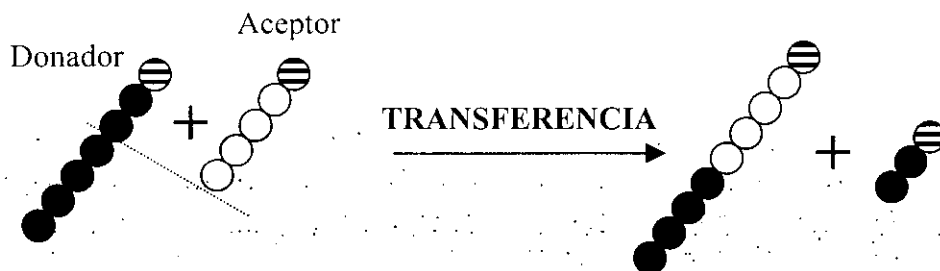
<sup>a</sup> Disolución de  $\alpha$ - o  $\beta$ -ciclodextrina 10 mM en tampón de trabajo.

<sup>b</sup> Disolución de metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido 400 mM en tampón de trabajo.

<sup>c</sup> Concentración en unidades de acoplamiento de  $\beta$ -ciclodextrina.

### 3.1.3 ACTIVIDAD DE TRANSFERENCIA

Para detectar esta actividad es necesario emplear dos azúcares lineares, uno de ellos actuará como donador y el otro como aceptor.



**Figura III.7.** Reacción de transferencia (intermolecular). Círculos negros y blancos, residuos de glucosa; círculos rayados, extremos reductores.

En este ensayo se usa maltosa como aceptor y el *p*-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltoheptaósido-4-6-O-etilideno (EPS) como donador. Este sustrato está bloqueado en su extremo no reductor, eliminando la posibilidad de que actúe como aceptor. Además, contiene un grupo *p*-nitrofenilo en el extremo reductor que permite cuantificar la reacción (Nakamura y cols., 1994a).

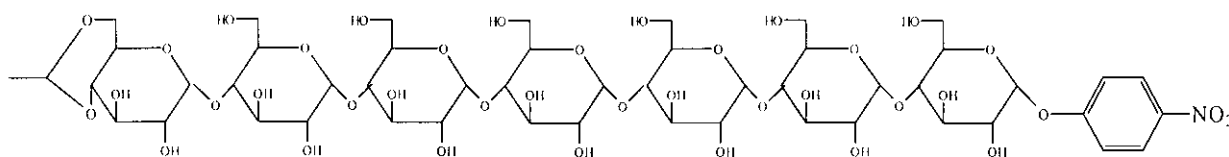


Figura III.8. Estructura del EPS.

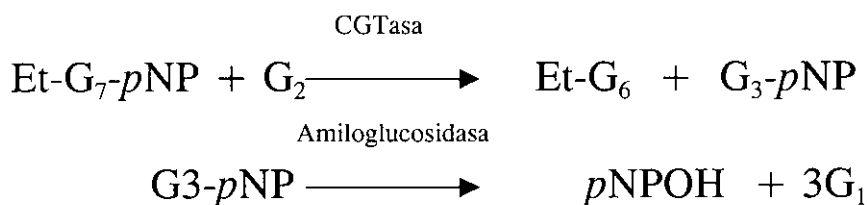


Figura III.9. La CGTasa cataliza la ruptura del EPS (Et-G<sub>7</sub>-pNP), liberando un fragmento de tres residuos de glucosa finalizados en un grupo *p*-nitrofenilo (G<sub>3</sub>-pNP). El intermediario covalente enzima-maltotetraósido-4-6-O-etilideno reacciona con la maltosa (G<sub>2</sub>) -aceptor- produciendo maltohexaósido-4-6-O-etilideno (Et-G<sub>6</sub>). La reacción se cuantifica gracias a la acción de una amiloglucosidasa, que ataca por el extremo no reductor al fragmento de maltotriosa (G<sub>3</sub>-NP), desprendiendo finalmente *p*-nitrofenol (pNPOH).

Se empleó el siguiente protocolo:

La mezcla de reacción (Tabla III.3) -sin CGTasa- se incuba durante 10 min a 85°C. La reacción comienza tras la adición de la CGTasa. A intervalos de 1 min, se hacen extracciones de 100  $\mu$ l y se añaden a 20  $\mu$ l de HCl 1.2N a 4°C. A continuación, las muestras acidificadas se incuban durante 10 min a 60°C. Seguidamente, se enfrían en hielo y se neutralizan con 20  $\mu$ l de NaOH 1.2 N. La liberación del grupo *p*-nitrofenilo se produce mediante la adición de 60  $\mu$ l (1 unidad) de  $\alpha$ -glucosidasa diluida en tampón fosfato potásico 0.8 M (pH 7.0). Las muestras se incuban 1 h a 37°C. Posteriormente, se adiciona 1 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M para ajustar el pH por encima de 10. Se mide la absorbancia a 401 nm. ( $\epsilon_{401} = 18400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Una unidad de actividad transferencia es la cantidad de enzima que cataliza la aparición de 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por minuto en las condiciones descritas.

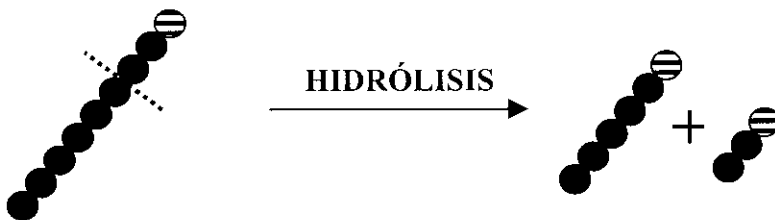
**Tabla III.3.** Composición de la mezcla de reacción empleada en el ensayo de actividad de transferencia.

ACTIVIDAD	MEZCLA DE REACCION	
	Reactivos	Volumen
<i>Transferencia</i>	CGTasa en tampón de trabajo	0-50 $\mu\text{l}$ (Concentración final: 0.1-0.2 U/ml) <sup>a</sup>
	Disolución de Maltosa 50 mM en tampón de trabajo	200 $\mu\text{l}$
	Disolución de EPS 30 mM en tampón de trabajo	100 $\mu\text{l}$
	Tampón de trabajo	Completar hasta 1 ml

<sup>a</sup> Concentración enzimática determinada mediante el ensayo de actividad de ciclación a  $\beta$ -ciclodextrina.

### 3.1.4 ACTIVIDAD DE HIDROLISIS

La actividad hidrolítica supone un aumento del número de centros reductores:



**Figura III.10.** Reacción de hidrólisis (el agua actúa como aceptor). Círculos negros, residuos de glucosa; círculos rayados, extremos reductores.

Este incremento puede ser determinado mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Bernfeld, 1955). Se trata de un compuesto de color amarillo-naranja, que en medio alcalino se transforma en diaminosalicílico (DAS), de color rojo, gracias a la acción de azúcares reductores.



### 3.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD A TIEMPOS LARGOS

La síntesis de ciclodextrinas y oligosacáridos también se estudió bajo condiciones de producción industrial (25% de almidón). Para analizar los productos de esta reacción se utilizó cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En concreto se empleó una bomba de gradiente Varian 9012 acoplada a un refractómetro Varian 9040 con control automatizado, utilizando el software Varian Star 4.0. El análisis se realizó con dos columnas en serie Aminex-HPX 42A (0.78 x 30 cm, 25  $\mu\text{m}$ , Bio-Rad) precedidas por una precolumna (con dos cartuchos de 0.46 x 3 cm, Bio-Rad). Como fase móvil se utilizó agua desionizada y desgasificada a un flujo 0.7 ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 85°C con un horno (Timberline Instrument). Como patrones se utilizaron los maltooligosacáridos G1-G7 así como las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrinas.

#### *Protocolo de actividad a tiempos largos:*

*Se incuban 7.0  $\mu\text{g}$  de CGTasa a 85°C y agitación magnética, con 2.5 g de Paselli SA2 en 10 ml de tampón citrato 10 mM (pH 5.5) conteniendo 0.15 mM de  $\text{CaCl}_2$ . A diferentes tiempos (desde 15 min hasta 8 días) se extraen alícuotas de 300  $\mu\text{l}$  y se mezclan con 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaOH}$  0.4 N para detener la reacción. Las muestras se centrifugan durante 15 min a 8500 rpm y el sobrenadante se inyecta en el HPLC.*

## 4. ESTUDIOS DE SELECTIVIDAD DE LA CGTasa EN FUNCION DEL pH

Se llevó a cabo un estudio de la selectividad en la reacción de ciclación a diferentes valores de pH. Para ello, se trabajó en el intervalo 3.5-9.5 con diferentes tampones escogidos en función de sus valores de  $\text{pK}_a$ , y de su baja interferencia con el  $\text{CaCl}_2$ . En concreto se utilizaron los siguientes tampones (todos ellos en concentración 10 mM conteniendo 0.15 mM de  $\text{CaCl}_2$ ):

TAMPON	CITRATO	CITRATO	CITRATO	MES	TRIS	TRIS	GLICINA
PH	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5



Las medidas se realizaron siguiendo la metodología descrita para el ensayo de actividad a tiempos largos (apartado 3.2), sustituyendo el tampón estándar en el matraz de reacción, por el que correspondiese en función del pH.

## 5. ESTUDIOS DE ACCESIBILIDAD DE LOS RESIDUOS DE LA CGTasa

Para realizar los estudios de accesibilidad de las cadenas laterales de los aminoácidos de la CGTasa se empleó el software NACCESS. NACCESS (Hubbard y Thornton, 1993) es un programa que calcula el área accesible de un átomo o una cadena lateral de una proteína a partir de un fichero con formato PDB ("Protein Data Bank", Brookhaven National Laboratory), es decir, a partir de sus coordenadas moleculares.

El programa emplea el método de Lee y Richards (1971), que simula el movimiento de una molécula de un radio determinado sobre la superficie de una proteína -definida en base a los radios de van der Waals de los átomos que la integran (Chothia, 1976)-. Se suele utilizar una molécula del mismo radio que el agua (1.4 Å), y así se habla de la superficie accesible al disolvente ("solvent accessible surface").

Para ejecutar este programa, escrito en FORTRAN 77, se utilizó una plataforma UNIX. Estos cálculos se realizaron en colaboración con los Profesores Pedersen y Andersen de la empresa Novo Nordisk (ver Anexo II). Dado que la estructura de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 no ha sido resuelta hasta la fecha, se empleó como base para los cálculos de accesibilidad la estructura de la CGTasa de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (Tabium-CGTasa) que corresponde al fichero 1A47.PDB. La homología entre las secuencias de ambas enzimas es superior al 91% (ver Anexo III). Por tanto, se sustituyeron los aminoácidos no coincidentes de la Tabium-CGTasa por aquellos de la enzima de *Thermoanaerobacter*, se minimizó la energía para obtener la conformación más estable y se aplicó sobre esta nueva estructura el algoritmo del programa NACCESS. Para estos cálculos no se tienen en cuenta los átomos de hidrógeno ni las moléculas de agua de cristalización.

El programa genera un fichero que contiene la accesibilidad absoluta de los distintos residuos de la proteína (suma de las áreas superficiales accesibles de cada uno de los átomos que integran dicho residuo). También proporciona datos de accesibilidad relativa, definida por la accesibilidad de un aminoácido con relación a la que presentaría en el tripéptido modelo ALA-X-ALA, donde X es el aminoácido en cuestión (Hubbard y cols., 1991). Los átomos de carbono en posición  $\alpha$  son considerados parte de la cadena lateral del aminoácido, de modo que a las glicinas también se le asignan datos de accesibilidad absoluta y relativa de su cadena lateral.

## 6. ELIMINACIÓN DEL DEXTRANO DE LA DEXTRANSACARASA

Para eliminar el dextrano que acompaña a la preparación de dextransacarasa es necesario someter la muestra a una hidrólisis enzimática, empleando una dextransasa. Es aconsejable que la dextransasa sea muy pura ya que estas preparaciones extracelulares, procedentes de hongos (de especies del género *Penicillium*), contienen cantidades elevadas de proteasas. Incluso si se utiliza dextransasa muy pura, conviene realizar una cromatografía de intercambio iónico para eliminar las posibles proteasas contaminantes. Estos experimentos se desarrollaron en colaboración con los Profesores Monsan, Remaud y Willemot del Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas de Toulouse.

## 7. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA DEXTRANSACARASA

La actividad de la dextransacarasa fue evaluada por seguimiento de la producción inicial de fructosa, usando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) empleado para la CGTasa, con las siguientes variaciones (Summer y Howell, 1935):

*La reacción se lleva a cabo a 30°C en tampón acetato 20 mM (pH 5.4), conteniendo CaCl<sub>2</sub> 0.05 g/l, sacarosa 100 g/l y 0.2-1 U/ml de dextransacarasa (Tabla III.5). La mezcla de reacción (en ausencia de la enzima) se incuba durante 5 min a 30°C, a continuación se añade la dextransacarasa comenzando la reacción. A intervalos de 5 min, se extraen del matraz de reacción alícuotas de 200 µl y se añaden a 200 µl de DNS en hielo. Los tubos de muestra y de la curva de calibrado se incuban a 90°C durante 5 min. A continuación se enfrían, se mezclan con 2 ml de agua destilada y se mantienen en hielo durante 15 min. Finalizado este período, se mide la absorbancia a 540 nm. Se prepara un control paralelo sin dextransacarasa, y se la somete al mismo protocolo.*

Una unidad de actividad dextransacarasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de fructosa por minuto en las condiciones descritas.

**Tabla III.5.** Curva de calibrado y mezcla de reacción empleadas para medir la actividad de la Dextransacarasa.

CURVA DE CALIBRADO		MEZCLA DE REACCION	
Reactivos	Volumen	Reactivos	Volumen
Disolución de fructosa 2 g/l	0-200 $\mu$ l	Dextransacarasa en tampón acetato 20 mM (pH 5.4)	2200 $\mu$ l
Agua destilada	200-0 $\mu$ l		(Concentración final: 0.2 –1 U/ml)
Disolución de DNS <sup>a</sup>	200 $\mu$ l	Tampón acetato 200 mM (pH 5.4)	400 $\mu$ l
		Disolución de CaCl <sub>2</sub> 0.5 g/l	400 $\mu$ l
		Disolución de sacarosa 400 g/l	1000 $\mu$ l

<sup>a</sup> Disolución de DNS: 10 g de DNS, 300 g de tartrato de sodio y potasio (sal de Rochelle), 16 g de NaOH y agua destilada hasta completar un volumen de 1 litro.

## 8. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LA DEXTRANSACARASA

Se incubó la dextransacarasa -nativa o inmovilizada- (aproximadamente 1.5 U/ml determinadas por el ensayo de DNS) a 30°C con agitación magnética en distintos disolventes orgánicos (N,N-dimetilacetamida, N,N-dimetilformamida, acetona, alcohol *tert*-amílico y dimetilsulfóxido) o en mezclas disolvente orgánico/agua de distintas proporciones. Para cada punto de la curva de actividad residual vs tiempo se prepara un matraz con la enzima en el disolvente de estudio. A diferentes tiempos, la actividad residual se ensaya por el método del DNS previa adición de 8 ml de una mezcla de reacción al matraz enzimático. El volumen final es de 10 ml y las concentraciones en el medio de reacción: tampón acetato 20 mM (pH 5.4), CaCl<sub>2</sub> 0.05 g/l y sacarosa 100 g/l.

El ensayo de actividad se realizó con agitación intensa para evitar las limitaciones difusionales derivadas de los soportes (Alcalde y cols., 1998b).

## 9. INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE LA DEXTRANSACARASA EN SILICE POROSA

Se siguió la metodología descrita por Monsan y cols. (López y Monsan, 1980; Monsan y López, 1981a; Monsan y López, 1981b; Monsan y cols., 1987) con algunas variaciones. Las características de los soportes utilizados se recogen en la Tabla III.6.

**Tabla III.6.** Principales características de las sílices porosas utilizadas en la inmovilización de la dextransacarasa.

CARACTERÍSTICAS	SILICE X200		SILICE X030	
Tamaño de partícula ( $\mu$ )	100-300		100-300	
Diámetro de poro ( $\text{Å}$ )	150 <sup>a</sup>	130 <sup>b</sup>	600 <sup>a</sup>	550 <sup>b</sup>
Area superficial específica ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	185 <sup>a</sup>	195 <sup>b</sup>	50 <sup>a</sup>	68 <sup>b</sup>
Volumen de poros ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	1		1	

<sup>a</sup> Según catálogo.

<sup>b</sup> Cálculos realizados por la Unidad de Apoyo del Instituto de Catálisis, mediante porosimetría de mercurio, empleando un porosímetro Micromeritics Poresizer 9320.

Tanto la sílice X200 como la X030 se silanizaron y se activaron con glutaraldehído antes de la inmovilización de la enzima.

### 9.1 AMINACION DE LA SILICE

Se prepara una solución al 6% (v/v) de  $\gamma$ -aminopropil-trimetoxisilano (100 ml), pH 4.4, y se le añaden 10 gramos de sílice (Fig. III.12). La suspensión se mantiene durante 1 h a 70°C con agitación moderada. A continuación se separa el soporte y se lava extensivamente (5 x 1 litro) con agua desionizada. Por último, se filtra la sílice y se seca a 60°C hasta que el peso del soporte sea constante.

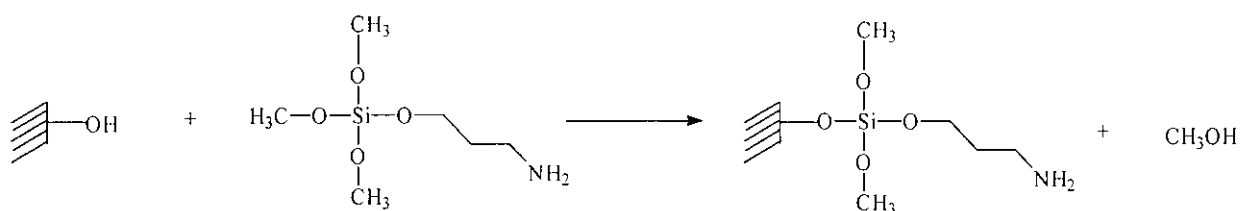


Figura III.12. Proceso de silanización de la sílice.

## 9.2 ACTIVACIÓN DEL SOPORTE CON GLUTARALDEHIDO

Para la activación de 100 mg de sílice silanizada (Fig. III.13) se emplean 20 ml de una solución de glutaraldehído al 2.5% (v/v) en tampón pirofosfato 0.05 M (pH 8.6), preparada a partir de un solución comercial de glutaraldehído en agua al 25%. La muestra se mezcla utilizando un agitador de rodillos (Selecta) durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación se recupera la sílice porosa activada mediante filtración en una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ . El exceso de glutaraldehído es separado mediante lavado -4 veces- a 20°C con 20 ml de tampón pirofosfato 0.05 M (pH 8.6). Por último, se lava 2 veces con 20 ml de tampón acetato 50 mM (pH 5.4). La sílice activada, es estable en tampón acetato 50 mM (pH 5.4) a 4°C.

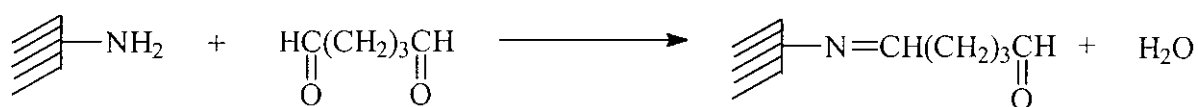
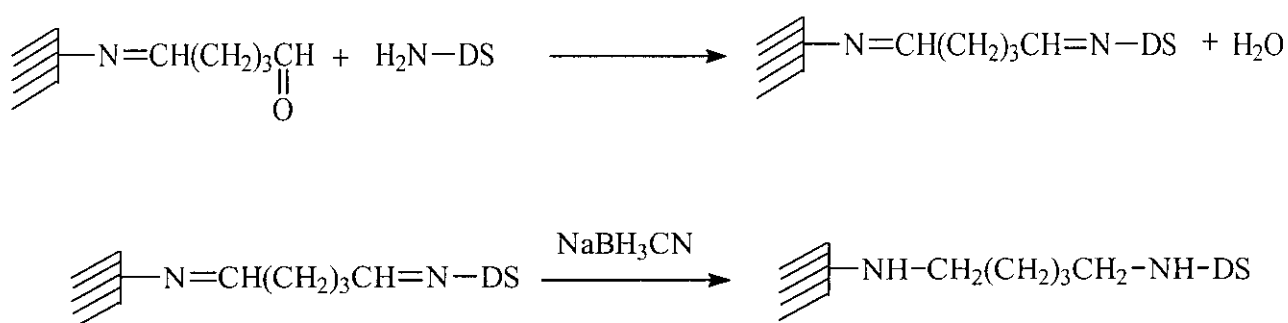


Figura III.13. Activación de la sílice con glutaraldehído.

## 9.3 INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA

La inmovilización de la enzima se llevó a cabo en tampón acetato 50 mM (pH 5.4). Así, 10 ml de una disolución de dextransacarasa, con una actividad de 10.5 U/ml, se ponen en contacto con 100 mg de sílice activada, durante 12 h a 4°C, en el agitador de rodillos. Después de extraer el sobrenadante, el soporte con la enzima inmovilizada se lava durante 30 min a 4°C, con NaCl 1 M en tampón acetato 50 mM (pH 5.4). De esta forma se elimina toda la proteína que no haya interactuado covalentemente con el soporte. Seguidamente, la muestra se lava 2 veces con 15 ml de tampón acetato 50 mM (pH 7.0) y se añade NaBH<sub>3</sub>CN (Fig. III.14) en

relación 1:1 respecto al peso de proteína, manteniéndose con agitación durante 3 h a temperatura ambiente. La enzima inmovilizada se conserva como una suspensión en tampón acetato 50 mM (pH 5.4), a 4°C. Al mismo tiempo se prepararon dos controles: el primero de ellos, utilizando 10 ml de solución de dextransacarasa 10.5 U/ml en ausencia de sílice, y el segundo con solución enzimática y el soporte no activado con glutaraldehído. Ambos controles se someten a las mismas condiciones de inmovilización. Con el primer blanco, se estudió si la enzima perdía actividad, y con el segundo se comprueba que la enzima no se une al soporte mediante adsorción.



**Figura III.14.** Interacción de la dextransacarasa (DS) con el soporte activado. La adición de cianoborohidruro sódico origina la reducción de la base de Schiff con lo que el enlace se refuerza, evitando que la dextransacarasa se separe del soporte.

## 10. INMOVILIZACIÓN DE LA DEXTRANSACARASA POR ATRAPAMIENTO EN ALGINATO CALCICO

Se ha seguido el procedimiento básico de inmovilización en alginato cálcico descrito en los trabajos de Quirasco y cols. (1995), Reischwitz y cols. (1995), y Reh y cols. (1996) con algunas modificaciones.

Se prepara una solución de alginato SG-300 al 4% en 25 ml de agua desionizada y desgasificada. Se somete a agitación vigorosa, a temperatura ambiente, hasta que se forma un gel homogéneo (5 h). Seguidamente se pesan 10 g de la solución de alginato y se le añaden 10 ml de una solución de dextransacarasa en tampón acetato 10 mM (pH 5.4), con una actividad de 5 U/ml. La mezcla se agita durante al menos 1 h, hasta que se hayan eliminado todas las burbujas. A continuación, sobre una solución de cloruro cálcico 200 mM en tampón acetato 50 mM (pH 5.4), con agitación magnética, se gotea la mezcla enzimática. Para ello se emplea

una bomba peristáltica, con un flujo adecuado que permita que el tamaño de las bolas de alginato cálcico sea el más homogéneo posible. La distancia entre el tubo de goteo y la solución de alginato cálcico debe ser al menos de 5 cm. El diámetro de las bolas debe oscilar entre 0.8-3.0 mm. Las bolas formadas se dejan en la solución de alginato cálcico, con agitación moderada, durante 2 h a temperatura ambiente. De esta forma se consolida el endurecimiento de la esfera de alginato. Se prepara un control de solución enzimática, y se somete a agitación el mismo período de tiempo que transcurre para la enzima durante la inmovilización. La enzima inmovilizada puede almacenarse durante largos períodos de tiempo a 4°C en tampón acetato 50 mM (pH 5.4), conteniendo 0.2 M de  $\text{CaCl}_2$  y 0.02% de azida sódica.

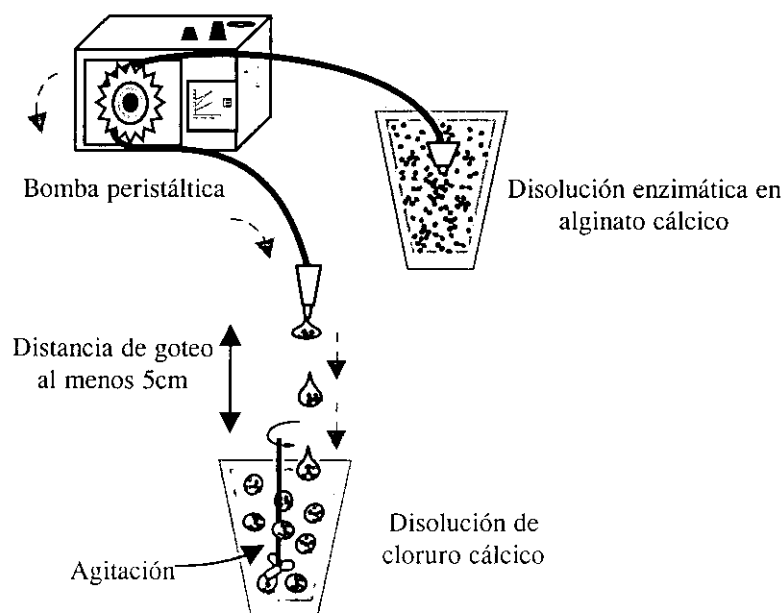


Figura III.15. Procedimiento de inmovilización en alginato cálcico.

## 11. REACCION DE ACEPTOR

Para el estudio de las reacciones con aceptores se empleó maltosa como aceptor, por ser el que mejor resultado proporciona a este sistema enzimático. La detección de los productos de reacción se realizó mediante el mismo equipo de HPLC descrito para la CGTasa (apartado 3.2), pero en las siguientes condiciones:

Se empleó una columna de fase reversa Nucleosil C18 de Sugelabor (0.46 x 25 cm, 5  $\mu\text{m}$ ), con agua desionizada y desgasificada como fase móvil (flujo 0.5 ml/min). La temperatura de la columna se mantuvo constante a 45°C. Como patrones se utilizaron maltooligosacáridos (G1-G7) e isomaltooligosacáridos (G1-G4).

El protocolo de la reacción de aceptor es el siguiente:

*La dextran sacarasa nativa o inmovilizada (aproximadamente 3 unidades, determinadas por el ensayo del DNS) se incubó a 30°C con agitación magnética en 10 ml de una disolución de tampón acetato 20 mM (pH 5.4) conteniendo CaCl<sub>2</sub> 0.05 g/l y distintas relaciones maltosa/sacarosa: 1:5, 1:1, 2:1, 4:1 y 6:1. La concentración de sacarosa siempre fue constante (100 mM). A diferentes tiempos se extraen alícuotas de 200 µl y se incuban durante 20 min a 80°C para detener la reacción. A continuación se centrifugan durante 15 min a 10000 rpm. El sobrenadante se vuelve a centrifugar a 6000 rpm en ependorf con filtro (membrana de corte 0.45 µm) para eliminar el dextrano que se haya podido producir en la reacción. Las muestras se diluyen con tres volúmenes de agua destilada y se analizan en el HPLC.*

## **12. TECNICAS COMUNES A LOS DOS SISTEMAS ENZIMATICOS**

### **12.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEINA**

Se escogió como método para la determinación de la concentración de proteína el microensayo de Bio-Rad (Bradford, 1976) por tratarse de un protocolo rápido, preciso, y muy sensible. Como proteína patrón se empleó la inmunoglobulina G.

### **12.2 ELECTROFORESIS**

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo sobre un gel de poliacrilamida al 5-10%, según los casos, siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). Se utilizó un aparato de Hoefer (Modelo SE 245). Se analizaron disoluciones enzimáticas de concentración aproximada 0.5 mg/ml. Se emplearon patrones de alto y bajo peso molecular de Pharmacia. La tinción se realizó con disolución de Coomassie R-250 al 0.04% en una mezcla metanol-acético-agua (45/5/50). Los geles se destiñeron por difusión en una solución de metanol-acético-agua (9/1/10).



### 12.3 ISOELECTROENFOQUE

Los experimentos de isoelectroenfoque fueron realizados en un aparato de Hoefer (Modelo SE 245) utilizando geles de poliacrilamida y anfolitos de pH 3-10. Se emplearon soluciones enzimáticas de concentración aproximada 3 mg/ml. El protocolo experimental seguido fue el habitual (Righetti, 1983). Los geles se tiñeron con plata. Para la estimación de los puntos isoeléctricos, se usaron patrones de Bio-Rad con  $pI$  en los intervalos 3.6-5.9 y 3.6-9.3 contrastados con un electrodo de vidrio de contacto acoplado a un pH-metro Radiometer pHM93.

# IV. RESULTADOS

## 1. PURIFICACION DE LA CGTasa

- 1.1 PURIFICACION CON LA MATRIZ AFFI-T
- 1.2 PURIFICACION CON LA MATRIZ DE AFINIDAD SEPHAROSA/ $\alpha$ -CICLODEXTRINA

## 2. MODIFICACION QUIMICA DE LA CGTasa

- 2.1 ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD DE LA REACCION EN FUNCION DEL pH
- 2.2 MODIFICACION DE LOS GRUPOS AMINO
  - 2.2.1 CARACTERIZACION DE LAS ESPECIES MODIFICADAS
    - a) *Determinación del grado de modificación*
    - b) *Efecto de la acilación en el punto isoeléctrico*
  - 2.2.2 EFECTO DE LA MODIFICACION SOBRE LAS ACTIVIDADES INICIALES
  - 2.2.3 EFECTO DE LA MODIFICACION SOBRE LA PRODUCCION DE CICLODEXTRINAS Y OLIGOSACARIDOS
- 2.3 MODIFICACION DE LOS GRUPOS CARBOXILO
  - 2.3.1 CARACTERIZACION DE LAS ESPECIES MODIFICADAS
    - a) *Determinación del grado de modificación*
  - 2.3.2 EFECTO DE LA MODIFICACION SOBRE LAS ACTIVIDADES INICIALES
  - 2.3.3 EFECTO DE LA MODIFICACION SOBRE LA PRODUCCION DE CICLODEXTRINAS Y OLIGOSACARIDOS
- 2.4 MODIFICACION DE LA CISTEINA

## 3. INMOVILIZACION DE LA DEXTRANSACARASA

- 3.1 INMOVILIZACION COVALENTE EN SILICE POROSA
  - 3.1.1 ELIMINACION DEL DEXTRANO
    - Determinación del peso molecular*
    - Actividad y estabilidad*
  - 3.1.2 INMOVILIZACION
  - 3.1.3 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA
- 3.2 INMOVILIZACION POR ATRAPAMIENTO EN ALGINATO
  - 3.2.1 RENDIMIENTO DE LA INMOVILIZACION
  - 3.2.2 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA
- 3.3 ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD EN PRESENCIA DE DISOLVENTES ORGANICOS
  - 3.3.1 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD CATALITICA
  - 3.3.2 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

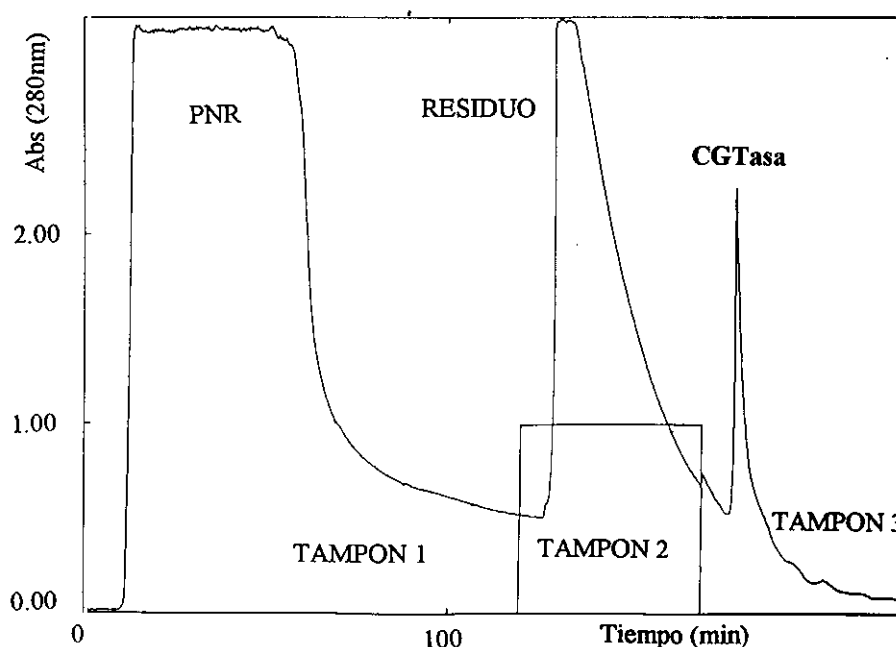
## 4. REACCION DE ACEPTOR DE LA DEXTRANSACARASA

- 4.1 EVOLUCION DE LA REACCION
- 4.2 REUTILIZACION DEL BIOCATALIZADOR

# 1 PURIFICACION DE LA CGTasa

## 1.1 PURIFICACIÓN CON LA MATRIZ AFFI-T

La purificación de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 se llevó a cabo a partir de un extracto crudo de la empresa Novo Nordisk. Dicha preparación procede del cultivo de *Thermoanaerobacter* sp. 501 durante 40 h a 70°C en un medio salino neutro (Starnes y cols., 1991). El extracto celular se centrifuga a 8000xg (30 min, a 4°C). El sobrenadante del proceso contiene la CGTasa así como proteasas y  $\alpha$ -amilasas contaminantes, que deben ser eliminadas. En la Fig. IV.1 se muestra el perfil de purificación obtenido mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) empleando una matriz de afinidad, AFFI-T. Tras lavar con el primer tampón (sulfato amónico 1.5 M, pH 7.0), se eluye un primer pico coloreado (parte no retenida, PNR), con escasa actividad CGTasa. Con el segundo tampón (borato 10 mM, pH 7.0), se obtiene un pico ("residuo") con ligera actividad CGTasa. Finalmente se lava con tampón borato 10 mM/isopropanol 1/1, apareciendo un pico de intensa actividad CGTasa. Las fracciones de éste último pico (CGTasa purificada) se dializan en tampón fosfato 10 mM (pH 7.0), para eliminar el isopropanol. Todos los pasos de la purificación se llevaron a cabo a temperatura ambiente, dada la alta estabilidad de la CGTasa. En las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia se determinó la actividad de ciclación a  $\beta$ -ciclodextrina.



**Figura IV.1.** Purificación de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 utilizando de una matriz de afinidad (AFFI-T). PNR (parte no retenida), tampón 1 (sulfato amónico 1.5 M, pH 7.0), tampón 2 (borato 10 mM, pH 7.0), tampón 3 (borato 10 mM (pH 7.0) / isopropanol 1:1).

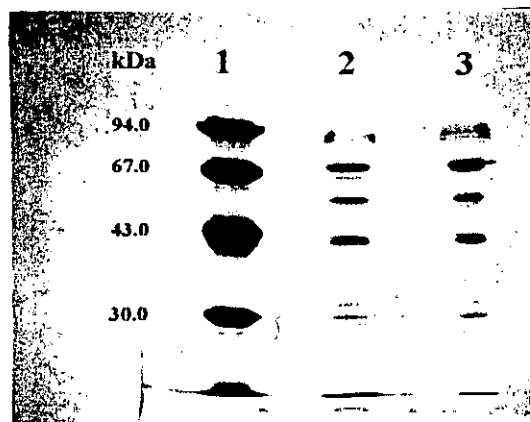
En la Tabla IV.1 se recogen los datos de una de las purificaciones desarrolladas. Se obtuvo un factor de purificación de 3 y un rendimiento de actividad recuperada de 12.8% para la CGTasa purificada.

**Tabla IV.1.** Resultados de la purificación con la matriz de afinidad AFFI-T. Las medidas de actividad se realizaron con el ensayo de fenoltaleína (actividad de ciclación a  $\beta$ -ciclodextrina).

MUESTRA	Vol (ml)	[Proteína] (mg/ml)	mg proteína	U/ml	U totales	Rendimiento (%)	U/mg proteína	Factor de purificación
CRUDO	20	9.5	190	583	11660	100	61.2	1
PNR <sup>a</sup>	50	2.6	130	33.2	1665	----	12.8	----
RESIDUO	30	1.5	45	38.8	1165	----	26.0	----
CGTasa PURA	17	0.5	8.2	88	1495	12.8	183	3

<sup>a</sup> PNR (parte no retenida).

La electroforesis en condiciones desnaturalizantes (en presencia de SDS), de la enzima purificada mostró una banda principal en torno a 70.000 Da (ver Fig. IV.2) correspondiente a la CGTasa. Además, aparecieron otras bandas no caracterizadas.



**Figura IV.2.** Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) del extracto crudo y de la CGTasa purificada. Línea 1: kit de proteínas de bajo peso molecular (Fosforilasa B, 94 kDa; BSA, 67 kDa; Ovoalbúmina, 43 kDa; Anhidrasa carbónica, 30 kDa). Línea 2: extracto crudo. Línea 3: CGTasa purificada en matriz de afinidad AFFI-T. Los gels se tiñeron con azul de Coomassie.

## 1.2 PURIFICACIÓN CON LA MATRIZ DE AFINIDAD SEPHAROSA/ $\alpha$ -CICLODEXTRINA

Se estudió un protocolo alternativo para la purificación de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501, empleando un gel de afinidad de Sepharosa/ $\alpha$ -ciclodextrina, a partir de extractos crudos similares a los de la anterior purificación. La Fig. IV.3 recoge uno de los perfiles de purificación obtenidos con este sistema. El primer pico corresponde a la parte no retenida del extracto crudo, que es eluida con tampón acetato 10 mM (pH 5.5) y carece de actividad de ciclación. La CGTasa se une a la  $\alpha$ -ciclodextrina de la matriz activada, reteniéndose en el gel. Cuando ya habían pasado aproximadamente 350 ml del primer tampón, se lavó con tampón acetato 10 mM (pH 5.5) conteniendo 1% de  $\alpha$ -ciclodextrina. En estas condiciones, la CGTasa se despegó del gel de Sepharosa al existir una mayor concentración de ciclodextrina en el tampón de elución, interaccionando con esta última y eluyendo de la columna (segundo pico). La CGTasa pura puede almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante largos períodos de tiempo (meses), en el propio tampón de elución (en presencia de  $\alpha$ -ciclodextrina).

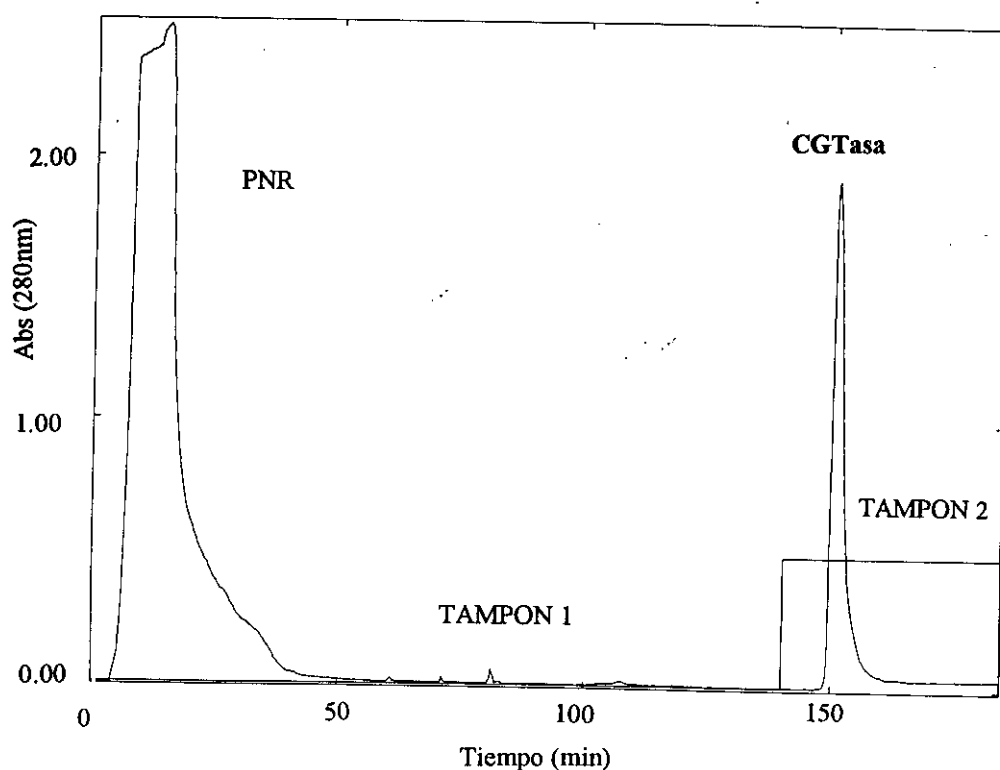


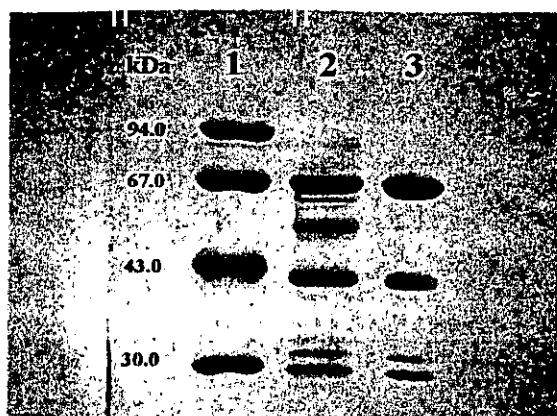
Figura IV.3. Purificación de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 a través de una matriz de afinidad Sepharosa/ $\alpha$ -ciclodextrina. PNR (parte no retenida), Tampón 1 (acetato 10 mM, pH 5.5), Tampón 2 (acetato 10 mM, pH 5.5 con 1% de  $\alpha$ -ciclodextrina).

La purificación se desarrolló a temperatura ambiente. En las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia se determinó la actividad de ciclación a  $\beta$ -ciclodextrina. Con este proceso, se obtuvieron rendimientos cercanos al 70% y factores de purificación en torno a 4-5. La Tabla IV.2 muestra los datos de una de las purificaciones realizadas.

**Tabla IV.2.** Resultados de la purificación con la matriz de afinidad Sepharosa/ $\alpha$ -ciclodextrina.

MUESTRA	Vol (ml)	[proteína] (mg/ml)	mg proteína	U/ml	U totales	Rendimiento (%)	U/mg proteína	Factor de purificación
CRUDO	4	10	40	537	2040	100	54	1
CGTasa	15	0.4	6.0	87	1305	64	223	4.1

La electroforesis en condiciones desnaturizantes (en presencia de SDS) de la CGTasa purificada, mostró una banda principal en torno a 70.000 Da (ver Fig. IV.4) correspondiente a la CGTasa. Además, como en la purificación anterior (utilizando la matriz de afinidad AFFIT), aparecieron bandas minoritarias, aunque en menor número. Estos resultados están en concordancia con los de Wind y cols., (1995 y 1998a), que consideran dichas bandas como productos de degradación de la CGTasa. Esta hipótesis fue corroborada mediante experimentos de afinidad llevados a cabo por el Dr. Carsten Andersen de la empresa Novo Nordisk.



**Figura IV.4.** Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), del extracto crudo, y de la CGTasa purificada. Línea 1: kit de proteínas de bajo peso molecular (Fosforilasa B, 94 kDa; BSA, 67 kDa; Ovoalbúmina, 43 kDa; Anhidrasa carbónica, 30 kDa). Línea 2: Extracto crudo. Línea 3: CGTasa purificada en matriz de afinidad sepharosa/ $\alpha$ -ciclodextrina. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

## 2. MODIFICACION QUIMICA DE LA CGTasa

### 2.1 ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD DE LA REACCION EN FUNCION DEL pH.

Los experimentos de modificación química aplicados a la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 suponían, en la mayoría de los casos, una alteración de la carga de determinados residuos de la proteína. Con el objeto de determinar si dichos cambios podían afectar a la selectividad  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ -ciclodextrina, se llevó a cabo un estudio previo de la reacción de ciclación a diferentes valores de pH.

La Fig. IV.5 representa los resultados del estudio de la selectividad de la reacción (producción de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -ciclodextrina) en función del pH, a las 6 y 24 h de reacción. Como se puede apreciar, el comportamiento de la CGTasa es bastante estable en un amplio intervalo de pH (4.5-7.5), en el que no varían ni la selectividad de la reacción ni la conversión de almidón a ciclodextrinas. Solamente a pH extremos (3.5 ó 9.5) se producen cambios reseñables que afectan especialmente a la producción de  $\beta$ -ciclodextrina, de modo que el producto mayoritario es  $\alpha$ -ciclodextrina, siendo la producción neta de ciclodextrinas a las 24 h notablemente menor.

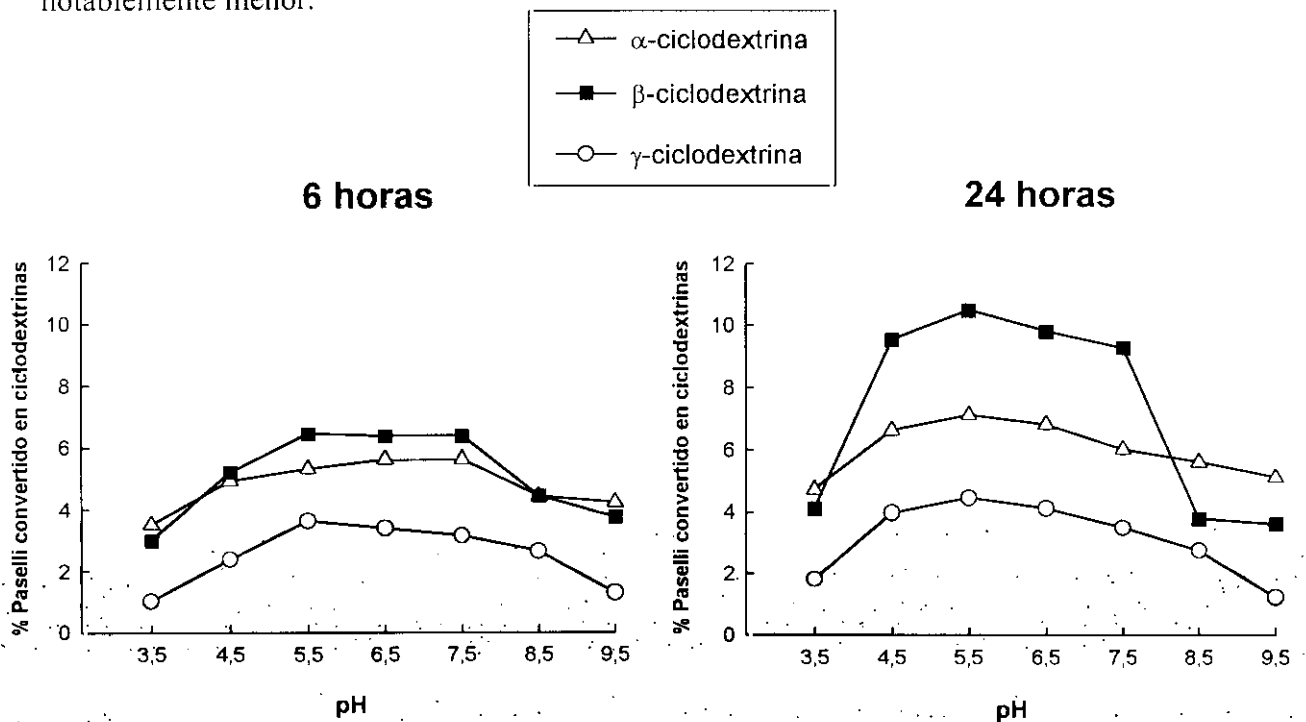
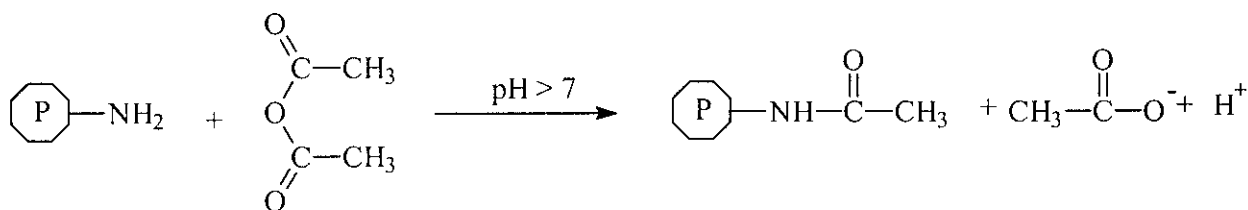


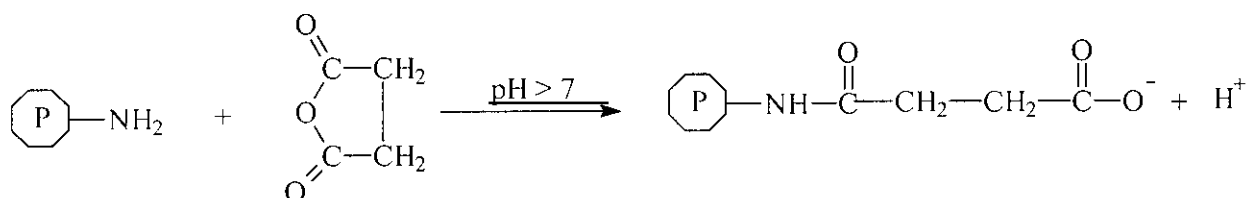
Figura IV.5. Producción de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -ciclodextrinas, en función del pH del medio de reacción (3.5-9.5) y del tiempo de reacción (6-24 horas).

## 2.2 MODIFICACIÓN DE LOS GRUPOS AMINO

Para la modificación de los grupos amino de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 se emplearon dos reactivos diferentes: el anhídrido acético y el anhídrido succínico (ver Fig. IV.6 y IV.7). Se diseñó un protocolo experimental con el objeto de conseguir el mayor grado de sustitución posible. Dicho protocolo se aplicó en primer término a una proteína patrón, la seroalbumina bovina (BSA) -con una masa molecular de 69.000 Da, y que presenta 59 Lys y 20 Tyr-. Tras la modificación de la BSA con anhídrido acético, se obtuvieron grados de modificación en torno al 90% y 50% de Lys y Tyr sustituidas respectivamente, y 88% de Lys modificadas con anhídrido succínico. Por lo tanto, se decidió emplear la misma metodología con la CGTasa.



**Figura IV.6.** En la reacción de acetilación la carga positiva del grupo  $\epsilon$ -amino de la Lys es eliminada generándose una acetamida neutra.

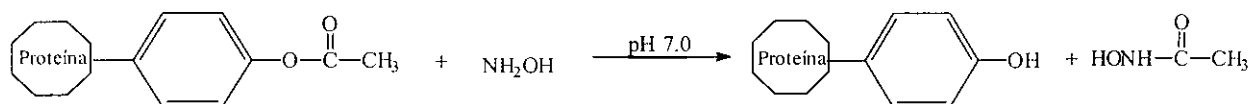


**Figura IV.7.** En la reacción de succinilación la carga positiva es reemplazada por un grupo carboxilato cargado negativamente.

Las cortas cadenas de los anhídridos muestran una baja selectividad hacia la acilación de los grupos amino. Así, también es posible la modificación de otras cadenas laterales de la proteína, tales como el grupo hidroxilo de la Tyr; el grupo tiol de la Cys y el grupo imidazol de la His. Tanto las His como las Cys se desacilan espontáneamente en las condiciones de reacción. Sin embargo, para la regeneración de los residuos de Tyr, es necesario tratar la proteína con hidroxilamina (Means y cols., 1971; Lundblad, 1991). Las O-acetiltirosinas

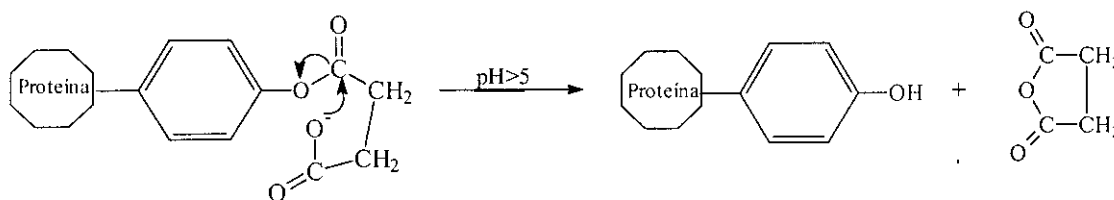


pueden ser hidrolizadas lentamente bajo moderadas condiciones alcalinas, o pueden ser escindidas a pH neutro por incubación con hidroxilamina. En tales casos la desacetilación va acompañada de un incremento de la absorbancia a 278 nm ( $\epsilon_{278}=1160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).



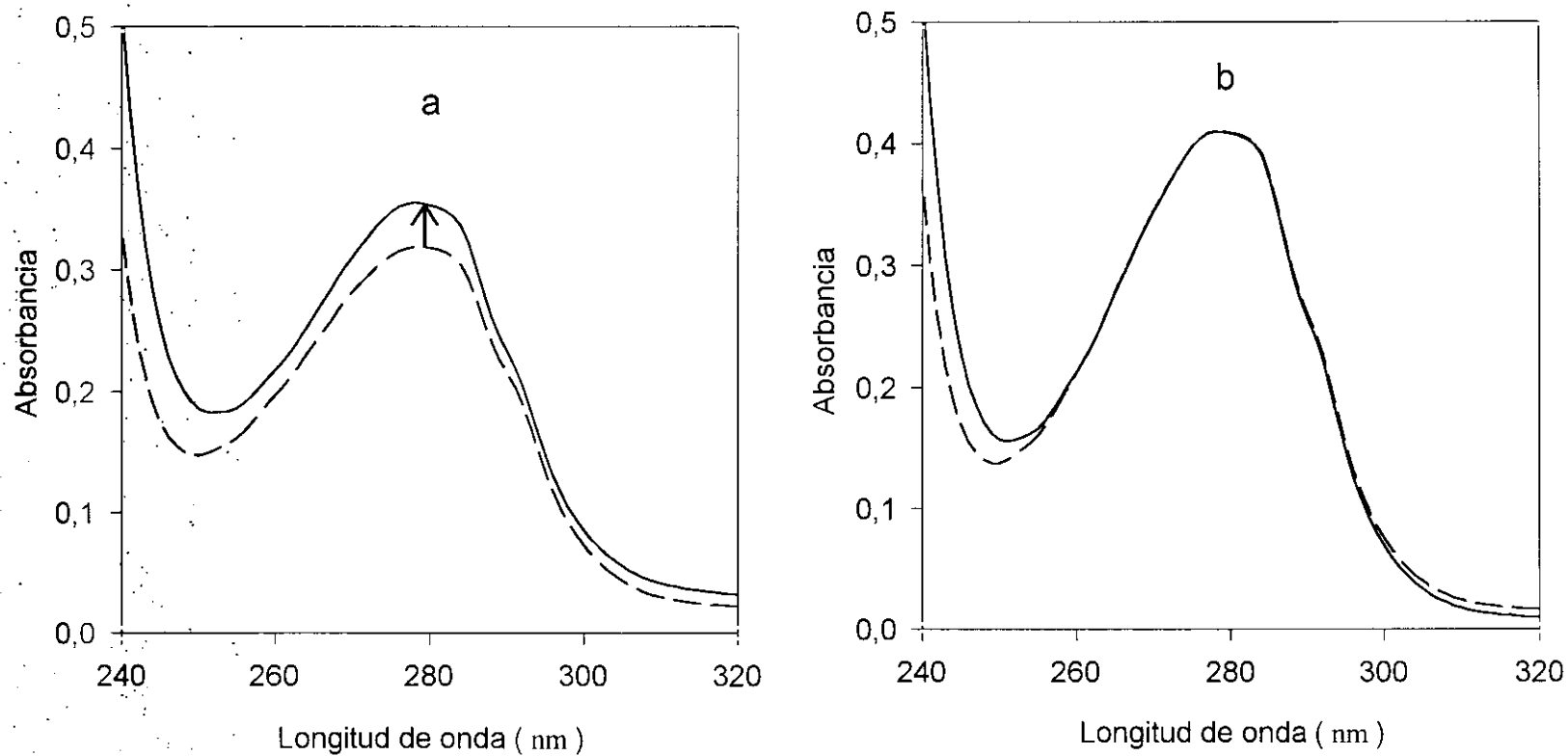
**Figura IV.8.** Desacetilación de las tirosinas en presencia de hidroxilamina. La regeneración de la Tyr libera como subproducto acetil-hidroxamato. La reacción se puede seguir espectrofotométricamente, permitiendo calcular el número de Tyr modificadas.

En cuanto a los residuos de O-succiniltirosina formados tras el tratamiento de la CGTasa con anhídrido succínico, sufren una rápida hidrólisis intramolecular a valores de pH superiores a 5, por lo que se regeneran los residuos de Tyr originales. Sin embargo, también se forman derivados succinilados de aminoácidos alifáticos (Ser o Thr) que no se hidrolizan espontáneamente, pero pueden regenerarse tras el tratamiento con hidroxilamina.



**Figura IV.9.** Desuccinilación espontánea de las tirosinas. A valores de pH superiores a 5, las O-succiniltirosinas se regeneran, recuperándose el anhídrido succínico inicial.

La Fig. IV.10 muestra los cambios en el espectro UV de la CGTasa modificada con anhídrido acético o anhídrido succínico, durante el tratamiento con hidroxilamina. La desacetilación se completó en 1 h; sin embargo, se mantuvo la incubación durante 5 h para asegurar la eliminación cuantitativa de los grupos acetilo de las tirosinas. A partir del incremento en la absorbancia a 278 nm, se calculó que un 18% de las tirosinas (8 de 44) fueron inicialmente acetiladas, y más tarde desacetiladas mediante el tratamiento con hidroxilamina. Respecto a las O-succiniltirosinas, como era presumible, se regeneran espontáneamente y en el análisis a esa longitud de onda no se detecta cambio espectral.



**Figura IV.10.** Análisis del espectro UV de la acetil-CGTasa (a), y de la succinil-CGTasa (b); antes de adicionar la hidroxilamina (línea discontinua), y una hora después de haberla incubado con hidroxilamina (línea continua).

## 2.2.1 CARACTERIZACION DE LAS ESPECIES MODIFICADAS

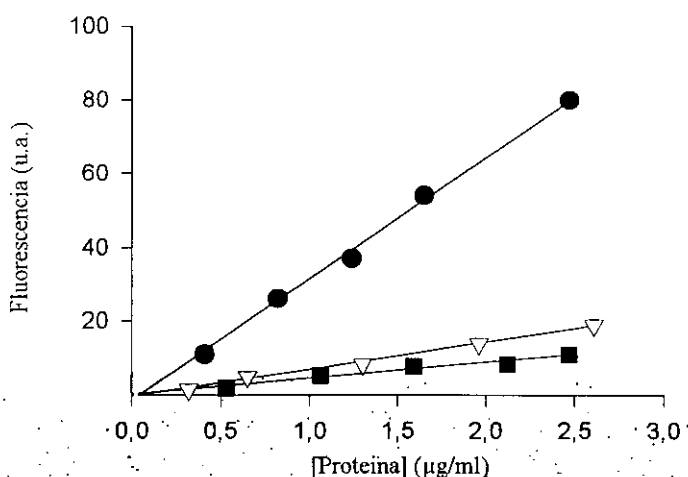
### a) Determinación del grado de modificación

El grado de modificación de las proteínas ensayadas fue calculado empleando dos metodologías diferentes, con las que se obtuvieron resultados similares. Tanto mediante el ensayo con el ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) (Habeeb, 1966), como con fluorescamina (Stocks y cols., 1986), se comprobó que las sustituciones fueron extensivas (ver Tabla IV.3).

**Tabla IV.3.** Grados de modificación obtenidos para las CGTasas acetiladas y succiniladas.

Agente modificante	% modificación	Nº de grupos amino modificados	Método de determinación
Anhídrido acético	84	21	Fluorescamina y TNBS
Anhídrido succínico	80	20	Fluorescamina y TNBS

La Fig. IV.11 ilustra la determinación fluorimétrica del grado de sustitución. La CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 contiene 25 grupos amino (24 Lys y el grupo amino terminal). Bajo las condiciones de reacción descritas, la acetilación produjo la modificación de 21 aminos (el 84% del total). La modificación con anhídrido succínico dio lugar a un grado de sustitución ligeramente inferior al conseguido en la acetilación.

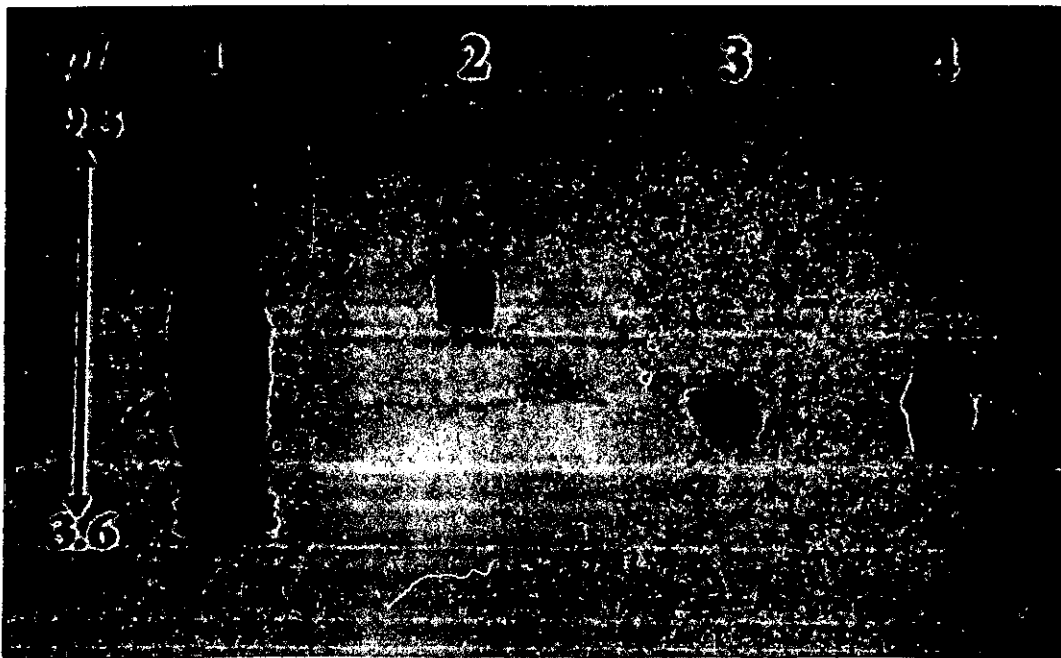


**Figura IV.11.** Intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) de la fluorescamina unida en la CGTasa nativa (●), en la especie acetilada (■), y en la succinilada (▽).

### b) Efecto de la acilación en el punto isoeléctrico

La modificación con anhídrido acético permite la transformación de cargas positivas en neutras, mientras que si se realiza con anhídrido succínico se transforman en negativas. Por consiguiente, la acilación cuantitativa de los grupos amino en la CGTasa (ya sea mediante acetilación o succinilación), debe producir una disminución de la carga positiva global del sistema, y en consecuencia, originar un descenso en su  $pI$ . Con objeto de cuantificar dicho efecto, se realizó un experimento de isoelectroenfoque en el intervalo de pH 3-10, con la CGTasa nativa, y las preparaciones modificadas. No existen datos en la literatura del punto isoeléctrico de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501.

Como se puede apreciar en la Fig. IV.12, se produce un desplazamiento en el punto isoeléctrico de la CGTasa desde valores neutros ( $pI$  6.3-6.7) hasta valores moderadamente ácidos ( $pI$  5.2-5.7). En teoría debería esperarse una mayor disminución del  $pI$  en la especie succinilada que en la acetilada; sin embargo, ambas quedan retenidas en la misma zona. Estos resultados están en concordancia con los de Gueguen y cols. (1990), en los que distintas modificaciones cuantitativas de grupos amino (obteniendo diferentes grados de sustitución), no suponen cambios apreciables de sus  $pI$  entre las especies modificadas.



**Figura IV.12.** Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida. Línea 1: kit de proteínas de diferentes  $pI$  (3.6, amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*, 5.9 anhidrasa carbónica II de eritrocitos bovinos; 6.6, anhidrasa carbónica I de eritrocitos humanos; 7.2, mioglobina de corazón de caballo; 8.8, Lectina de *Lens culinaris*; 9.3, tripsinógeno de pancreas bovino). Línea 2: CGTasa nativa. Línea 3: CGTasa acetilada. Línea 4: CGTasa succinilada. El gel se tiñó con plata.

## 2.2.2 EFECTO DE LA MODIFICACIÓN SOBRE LAS ACTIVIDADES INICIALES

Las actividades iniciales de ciclación, acoplamiento, transferencia e hidrólisis fueron evaluadas, tanto en la enzima nativa como en las especies modificadas (Tabla IV.4). Todos los ensayos descritos se realizaron en los 5 primeros minutos de reacción para evitar las interferencias entre los distintos procesos. Se preparó un blanco de modificación tal como se describe en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos, en ausencia de anhídrido acético o succínico, manteniendo la actividad después del tratamiento, de lo que se deduce que las condiciones de reacción no afectaron a la actividad catalítica de la CGTasa.

**Tabla IV.4.** Actividades iniciales de las CGTasas nativa y modificadas.

	<i>Actividad (U/mg proteína)</i>						
	CICLACION			ACOPLAMIENTO		HIDROLISIS	TRANSFERENCIA
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$		
<b>Nativa</b>	289	252	149	270	48	82	1530
<b>Acetilada</b>	70	74	50	56	4.0	127	510
<b>Succinilada</b>	225	218	117	114	23	71	1980

### *CGTasa acetilada*

Es de gran relevancia que la acetilación de los grupos amino de la CGTasa produzca una disminución significativa en todas las actividades específicas con excepción de la hidrólisis. Las velocidades de formación de ciclodextrinas con la enzima acetilada fueron 3-4 veces más bajas que las observadas en la enzima nativa, y un efecto similar tuvo lugar con la actividad de transferencia. Además, el acoplamiento de  $\alpha$ - y  $\beta$ -ciclodextrina con metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido fue 5 y 12 veces más rápido, respectivamente, para la enzima nativa en comparación con la especie acetilada. Sorprendentemente, la acetilación de la CGTasa no produjo una disminución significativa de la actividad hidrolítica, incluso la enzima modificada mostró una actividad de hidrólisis (127 U/mg proteína) mayor que la de la enzima nativa. En este punto, es importante destacar que la actividad hidrolítica de la CGTasa de *Thermoanaerobacter sp.* 501, tanto en su

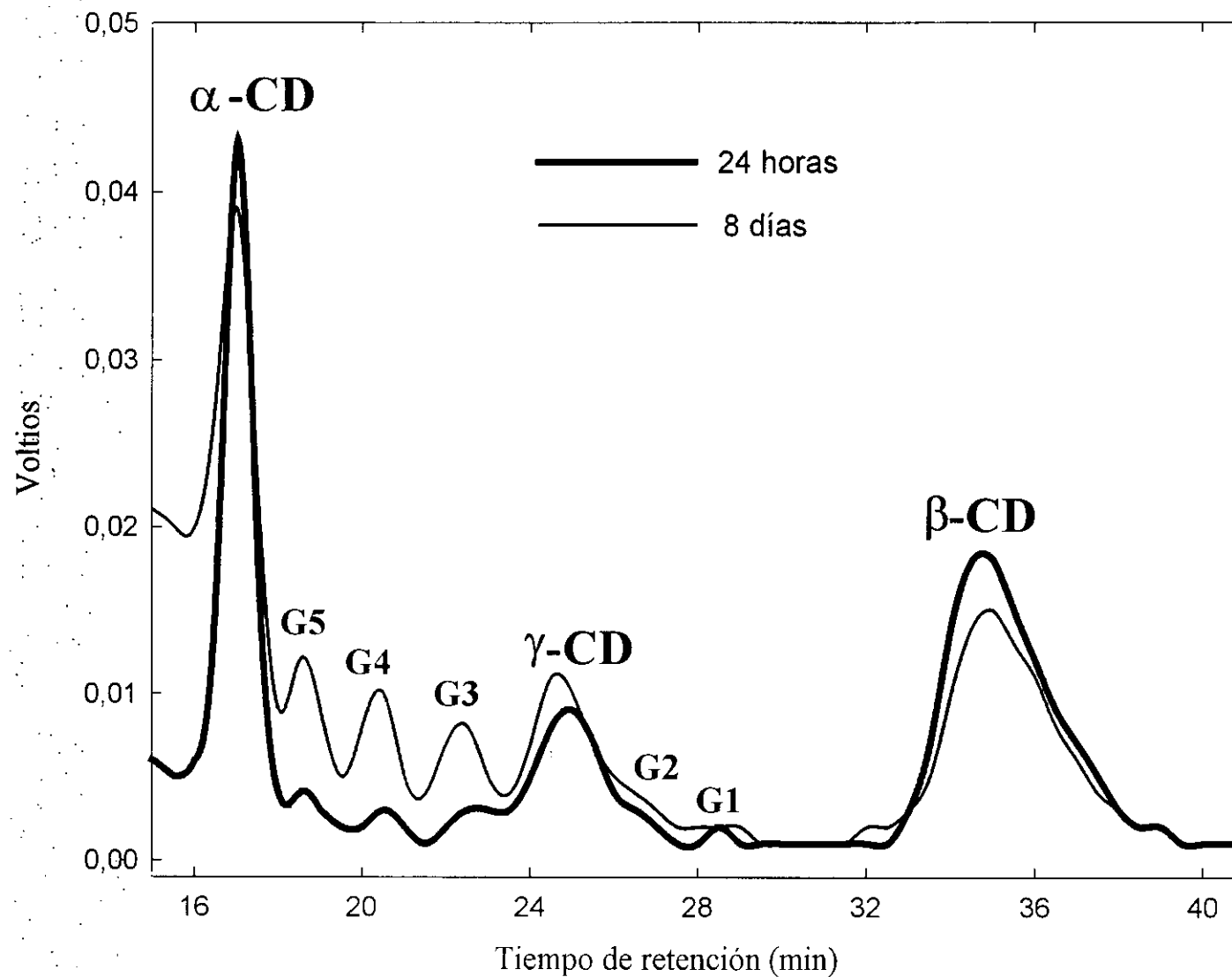
forma nativa como en sus variedades modificadas, posee los valores más altos descritos en la literatura para cualquier otra CGTasa. Por ejemplo, la CGTasa de *Bacillus circulans* cepa 251 tiene una actividad hidrolítica de 3 U/mg proteína (Penninga y cols., 1995). Hasta el momento, la CGTasa considerada con mayor capacidad de hidrólisis era la CGTasa de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (Tabium-CGTasa) con una actividad de 30 U/mg proteína para la enzima nativa, y 65 U/mg proteína para un mutante F196G (Wind y cols., 1998).

### ***CGTasa succinilada***

En cuanto a la succinilación, los cambios en las actividades iniciales en esta modificación fueron menores que los apreciados en la acetilación. Las actividades de ciclación y acoplamiento disminuyen suavemente. La hidrólisis no varía prácticamente, lo mismo que la actividad de transferencia (que incluso aumenta 1.3 veces).

## **2.2.3 EFECTO DE LA MODIFICACION SOBRE LA PRODUCCION DE CICLODEXTRINAS Y OLIGOSACARIDOS**

La formación de ciclodextrinas y oligosacáridos se analizó empleando condiciones similares a las de la industria (ver apartado 3.2 de Materiales y Métodos). La Fig. IV.13 recoge dos cromatogramas de HPLC de la mezcla de reacción a las 24 h y a los 8 días, empleando CGTasa nativa. Después de 1 día de reacción, la formación de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -ciclodextrina predomina sobre la de oligosacáridos de cadena corta. Sin embargo, a medida que avanza la reacción, la producción de oligosacáridos va aumentando de forma considerable, disminuyendo en consecuencia la formación global de ciclodextrinas.



**Figura IV.13.** Cromatogramas de HPLC de las mezclas de reacción a las 24 h y 8 días correspondientes al ensayo de producción empleando la CGTasa nativa. Condiciones: 85°C, 7.0  $\mu$ g de CGTasa y 2.5 g de Paselli SA2 en 10 ml de tampón citrato 10 mM (pH 5.5) conteniendo 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>.

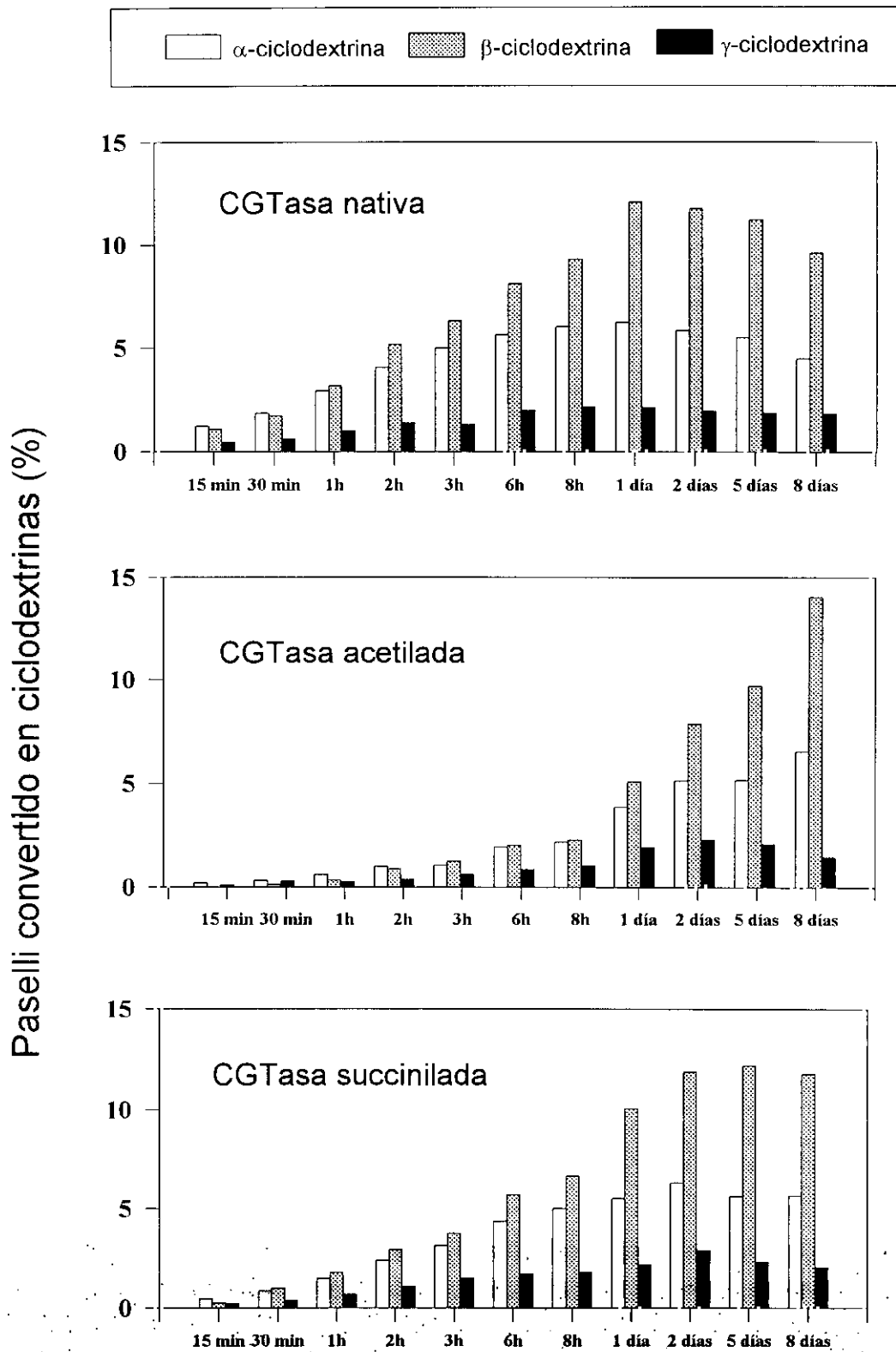
### ***CGTasa acetilada***

La Fig. IV.14 muestra la producción de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -ciclodextrina con el tiempo para la enzima nativa y sus variedades modificadas. En concordancia con los resultados de actividades iniciales expuestos en la Tabla IV.4, la producción inicial de ciclodextrinas es notablemente más baja con la CGTasa acetilada. La enzima nativa alcanza un máximo de producción de ciclodextrinas a las 24 h, mientras que para la enzima acetilada la producción de ciclodextrinas sigue aumentando incluso al cabo de los 8 días. Esto parece estar relacionado con la baja actividad de acoplamiento de la especie acetilada (Tabla IV.4), que minimiza significativamente la transformación de ciclodextrinas en oligosacáridos. Para la CGTasa acetilada, la relación molar  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ -ciclodextrina, tras 8 días de reacción, es 4.6:9.8:1 (en este punto, el 22% del Paselli inicial ha sido convertido en ciclodextrinas); para la enzima nativa, en el tiempo de máxima producción de ciclodextrinas (24 h) la relación es 2.9:5.6:1 (20.5% de Paselli convertido en ciclodextrinas). En cuanto a la formación de oligosacáridos, tal como se observa en la Fig. IV.15, la enzima acetilada exhibe una mayor productividad, probablemente como consecuencia de la mayor actividad hidrolítica que posee (4.25% de Paselli convertido en oligosacáridos, frente a 3.5% de la enzima nativa, tras 8 días de reacción).

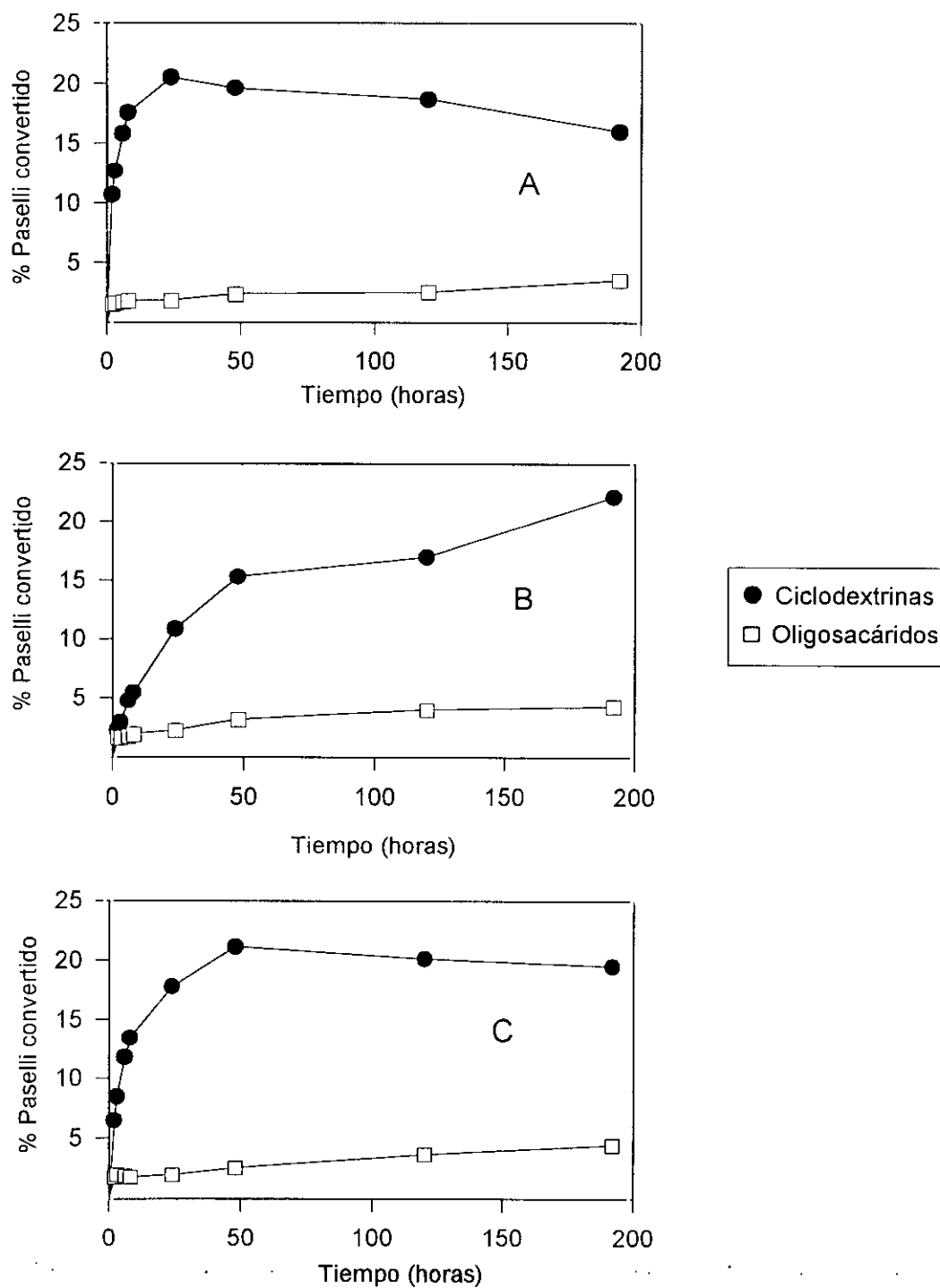
### ***CGTasa succinilada***

En este caso, la evolución de la reacción es más parecida a la de la enzima nativa (ver Fig. IV.14). Así, el máximo de producción de ciclodextrinas se alcanza a las 48 h, con una relación molar  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ -ciclodextrina 2.2:4.1:1 (21.1% de Paselli convertido por la CGTasa succinilada en ciclodextrinas). En cualquier caso, la productividad final de ciclodextrinas empleando la especie modificada fue ligeramente superior (ver Fig. IV.15), probablemente debido a la disminución de su actividad de acoplamiento. Además, la síntesis de oligosacáridos aumenta, incluso más que en la especie acetilada, como consecuencia del incremento en la actividad de transferencia (ver Tabla IV.4), alcanzando valores de 4.4% de Paselli convertido en oligosacáridos, en 8 días de reacción.





**Figura IV.14.** Producción de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina con el tiempo, para las CGTasas nativas y modificadas. Condiciones: 85°C, 7.0  $\mu$ g de CGTasa y 2.5-g de Paselli SA2 en 10. ml de tampón citrato 10 mM (pH 5.5) conteniendo 0.15 mM de CaCl<sub>2</sub>.

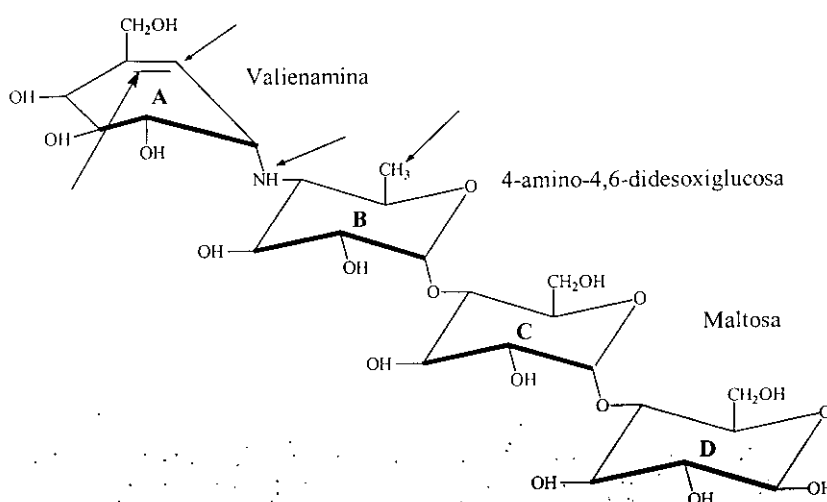


**Figura IV.15.** Producción de oligosacáridos y ciclodextrinas con la CGTasa nativa (A), acetilada (B) y succinilada (C). Condiciones: 85°C, 7.0 µg de CGTasa y 2.5 g de Paselli SA2 en 10 ml de tampón citrato 10 mM (pH 5.5) conteniendo 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>.

## 2.3 MODIFICACION DE LOS GRUPOS CARBOXILO

La modificación química de los grupos carboxilo de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 fue diseñada haciendo especial énfasis tanto en la elección de los reactantes como en las relaciones molares empleadas. En primer lugar, se decidió escoger el método de la reacción promovida por carbodiimida, por ser uno de los reactivos más suaves y que mayor versatilidad ofrece en modificación química de los grupos ácidos de las proteínas. En concreto, se trabajó con 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida (EDC) por ser una carbodiimida soluble y de menor tamaño que otras empleadas en este tipo de experimentos, por lo que es previsible que tuviera mayor accesibilidad a los residuos más protegidos. En cuanto al nucleófilo, se usaron tres diferentes: taurina, éster metílico de norleucina y éster etílico de glicina. La taurina permite la modificación de los grupos carboxilo sin que ello conlleve un cambio en la carga de la proteína. Sin embargo, con los otros dos nucleófilos, se altera la carga, de negativa a neutra. Tanto la norleucina como la glicina se emplean con sus grupos carboxilo esterificados para evitar la posible reacción de éstos con la carbodiimida.

Para estos experimentos se decidió proteger el centro activo de la CGTasa (dado que la tríada catalítica la componen los residuos Asp230, Glu258, Asp329) con una molécula inhibidora competitiva, la acarbosa (Strokopytov y cols., 1995). Se trata de un pseudotetrasacárido con una estructura muy similar a la de la maltotetraosa, constituido por maltosa y una pseudo-maltosa, la cual es esencial para las propiedades inhibitorias que presenta este compuesto. Esta pseudo-maltosa está formada por una unidad de ciclitol insaturado (llamada valienamina) y otra unidad de 4-amino-4,6-didesoxiglucosa.



**Figura IV.16.** Estructura de la acarbosa. Las flechas indican las 4 diferencias existentes entre la maltotetraosa y la acarbosa. i) el grupo hidroxilo C6 de la glucosa B está ausente; ii) la unión O-glicosídica entre los residuos A y B ha sido reemplazada por una unión N-glicosídica; iii) el oxígeno O5 del residuo A ha sido sustituido por un átomo de carbono (C7); iv) un doble enlace ha sido introducido en el residuo A entre el C5 y el C7.

Al igual que en la modificación de los grupos amino, también se utilizó seroalbumina bovina (BSA) -que contiene 99 residuos ácidos- para encontrar las condiciones de reacción más adecuadas. La Tabla IV.5 recoge los resultados de modificación de la BSA empleando diferentes nucleófilos y distintas relaciones molares nucleófilo/grupo carboxilo (manteniendo en todos los ensayos una relación nucleófilo/EDC, 10:1).

**Tabla IV.5.** Modificación química de los grupos carboxilo de la BSA utilizando diferentes relaciones molares.

NUCLEOFILO	Nucleófilo/COOH	EDC/ COOH	Nucleófilo/EDC	Grado de modificación <sup>c</sup> (%)
<b>Taurina</b>	1000:1	100:1	10:1	74
<b>Taurina</b>	500:1	50:1	10:1	52
<b>Norleucina <sup>a</sup></b>	500:1	50:1	10:1	50
<b>Norleucina <sup>a</sup></b>	400:1	40:1	10:1	46
<b>Norleucina <sup>a</sup></b>	200:1	20:1	10:1	25
<b>Glicina <sup>b</sup></b>	2000:1	200:1	10:1	76
<b>Glicina <sup>b</sup></b>	500:1	50:1	10:1	59

<sup>a</sup> Ester metílico de norleucina.

<sup>b</sup> Ester etílico de glicina.

<sup>c</sup> Determinado por análisis de aminoácidos.

Como se puede apreciar, se obtuvieron grados de sustitución elevados, que en cualquier caso no excedían del 80% en las condiciones más drásticas. En la literatura se describen numerosos ejemplos, del grado de sustitución y de los reactivos empleados en función de la proteína en cuestión. Mattson y cols., (1992) emplearon relaciones nucleófilo/grupo carboxilo 1250/1 y nucleófilo/carbodiimida 10/1, inactivando irreversiblemente la CGTasa de *Bacillus circulans*. Otra posibilidad es aplicar condiciones más suaves como las de Yamada y cols. (1981), que consiguieron un grado de modificación de un 9% en la lisozima usando relaciones nucleófilo/grupo carboxilo, 129:1 y nucleófilo/carbodiimida, 384:1. En cualquier caso, la tendencia más general es utilizar relaciones nucleófilo/carbodiimida de 10:1, con independencia de cual sea la concentración de nucleófilo con la que se trabaje.

Con la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501, se probaron diversas condiciones de reacción. Con relaciones nucleófilo/grupo carboxilo 60:1 y nucleófilo/carbodiimida, 3:1, no se consiguió modificar ningún residuo ácido de la CGTasa.

Aumentando la relación nucleófilo/grupo carboxilo hasta 260:1 y nucleófilo/carbodiimida 10:1, tampoco se tuvo éxito. Por ello, se decidió utilizar relaciones molares elevadas (nucleófilo/grupo carboxilo, 1000:1; nucleófilo/EDC, 10:1). En este caso, la CGTasa se desnaturizaba durante el proceso de modificación. Finalmente, bajo unas condiciones con las que se obtenían sustituciones cuantitativas en la BSA (nucleófilo/grupo carboxilo 500:1, nucleófilo/EDC 10:1), se consiguieron modificaciones moderadas en la CGTasa.

En definitiva, los grupos carboxilo de la CGTasa se sometieron a modificación en las condiciones descritas en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos, mediante una reacción en dos pasos con EDC y una amina nucleófila. La secuencia de la reacción es iniciada por la adición del carboxilo a través de uno de los dobles enlaces de la diimida para formar una O-acilisourea intermedia lábil. En solución acuosa, este complejo es altamente reactivo condensándose con aminas para formar las correspondientes amidas, aunque también presenta dos posibles reacciones laterales: el reordenamiento y la hidrólisis (ver Fig. IV.17). Por otro lado, la carbodiimida no sólo reacciona con los ácidos carboxílicos de la proteína, sino también con Tyr y rara vez con las Cys (Fig. IV.18). La reacción de la carbodiimida con los grupos fenólicos de las tirosinas genera O-arilisoureas, mediante la interacción entre el hidroxilo de la tirosina y el doble enlace de la carbodiimida. Estos productos son muy estables a pH neutro, y moderadamente estables durante la hidrólisis ácida de la proteína; pero pueden ser descompuestos mediante el tratamiento con hidroxilamina, regenerándose la Tyr de partida y permitiendo la degradación del EDC remanente (la vida media del EDC en presencia de hidroxilamina es tan sólo de 5.5 min en las condiciones de reacción, Gilles y cols., 1990). Los grupos sulfhidrilo de las Cys pueden reaccionar de manera similar a las Tyr, pero el producto resultante parece ser más estable, y no se descompone aún tratándolo con  $\beta$ -mercaptoetanol o amonio.

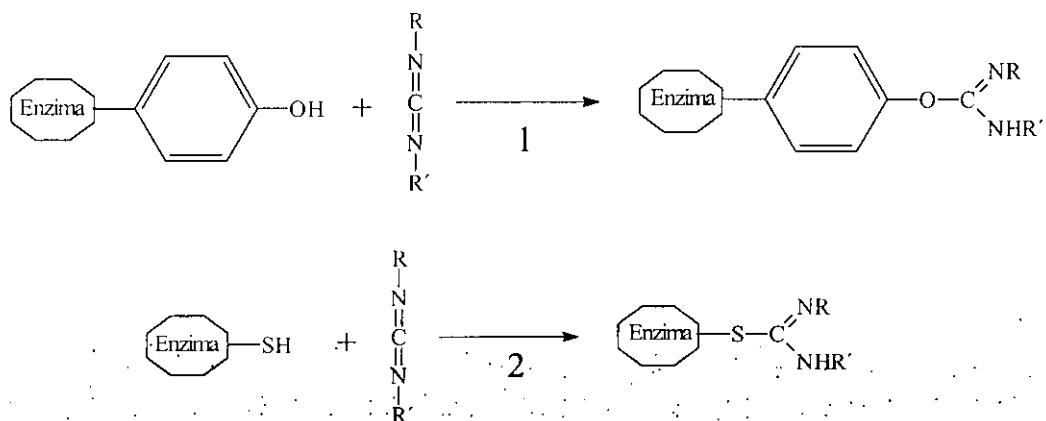
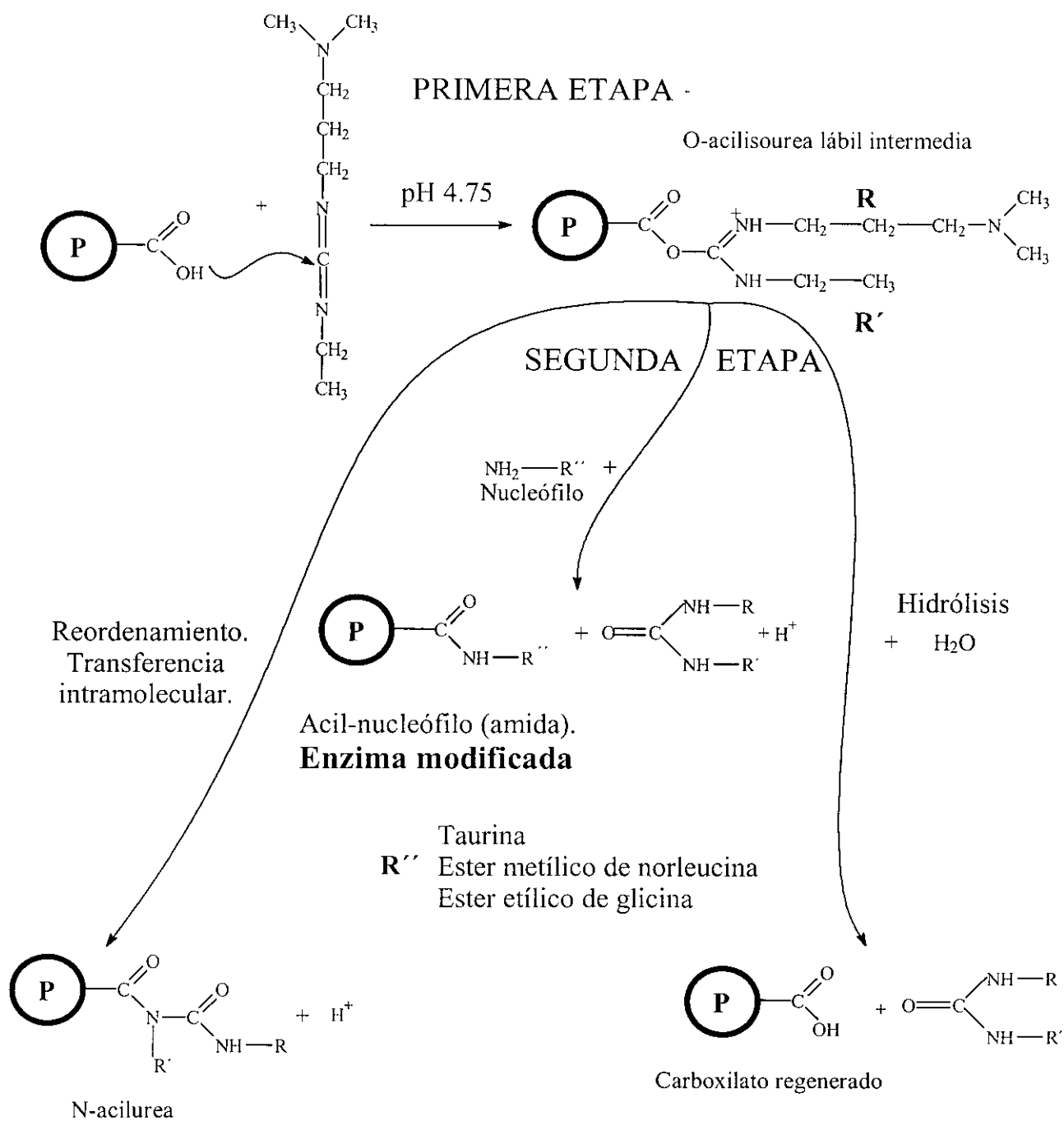


Figura IV:18. Modificación de las Tyr (1) y de las Cys (2) con carbodiimida soluble en agua.



**Figura IV.17.** Reacción en dos pasos de los grupos carboxilo con la carbodiimida en presencia de nucleófilo. La reacción principal produce una amida (enzima modificada); sin embargo, también tienen lugar reacciones laterales, una de ellas de isomerización (reordenamiento) y otra de hidrólisis (el agua actúa como nucleófilo).

### 2.3.1 CARACTERIZACION DE LAS ESPECIES MODIFICADAS

#### a) Determinación del grado de modificación

Para la determinación del número de carboxilos modificados en la CGTasa se recurrió a la técnica de análisis de aminoácidos. Para ello, fue necesario realizar un tratamiento previo de la muestra que consistió básicamente en una hidrólisis en presencia de HCl 6 N a 155°C durante 60 min. En estas condiciones, se hidrolizó el enlace amida formado entre el carboxilo y el nucleófilo. Además, el éster etílico de glicina es hidrolizado a glicina y el éster metílico de norleucina a norleucina. En definitiva, el grado de modificación cuando se utilizó glicina se calculó por diferencia entre el número de glicinas de la especie modificada (Fig. IV.20) y la enzima nativa (Fig. IV.19). En el caso de la norleucina, la aparición en el cromatograma de un pico de norleucina (entre los de Ile y Tyr) permitió calcular el número de residuos modificados (Fig. IV.21). Del mismo modo se procedió en la modificación con taurina (Fig. IV.22) cuyo pico se presenta al principio del análisis (en torno a los 4.5 min).

La CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 contiene 61 grupos carboxílicos (43 Asp y 17 Glu y el grupo carboxilo terminal). La Tabla IV.6 muestra los porcentajes de sustitución de los grupos carboxilo de esta enzima con los diferentes nucleófilos utilizados.

**Tabla IV.6.** Grados de modificación de los grupos carboxilo de la CGTasa obtenidos con distintos nucleófilos. Relaciones molares empleadas: nucleófilo/grupo carboxilo, 500:1; nucleófilo/carbodiimida, 10:1, acarbosa/CGTasa, 200:1

Nucleófilo	Grado de modificación (%)	Nº de grupos carboxilo modificados
Taurina	8.2	5
Ester metílico de norleucina	5.1	3
Ester etílico de glicina	6.5	4

Como se puede observar, la modificación conseguida, con independencia del nucleófilo empleado, fue muy baja, llegando en el mejor de los casos a porcentajes de sustitución del 8%. Con dichos grados de modificación no se apreciaron cambios significativos en el *pI* para las modificaciones con el éster metílico de norleucina y el éster etílico de glicina.

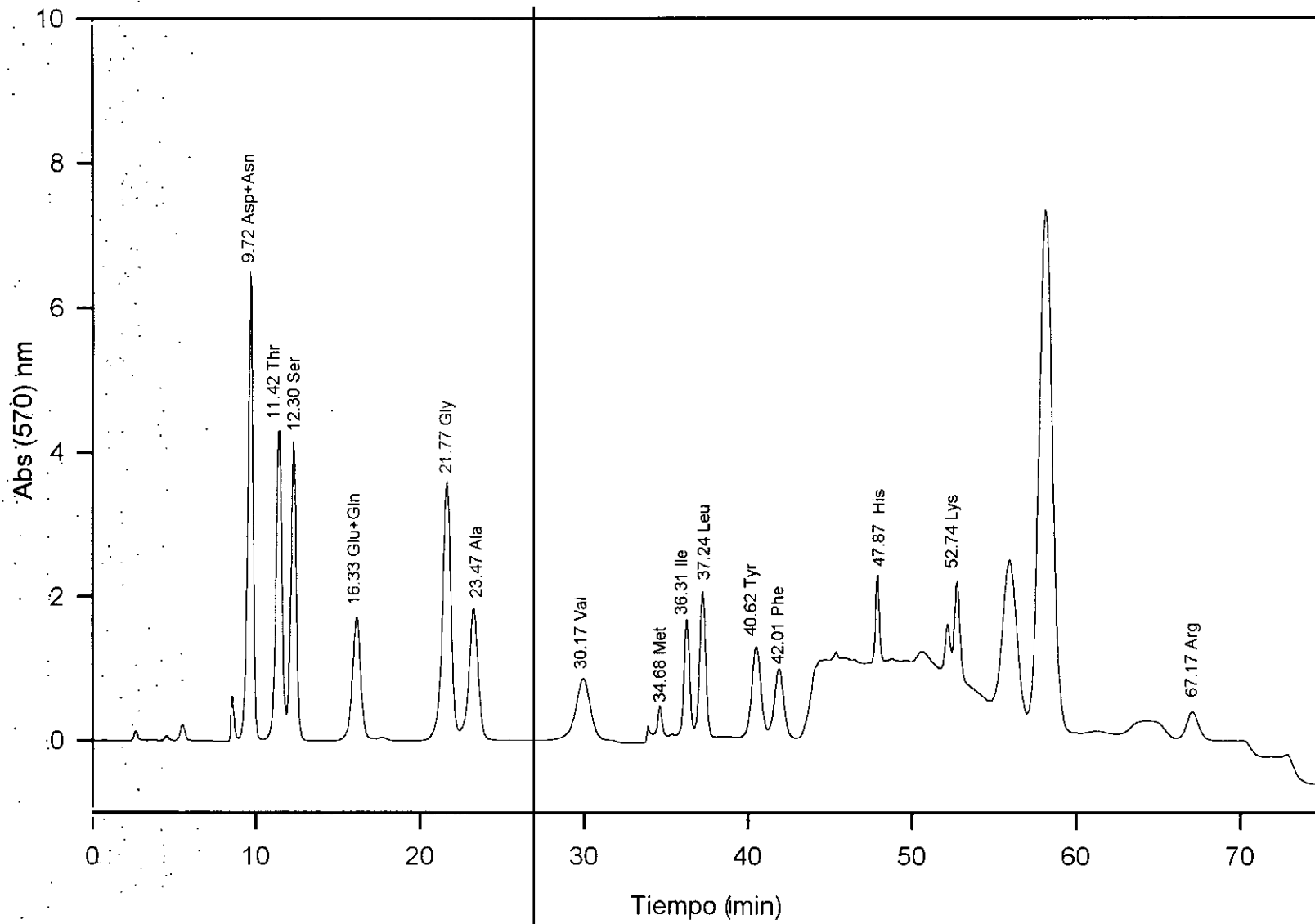
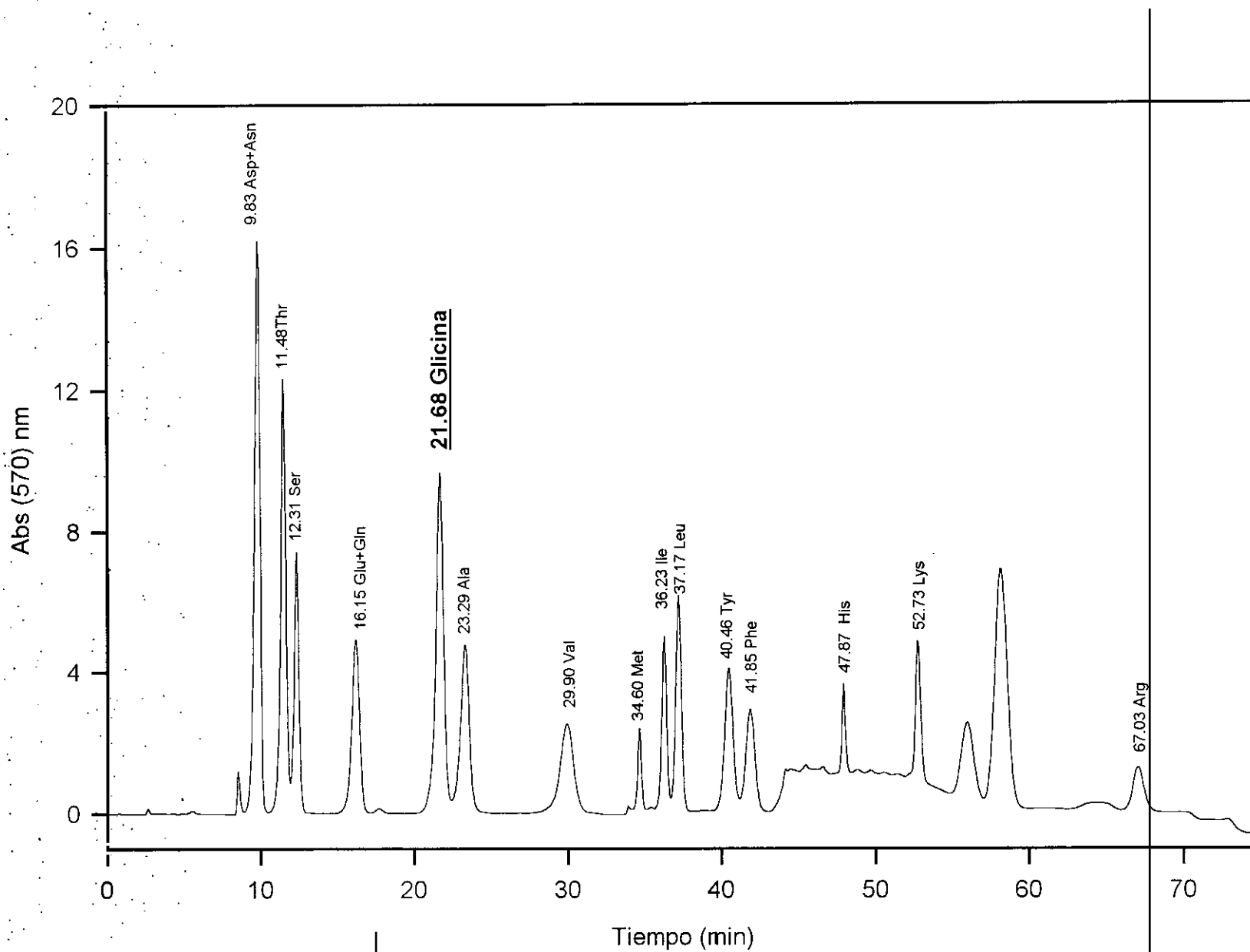
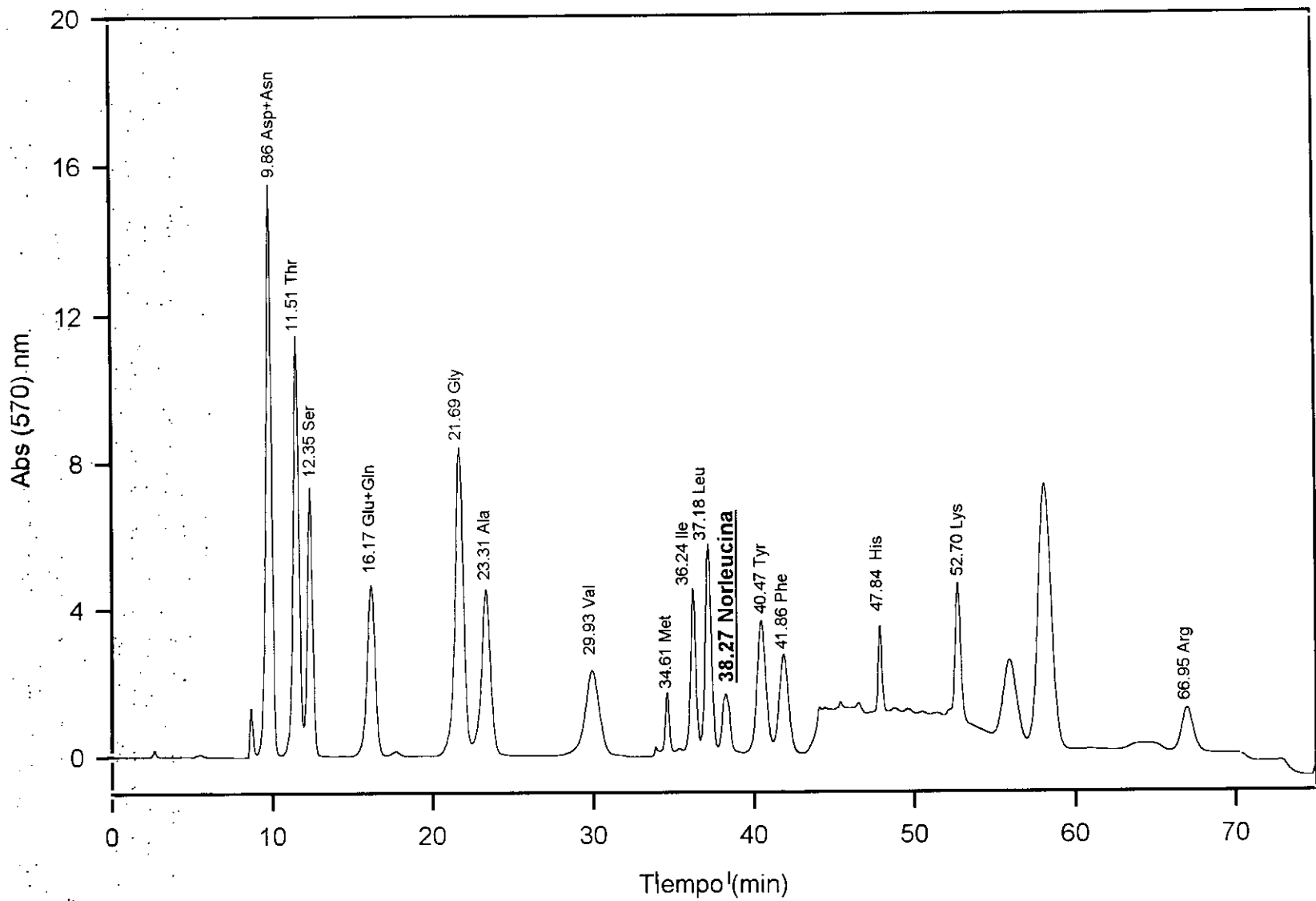


Figura IV.19. Cromatograma del análisis de aminoácidos de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501.





**Figura IV.20.** Cromatograma del análisis de aminoácidos de la CGTasa modificada con éster etílico de glicina. El incremento del pico de glicina con respecto a la enzima nativa permite calcular el grado de modificación.



**Figura IV.21.** Cromatograma del análisis de aminoácidos de la CGTasa modificada con éster metílico de norleucina. Obsérvese la aparición de un pico de norleucina a 38.27 min.

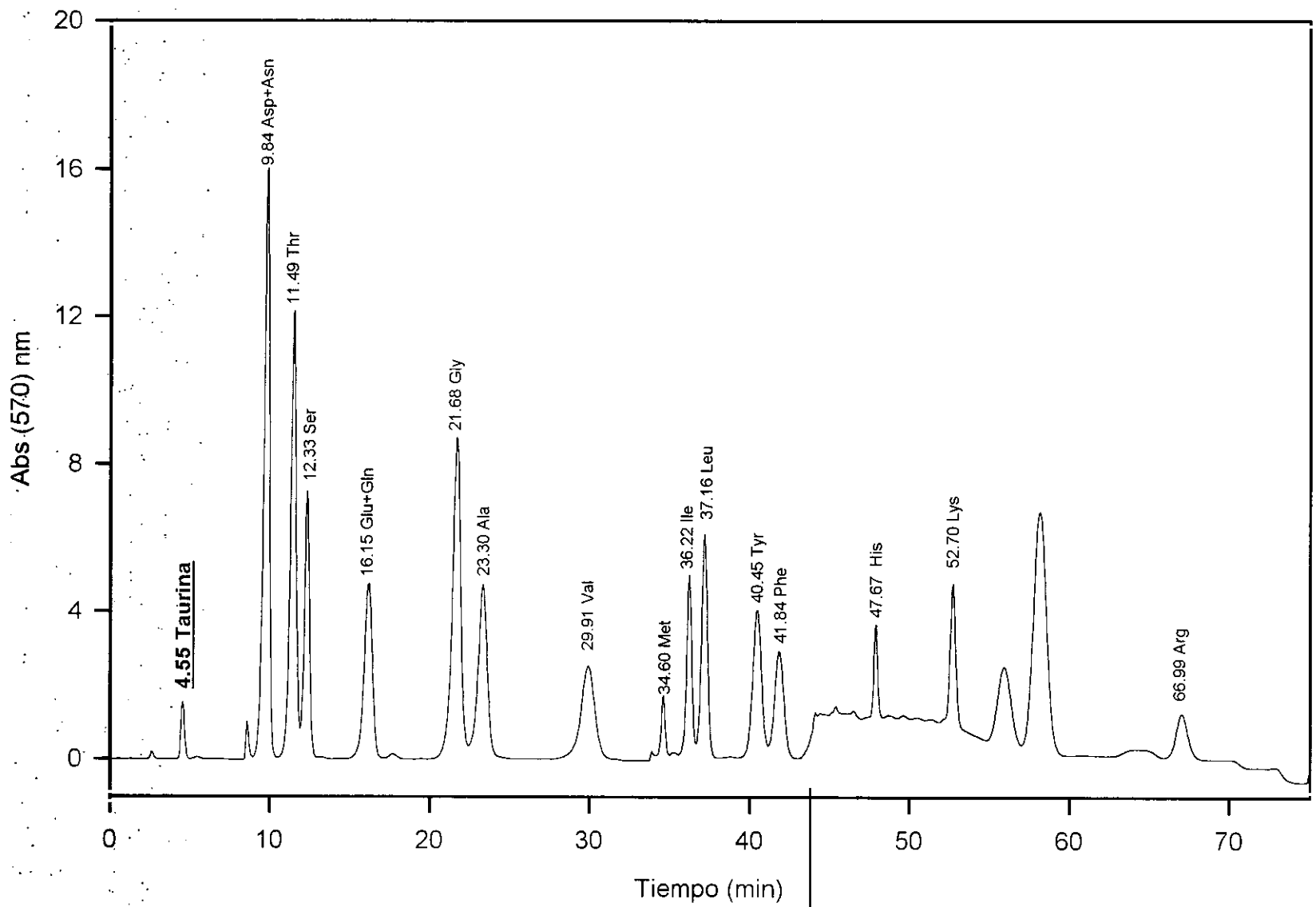


Figura IV.22. Cromatograma del análisis de aminoácidos de la CGTasa modificada con taurina. Obsérvese la aparición de un pico de taurina a 4.55 minutos.

### 2.3.2 EFECTO DE LA MODIFICACIÓN SOBRE LA ACTIVIDADES INICIALES

Se midieron las actividades iniciales de ciclación, acoplamiento, transferencia e hidrólisis, tanto en la enzima nativa como en las especies modificadas (Tabla IV.7). Se ensayó un blanco de la modificación en ausencia de EDC, tal como se describe en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos. Se observó que se mantenía la actividad enzimática después del tratamiento en las condiciones de reacción, por lo que se concluyó que éstas no afectaban a la CGTasa.

**Tabla IV.7.** Actividades iniciales de las enzimas nativa y modificadas con los distintos nucleófilos.

NUCLEOFILO	Actividad (U/mg proteína)						
	CICLACION			ACOPLAMIENTO		HIDROLISIS	TRANSFERENCIA
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$		
<i>Nativa</i>	300	223	131	332	68	85	1196
<i>Taurina</i>	110	72	37	165	26	65	953
<i>Norleucina</i> <sup>a</sup>	90	67	40	85	28	56	470
<i>Glicina</i> <sup>b</sup>	77	60	33	74	24	56	501

<sup>a</sup> Ester metílico de norleucina.

<sup>b</sup> Ester etílico de glicina.

Como se puede apreciar en la Tabla IV.7, las enzimas modificadas disminuyen considerablemente las actividades de ciclación y acoplamiento y en menor medida lo hacen las actividades de transferencia e hidrólisis. El comportamiento de las especies modificadas con norleucina o glicina es muy parecido. Ambas enzimas muestran una pérdida de actividad de ciclación alrededor de 3-4 veces, mientras que el acoplamiento se reduce drásticamente (especialmente el acoplamiento de  $\alpha$ -ciclodextrina). Las actividades de transferencia e hidrólisis resultan menos alteradas tras la modificación. El similar comportamiento de las especies modificadas con glicina o norleucina era presumible, si se tienen en cuenta los grados de modificación obtenidos en ambos casos, y la propia naturaleza de los nucleófilos. La única

diferencia entre los dos nucleófilos es su tamaño (superior en el caso de la norleucina) lo que probablemente repercute en que el grado de modificación con norleucina sea ligeramente más bajo (5.1% frente a 6.5% de la glicina).

Paradójicamente, la CGTasa modificada con taurina, siendo la especie con mayor grado de modificación, es la que menos pérdidas de actividad sufre. La explicación a este comportamiento se puede sustentar en que se conserva la carga negativa en los residuos modificados y, en consecuencia, el efecto de la modificación sobre la actividad de la enzima es más débil. Así, sus actividades de ciclación y acoplamiento, disminuyen 2-3 veces, mientras que la transferencia e hidrólisis experimentan tan sólo un leve descenso.

### **2.3.3 EFECTO DE LA MODIFICACION SOBRE LA PRODUCCION DE CICLODEXTRINAS Y OLIGOSACARIDOS**

La formación de ciclodextrinas y oligosacáridos se analizó empleando condiciones similares a las de la industria, (ver apartado 3.2 de Materiales y Métodos). La CGTasa nativa alcanza su máximo de producción de ciclodextrinas al cabo de un día, con unas relaciones molares  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -ciclodextrina de 2.8:5.4:1 (20.5% de Paselli convertido en ciclodextrinas). Como se muestra en la Fig. IV.24, tras llegar al máximo valor de producción, la cantidad global de ciclodextrinas disminuye ligeramente con el tiempo, en beneficio de la producción de oligosacáridos.

#### ***CGTasa modificada con taurina***

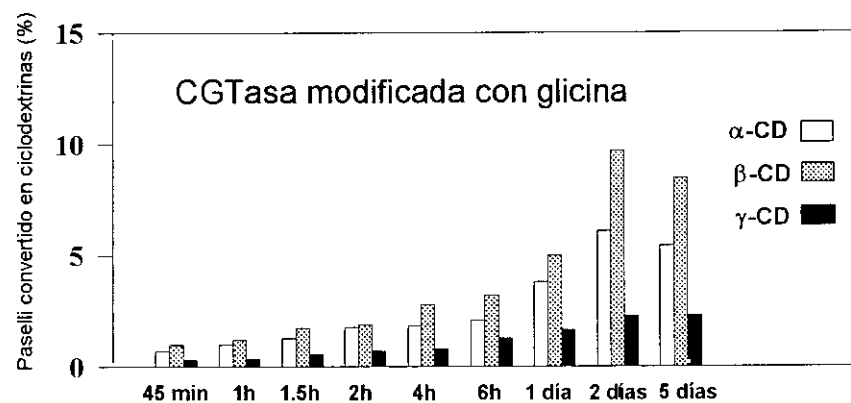
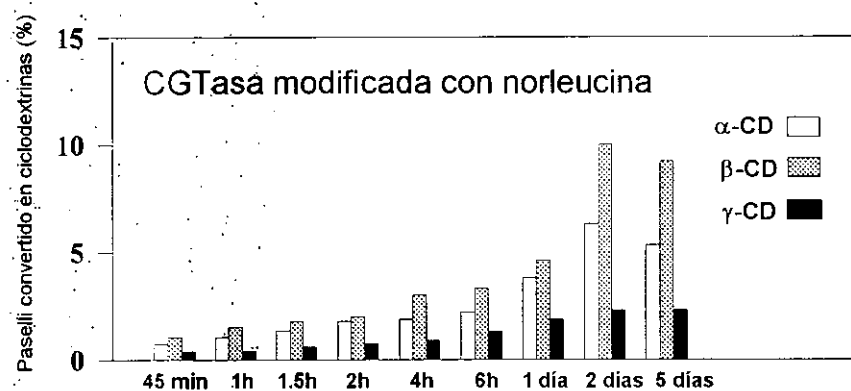
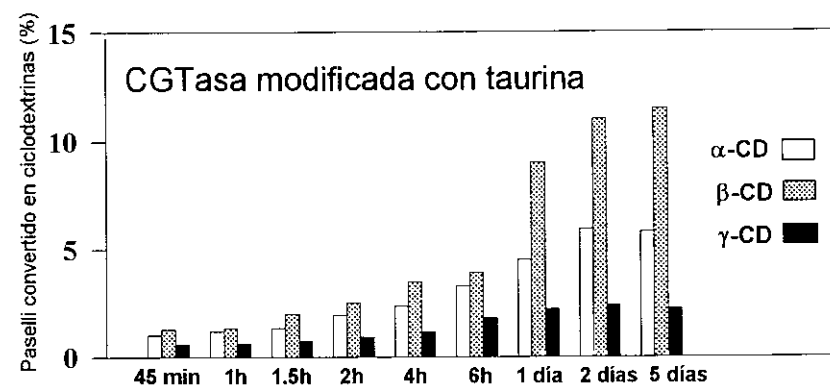
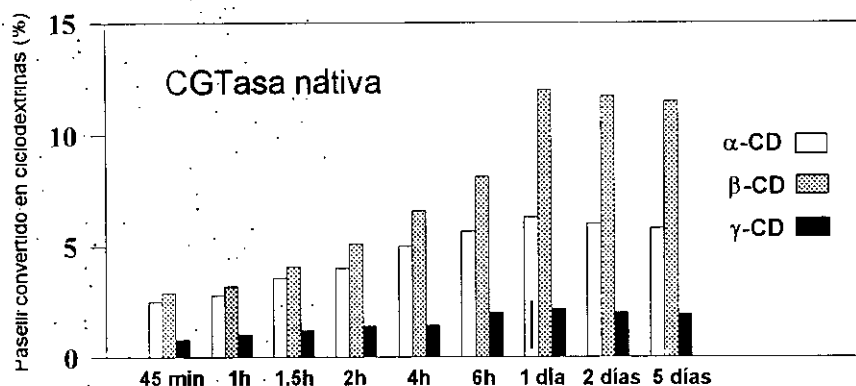
La CGTasa modificada con taurina, muestra un menor rendimiento que la nativa como consecuencia del descenso de su actividad inicial de ciclación (ver Tabla IV.7), por lo que emplea más tiempo en alcanzar su máximo de producción (dos días). En este punto, presenta una relación  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -ciclodextrina de 2.6:5.1:1 (19.5% de Paselli convertido en ciclodextrinas), de lo que se deduce que la modificación química afecta notablemente a la actividad catalítica de la enzima a tiempos cortos, sin alterar su selectividad  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ -ciclodextrina (ver Fig. IV.23). Además, su producción de oligosacáridos es prácticamente la misma que la de la enzima nativa, (incluso desde las primeras etapas de reacción). Por ejemplo, a la hora y media de reacción exhibe un 1.6% frente a 1.5% de Paselli convertido en oligosacáridos, en la enzima nativa y en la modificada respectivamente (ver Fig. IV.24).

### ***CGTasas modificadas con éster metílico de norleucina y éster etílico de glicina***

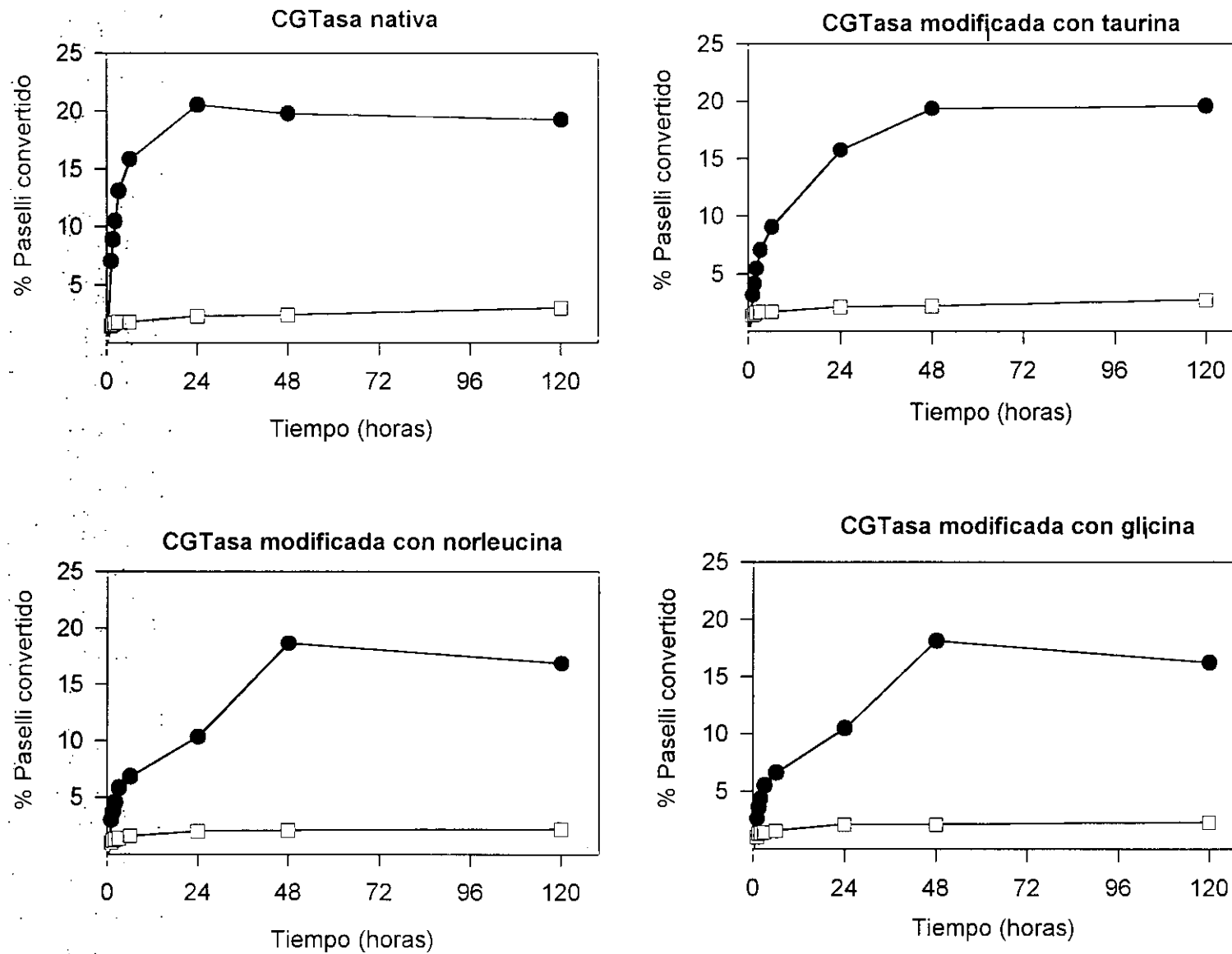
En ambos casos, la producción de ciclodextrinas es muy similar, y menor que la observada con la CGTasa nativa y la modificada con taurina. Su máximo de producción se alcanza en torno a los dos días con relaciones molares de 2.7:4.3:1 (18.6% de Paselli convertido en ciclodextrinas) para la especie con norleucina y 2.6:4.2:1 (18.1% de Paselli convertido) para la especie con glicina (ver Fig. IV.23). La ligera variación en las relaciones molares con respecto a la enzima nativa (disminuye  $\beta$ -ciclodextrina y se mantiene  $\alpha$ -ciclodextrina) puede ser consecuencia del mayor descenso de la actividad acoplamiento de  $\alpha$ -ciclodextrina con respecto al acoplamiento de  $\beta$ -ciclodextrina (ver Tabla IV.7), lo que se traduce en una nivelación de la producción de  $\alpha$ - y  $\beta$ -ciclodextrinas. Por otro lado, la producción neta de oligosacáridos con ambas enzimas disminuye ligeramente con respecto a la enzima nativa como consecuencia de la menor actividad de transferencia e hidrólisis (2.2% frente al 3% de la nativa, tras 5 días de reacción, ver Fig. IV.24).

## **2.4 MODIFICACION DE LA CISTEINA**

La CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 posee un único residuo de Cys en la posición 585, y se intentó modificar con diferentes reactivos: el disulfuro de 2,2'-dipiridilo y el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico). En ambos casos, los resultados fueron negativos, sin conseguirse la modificación de la proteína incluso cuando se trató en condiciones drásticas (SDS 2% y urea 1 M). Sin embargo, se comprobó que los protocolos diseñados funcionaron con otras proteínas. De hecho, se empleó como proteína patrón la tiol-subtilisina Carlsberg, consiguiendo sustituciones cuantitativas.



**Figura IV.23.** Producción de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina con las CGTasas nativas y modificadas. Condiciones: 85°C, 7.0  $\mu$ g de CGTasa y 2.5 g de Paselli SA2 en 10 ml de tampón citrato 10 mM (pH 5.5) conteniendo 0.15 mM  $\text{CaCl}_2$ .



**Figura IV.24.** Producción de oligosacáridos (□) y ciclodextrinas (●) con las enzimas nativas y modificadas. Condiciones: 85°C, 7.0 µg de CGTasa y 2.5 g de Paselli SA2 en 10 ml de tampón citrato 10 mM (pH 5.5) conteniendo 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>.



### 3. INMOVILIZACIÓN DE LA DEXTRANSACARASA

#### 3.1 INMOVILIZACIÓN COVALENTE EN SILICE POROSA

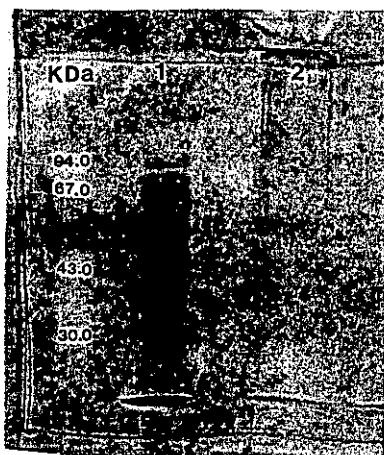
##### 3.1.1 ELIMINACIÓN DEL DEXTRANO

El objeto de la eliminación de la cubierta de dextrano de la dextransacarasa era obtener una preparación enzimática con una mayor capacidad de interacción covalente durante su inmovilización en soportes de sílice porosa. Tras el tratamiento de la dextransacarasa con dextranasa, se obtuvo una especie enzimática caracterizada por su baja estabilidad con respecto a la nativa.

##### *Determinación del peso molecular*

La dextransacarasa asociada con el dextrano es incapaz migrar durante la electroforesis en un gel de poliacrilamida, lo que dificulta su caracterización. La enzima libre de dextrano no presenta este problema y su tamaño puede determinarse mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes.

En el gel de electroforesis preparado (Fig. IV.25), se puede apreciar la presencia de dos bandas (una de ellas en torno a 65.000 Da y la otra por encima de los 70.000 Da). Con electroforesis adicionales empleando patrones de alto peso molecular, aparecieron nuevas bandas (170.000 Da y 120.000 Da) que se consideran agregados multienzimáticos de la de 65.000 Da, tal y como describieron previamente Kobayashi y Matsuda, (1980); Miller y cols., (1986) y Willemot, (1993).



**Figura IV.25.** Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), de la dextransacarasa sin dextranos. Línea 1: kit de proteínas de bajo peso molecular (Fosforilasa B, 94 kDa; BSA, 67 kDa; Ovoalbúmina, 43 kDa; Anhidrasa carbónica, 30 kDa). Línea 2: Dextransacarasa sin dextranos. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

### Actividad y estabilidad

La actividad específica de la enzima nativa era de 10 U/mg proteína (determinada por el ensayo del ácido 3,5-dinitrosalicílico). Tras el proceso de eliminación de dextrano, se obtuvo una preparación con una actividad de 86 U/mg proteína. Respecto a la estabilidad de ambas muestras enzimáticas a 30°C, en la Fig. IV.26 se puede apreciar cómo la enzima sin dextranos experimenta una rápida disminución de su actividad (36% de actividad residual a las 24 h, frente a 66% en la nativa). Esto es consecuencia de las propiedades estabilizantes que la envuelta de dextrano confiere a la proteína, en concordancia con los resultados de Willemot (1993).

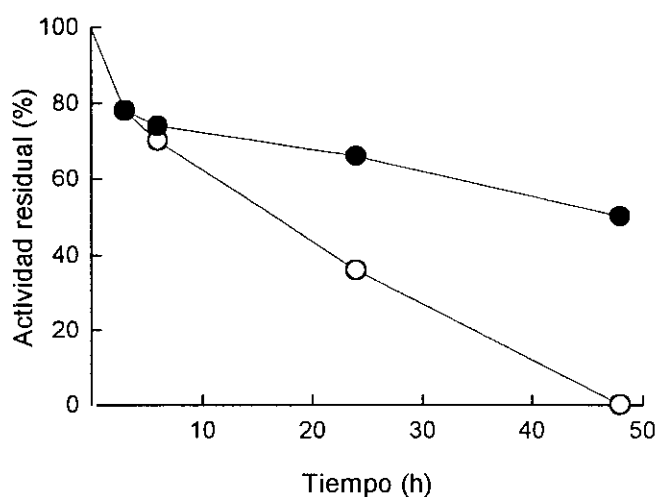


Figura IV.26. Comparación de la estabilidad de la enzima nativa (●) y la enzima sin dextranos (○), a 30°C en tampón acetato 10 mM (pH 5.4).

### 3.1.2 INMOVILIZACIÓN

La dextranosa, con o sin dextranos, fue inmovilizada covalentemente en sílice previamente funcionalizada con glutaraldehído, tal como se describe en el apartado 9.2 de Materiales y Métodos. Se trabajó con dos soportes de diferente diámetro de poro: el X200 de 150 Å (185 m<sup>2</sup>/g) y el X030 de 600 Å (50 m<sup>2</sup>/g). Mediante análisis de porosimetría de mercurio (realizada antes y después de la funcionalización de la sílice) se comprobó que la activación con glutaraldehído no afectó al tamaño del poro. Como describieron previamente Monsan y cols., (1987), cuanto mayor es el diámetro del poro mayor es el rendimiento de inmovilización de la dextranosa. Por lo tanto, se decidió inmovilizar la preparación sin dextrano en el soporte con mayor diámetro de poro (X030), consiguiendo un rendimiento casi 22 veces superior al de la enzima nativa en el mismo soporte.

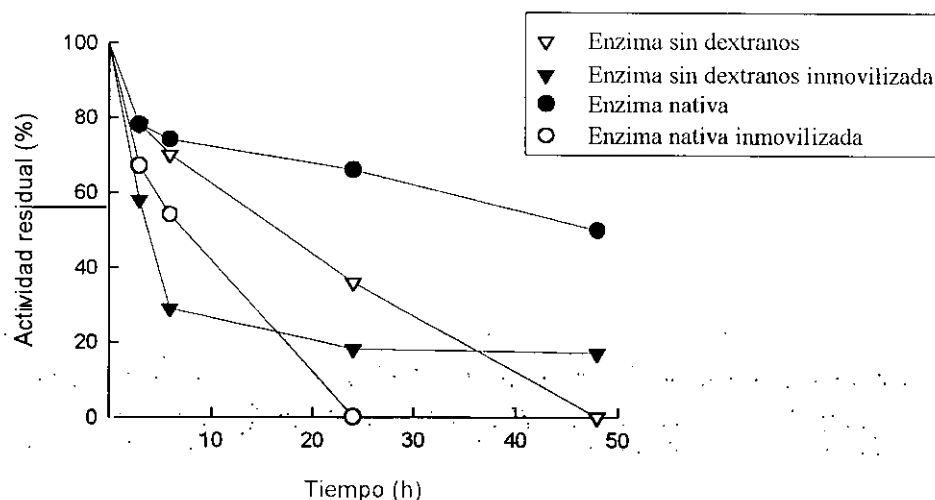
**Tabla IV.8.** Inmovilización de la dextransacarasa en sílice porosa. En todos los casos se adicionaron 10 ml de solución enzimática de actividad 10.5 U/ml sobre 100 mg de sílice activada.

Dextransacarasa	Soporte activado	Area específica del soporte ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) <sup>a</sup>	mg enzima/mg soporte	Actividad (U/g biocatalizador)	Actividad recuperada (%)
Con dextranos	X200	200	1/8.5	3	0.3
Con dextranos	X030	71	1/8.5	6	0.6
Sin dextranos	X030	71	1/80	129	13

<sup>a</sup> Area específica del soporte activado, determinada mediante porosimetría de mercurio. Las áreas de los soportes antes de la funcionalización con glutaraldehído fueron similares ( $195 \text{ m}^2/\text{g}$  para la sílice X200 y  $68 \text{ m}^2/\text{g}$  para la sílice X030).

### 3.1.3 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA

Se ensayó la estabilidad de los sistemas inmovilizados con la enzima nativa y con la enzima sin dextrano en sílice porosa X030. Tal como se muestra en la Fig. IV.27, la dextransacarasa inmovilizada sin dextrano presenta una pronunciada caída en las primeras 6 h de ensayo, para finalmente terminar estabilizándose, reteniendo cerca del 20% de su actividad tras 48 h de incubación. A este tiempo, la actividad residual de la enzima soluble sin dextranos es prácticamente nula. Sin embargo, la especie con dextrano, inmovilizada, muestra una rápida disminución de actividad que culmina con su total inactivación a las 24 h. Su pérdida de actividad es, por tanto, mucho más rápida que la de la enzima soluble con dextranos.



**Figura IV.27.** Estabilidad de la dextransacarasa soluble e inmovilizada en sílice, a  $30^\circ\text{C}$  en tampón acetato 10 mM (pH 5,4).

## 3.2 INMOVILIZACION POR ATRAPAMIENTO EN ALGINATO

### 3.2.1 RENDIMIENTO DE LA INMOVILIZACION

Aprovechando la estructura supramolecular de la dextransacarasa nativa (con dextranos), se inmovilizó por atrapamiento en bolas de alginato cálcico. El tamaño del complejo enzima-dextrano evita que éste pueda escapar a través de los poros de la esfera ionotrópica. Sin embargo, para la enzima sin dextrano no es conveniente utilizar esta metodología, ya que posee un tamaño considerablemente inferior, y escaparía por los poros del alginato dando lugar a rendimientos prácticamente nulos.

La dextransacarasa con dextranos fue, en consecuencia, inmovilizada en alginato cálcico tal como se describe en el apartado 10 de Materiales y Métodos. Los rendimientos de inmovilización en alginato fueron muy satisfactorios, oscilando en el intervalo 75-90% de actividad recuperada.

**Tabla IV.9.** Inmovilización de la dextransacarasa en alginato cálcico.

mg enzima	g de disolución de alginato <sup>a</sup>	Volumen de disolución enzimática (ml)	Diámetro de las esferas (mm)	Actividad (U/ml de biocatalizador)	Rendimiento de actividad (%)
5.6	10	10 (5 U/ml)	2	3	85

<sup>a</sup> Se prepara una disolución de alginato al 4% (p/v) en agua desionizada y desgasificada. Se pesan 10 g de dicha disolución y se mezclan con 10 ml de una disolución enzimática de actividad 5 U/ml. Tras el proceso de inmovilización, se obtienen 14 ml de esferas de biocatalizador.

### 3.2.2 ESTABILIDAD DE LA ENZIMA INMOVILIZADA

Se ensayó la estabilidad de la dextransacarasa nativa e inmovilizada, en las condiciones de reacción. Los resultados de estabilidad de la dextransacarasa inmovilizada en alginato cálcico fueron muy positivos; la preparación inmovilizada retuvo el 100% de su actividad inicial al cabo de 48 h, en claro contraste con la enzima nativa que perdió cerca del 50% de su actividad durante el mismo tiempo.

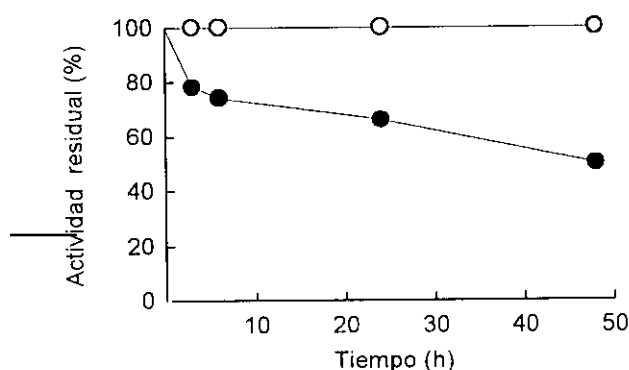


Figura IV.28. Estabilidad de la dextranasa nativa (●) e inmovilizada en alginato (○), a 30°C en tampón acetato 10 mM (pH 5.4).

### 3.3 ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD EN PRESENCIA DE DISOLVENTES ORGANICOS

El estudio del comportamiento de la dextranasa en presencia de disolventes orgánicos es de gran interés, ya que los medios de reacción no acuosos pueden modular la síntesis de nuevos oligosacáridos y productos relacionados mediante la reacción de aceptor. Por consiguiente, la estabilización de la enzima en presencia de disolventes orgánicos, especialmente aquellos en los que los sustratos sean solubles, es un paso fundamental.

#### 3.3.1 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD CATALITICA

En primer lugar, se estudió la actividad catalítica de la enzima, con y sin dextranos, nativa o inmovilizada -en sílice X030 o en alginato-, en presencia de diferentes concentraciones de una serie de disolventes orgánicos. Se escogieron disolventes hidrófilos en los que el sustrato enzimático por naturaleza, la sacarosa, era soluble (dimetilsulfóxido, -DMSO-; dimetilformamida, -DMF-; dimetilacetamida, -DMA-) y otros de potencial interés (acetona y 2-metil-2-butanol). Los resultados más significativos se exponen en la Tabla IV.10. En la mayoría de las preparaciones, se produce una disminución considerable de la actividad enzimática en los diferentes disolventes. Especialmente el 2-metil-2-butanol (alcohol *tert*-amílico) reduce drásticamente la actividad de la dextranasa, tanto en su forma nativa como en la inmovilizada en sílice. En la dextranasa atrapada en alginato, los efectos más perjudiciales los producen las amidas (DMF y DMA). Sin embargo, en todos los casos, la enzima presenta actividad en DMSO. Así, en este disolvente al 20% (v/v) la actividad es superior al 80% (con respecto al control en tampón) para la enzima nativa e inmovilizada en alginato, y no supera el 60% en las variedades inmovilizadas en sílice (tanto con dextranos como sin ellos).



Tabla IV.10. Actividad <sup>a</sup> de la dextranacarasa en presencia de diferentes disolventes orgánicos (% v/v).

Dextranacarasa	Tampón	DMA	DMF	Acetona	Alcohol <i>tert</i> -amílico	DMSO				
						20 %	15 %	10 %	5 %	2 %
	—	10 %	10 %	10 %	10 %					
Nativa <sup>b</sup>	10	5.9	5.3	6.6	2.9	8.5	9.4	10	10	10
Dextranacarasa en sílice <sup>c</sup>	6	2.2	2.2	4.3	0.7	3.4	3.5	3.6	3.7	3.9
Dextranacarasa sin dextranos en sílice <sup>c</sup>	129	40	39.7	70	12.2	67	70	87	110	105
Dextranacarasa en alginato <sup>d</sup>	3	1.1	1.3	2	1.3	2.6	2.1	2.2	3	3

<sup>a</sup> Actividad determinada por el ensayo del ácido 3,5-dinitro salicílico en tampón acetato 10 mM (pH 5.4).

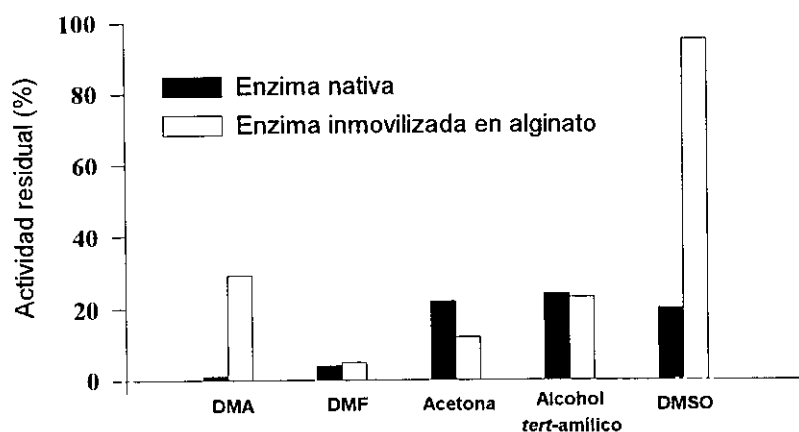
<sup>b</sup> Actividad expresada en U/mg proteína.

<sup>c</sup> Actividad expresada en U/g de biocatalizador.

<sup>d</sup> Actividad expresada en U/ml de biocatalizador.

### 3.3.2 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Se llevó a cabo un estudio de estabilidad en presencia de los disolventes orgánicos descritos anteriormente, en una concentración del 50% (v/v). Tras 15 min de incubación, las enzimas inmovilizadas en sílice X030 mostraron actividades prácticamente nulas, excepto en presencia de DMSO. Por otra parte, la enzima atrapada en alginato es más resistente a la acción de los disolventes, como se puede apreciar en la Fig. IV.29, y tolera particularmente la acción del DMSO.

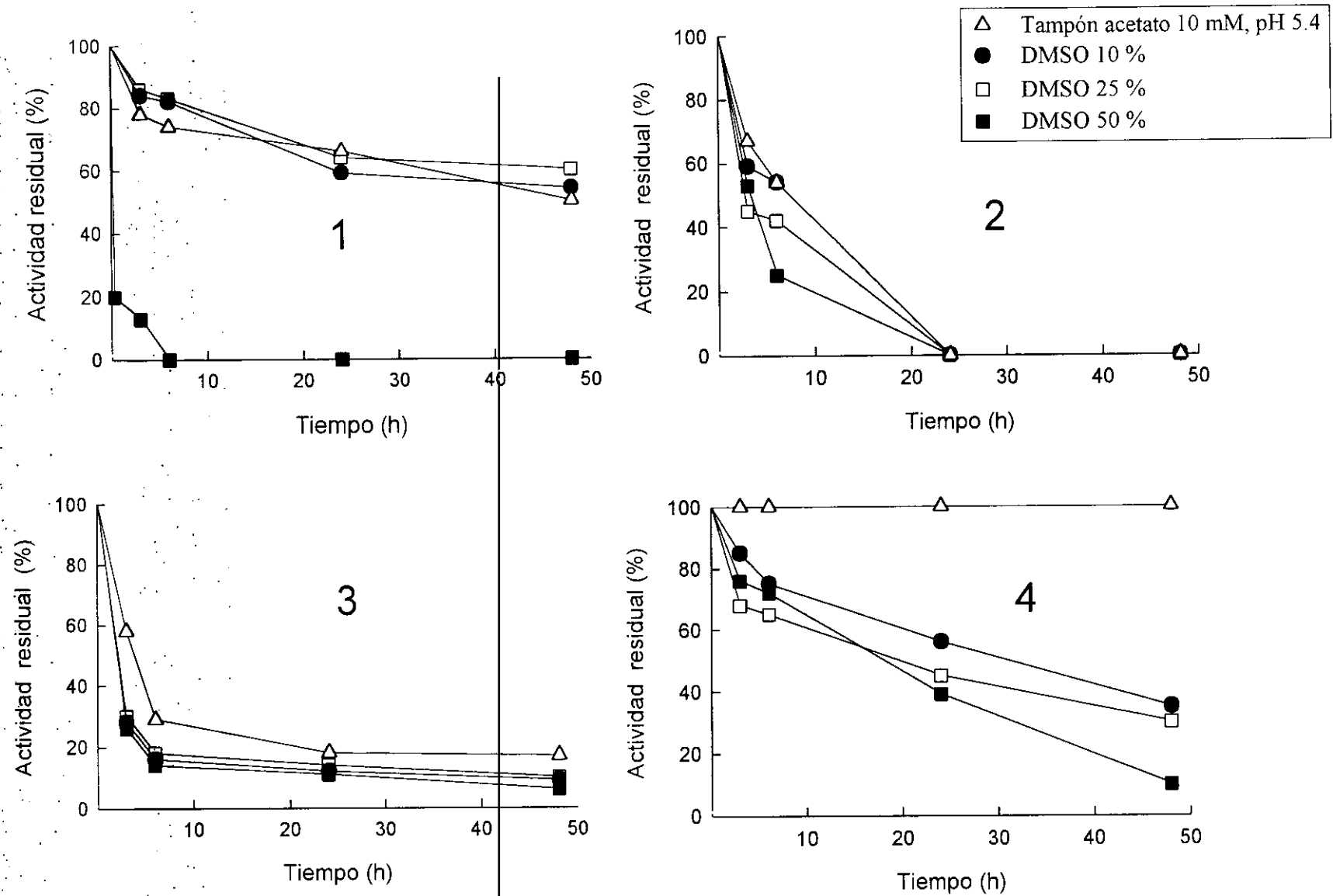


**Figura IV.29.** Actividad residual de la enzima nativa e inmovilizada en alginato tras su incubación durante 15 min en presencia de diferentes disolventes orgánicos al 50% (v/v). El alcohol *tert*-amílico es el único de los disolventes utilizados que no es miscible al 50% en agua.

La inmovilización en alginato cálcico mejora la estabilidad en DMSO más que en cualquiera de los otros disolventes ensayados, incluso en mayor medida que en DMA, ya que en este disolvente, tras 30 min de incubación, la actividad residual tanto para la enzima nativa como para la inmovilizada fue cero. Por esta razón, se realizó un estudio del efecto de la concentración de DMSO (se trabajó al 75%, 50%, 25% y 10% v/v) sobre la estabilidad de la enzima, tanto nativa como inmovilizada en alginato o en sílice, para encontrar las mejores condiciones de trabajo en sistemas enzima inmovilizada/DMSO.

Las actividades residuales en presencia de DMSO al 100% y 75%, tras 15 min de incubación, fueron nulas, tanto para la enzima nativa como para las variedades inmovilizadas.

La Fig. IV.30 recoge el estudio de las estabilidades en presencia de DMSO (al 10%, 25% y 50%), de las especies nativa e inmovilizadas. Parece claro que la enzima no es capaz de mantener su actividad a elevadas concentraciones de DMSO. Sin embargo, bajo concentraciones de DMSO hasta del 25% (v/v), la enzima nativa presenta similar estabilidad a la ofrecida en tampón (Fig. IV.30.1).



**Figura IV.30.** Estabilidad de la dextransacarasa en presencia de diferentes concentraciones de DMSO (v/v). (1), dextransacarasa nativa; (2), dextransacarasa nativa inmovilizada en sílice; (3) dextransacarasa sin dextrans inmovilizada en sílice; (4) dextransacarasa inmovilizada en alginato.



En cuanto a las especies inmovilizadas en sílice X030, éstas muestran diferente comportamiento dependiendo de si la enzima inmovilizada es la nativa o la preparación sin dextranos. En el caso de la enzima con dextranos inmovilizada en sílice, tanto en tampón acetato como en presencia de DMSO a diferentes concentraciones, se observa una estabilidad muy baja, de modo que a las 24 h de incubación la actividad residual es nula en todos los casos (Fig. IV.30.2).

Con respecto a la enzima sin dextranos inmovilizada en sílice, exhibe una disminución de actividad en los primeros estadios de la incubación. Finalmente la pérdida de actividad se detiene a las 6 h, manteniendo prácticamente la misma actividad residual (alrededor del 20%) desde ese instante hasta las 48 h. La enzima en tampón muestra unas actividades residuales ligeramente superiores con respecto a las que están en DMSO. Estas últimas presentan similares curvas de estabilidad con independencia de la concentración de DMSO que se utilice (Fig. IV.30.3).

Por último, la dextransacarasa inmovilizada en alginato retiene cerca del 50% de su actividad tras 24 h de incubación en DMSO al 50% (v/v), mientras que la enzima nativa perdía en las mismas condiciones casi toda su actividad a los 15 min (ver Fig. IV.29). Sorprendentemente, la presencia de DMSO al 10-25% (v/v) no proporciona un efecto estabilizador sobre la dextransacarasa inmovilizada en alginato (Fig. IV.30.4).

## 4 REACCION DE ACEPTOR DE LA DEXTRANSACARASA

Con la finalidad de realizar un completo estudio de la reacción de aceptor de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, se decidió trabajar con la enzima nativa así como con la variedad inmovilizada en alginato cálcico (debido a su elevada estabilidad durante largos períodos) en presencia de maltosa como aceptor.

La reacción se llevó a cabo partiendo de una concentración constante de sacarosa (100 mM), y variando la de maltosa. Concretamente se estudiaron las siguientes relaciones maltosa/sacarosa: 1/5, 1/1, 2/1, 4/1 y 6/1. Se trabajó a concentraciones relativamente bajas de sacarosa, porque con concentraciones superiores a 200 mM se produce una inhibición alostérica de la dextransacarasa durante largos períodos de reacción (Tanriseven y Robyt., 1993).

## 4.1 EVOLUCION DE LA REACCION

Se estudió la evolución de la reacción desde los estadios iniciales hasta la finalización de la misma, viendo la variación en la producción con el paso de la reacción. La Fig. IV.32 detalla el transcurso de la reacción de aceptor (a través de los cromatogramas de HPLC) de la enzima nativa empleando una relación maltosa/sacarosa 1:1. El orden de aparición de los productos es el siguiente: fructosa, maltosa, sacarosa, panosa (G3), isomaltosil maltosa (G4), isomaltotriosil maltosa (G5) e isomaltotetraosil maltosa (G6). Como se puede observar, en las primeras etapas de la reacción, los picos predominantes son los de los reactivos (maltosa y sacarosa; ver Fig. IV.32, 2 y 4 h). A medida que la reacción va progresando, aumenta el pico de fructosa (subproducto de la reacción) mientras disminuye el de sacarosa (ver Fig. IV.32, 4 y 6 h). A las 24 h, la reacción se detiene debido al consumo total de sacarosa. Los productos mayoritarios de la reacción siempre son los glucooligosacáridos (GOS) más bajos de la serie.

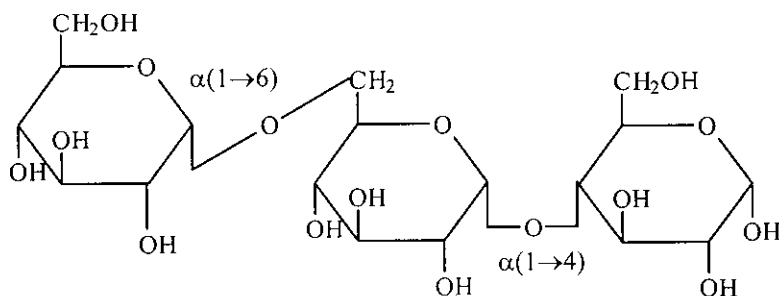


Figura IV.31. Estructura de la panosa (G3).

En cuanto al comportamiento de las enzimas nativa e inmovilizada, la evolución de la reacción es prácticamente igual en ambos casos. La Fig. IV.33 muestra los principales resultados en función de la relación maltosa/sacarosa empleada. A medida que se aumenta dicha relación, la reacción de aceptor va desplazando a la de formación de dextranos, lo que se traduce en un incremento en la síntesis de GOS. De esta forma, si se compara la formación de GOS utilizando relaciones molares 1:5 (Fig. IV.33.c) o 1:1 (Fig. IV.33.b), con la de 6:1 (Fig. IV.33.a), se encuentran valores que no superan en el mejor de los casos los 17 g/l frente a valores cercanos a los 40 g/l para la formación de panosa (G3).

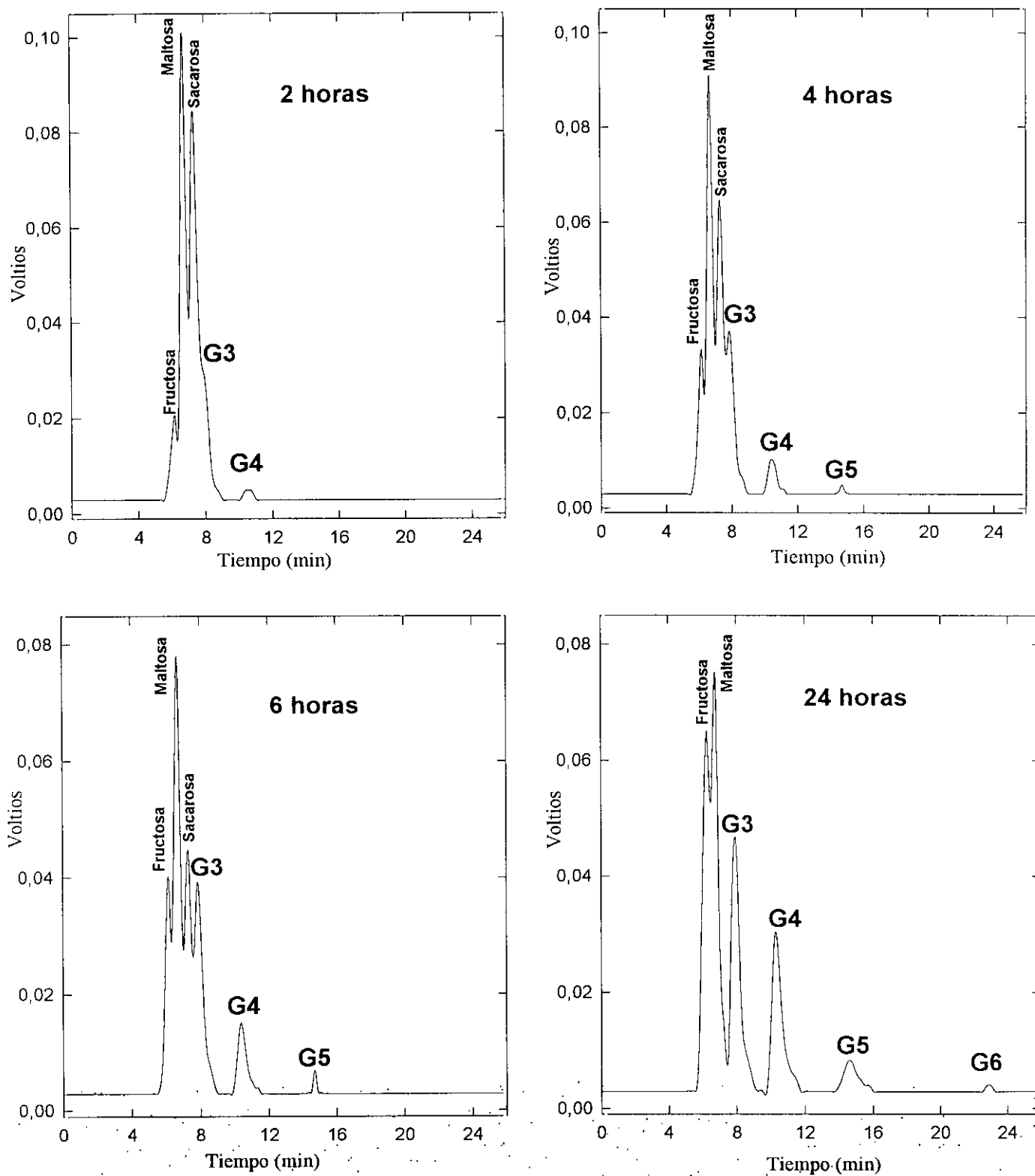
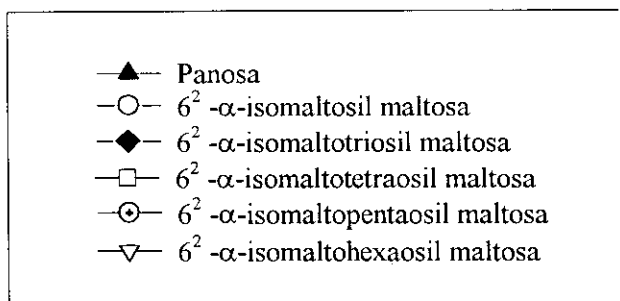
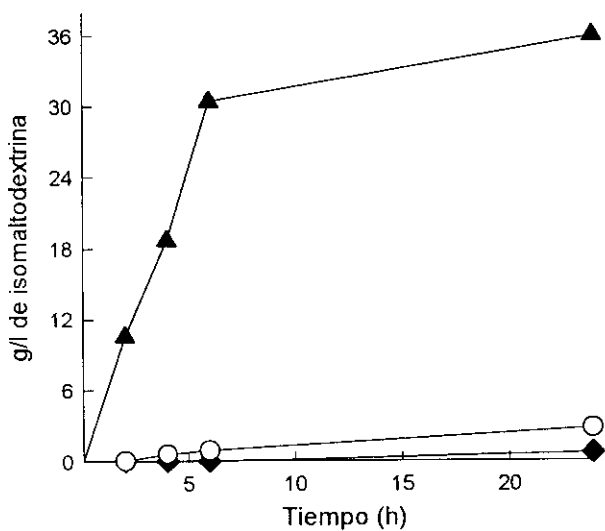


Figura IV.32. Evolución de la reacción de aceptor con la dextransacarasa nativa y una relación maltosa/sacarosa 1:1. Se muestran los cromatogramas de HPLC, obtenidos en las condiciones descritas en el apartado 11 de Materiales y Métodos.



a) MALTOSA/SACAROSA 6:1

Enzima nativa



Enzima inmovilizada en alginato

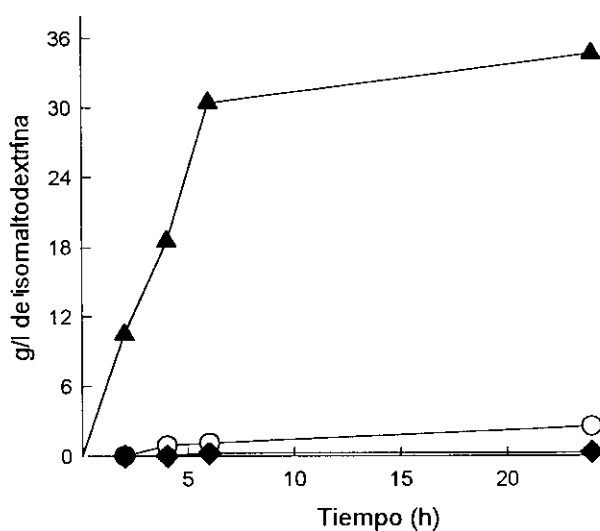
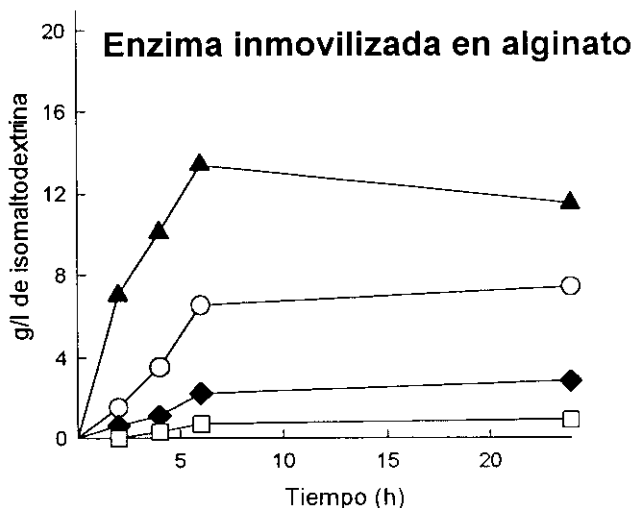
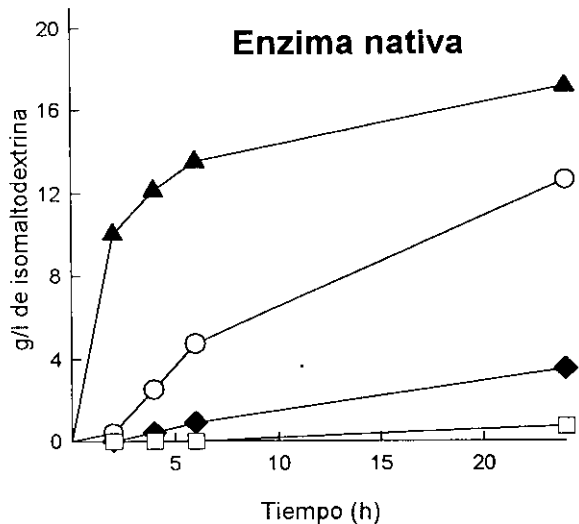
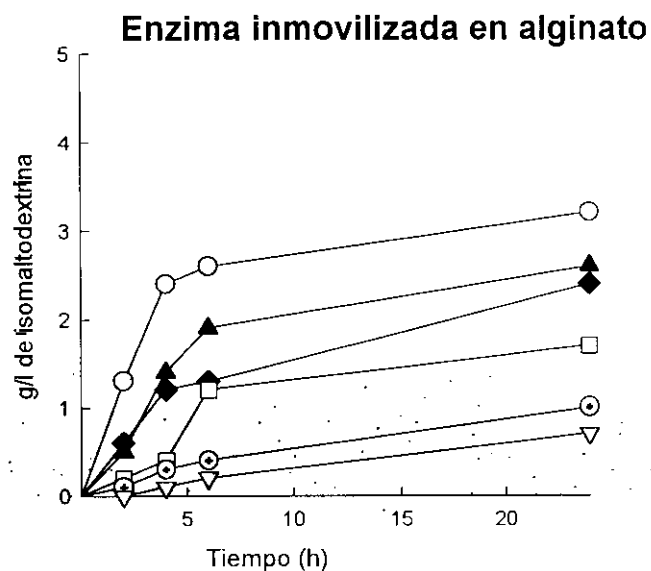
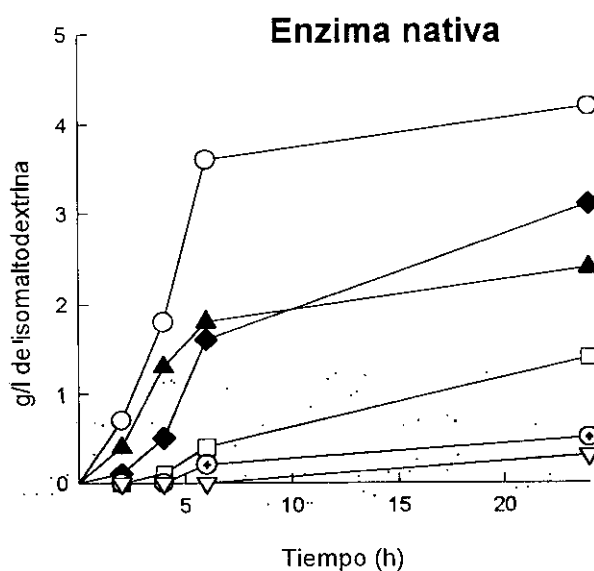


Figura IV.33. Comportamiento de la dextranasa, nativa e inmovilizada en alginato, en la reacción de aceptor utilizando diferentes relaciones molares maltosa:sacarosa 6:1 (a), 1:1 (b) y 1:5 (c).

**b) MALTOSA/SACAROSA 1:1**



**c) MALTOSA/SACAROSA 1:5**



La Tabla IV.11 muestra la producción de GOS (en gramos/litro) en los ensayos realizados con la enzima nativa e inmovilizada en alginato, para diferentes proporciones maltosa/sacarosa. Con la enzima inmovilizada, se puede apreciar cómo los rendimientos son prácticamente iguales a los de la enzima nativa. No obstante, con la dextransacarasa en alginato se observa mayor producción de GOS de serie alta a medida que se disminuye la proporción maltosa/sacarosa (aunque los valores de producción son bajos en ambos casos). Así, utilizando una relación maltosa/sacarosa 1:5, la dextransacarasa inmovilizada dobla su producción respecto a la nativa (0.7 g/l vs 0.3 g/l de isomaltohexosil maltosa).

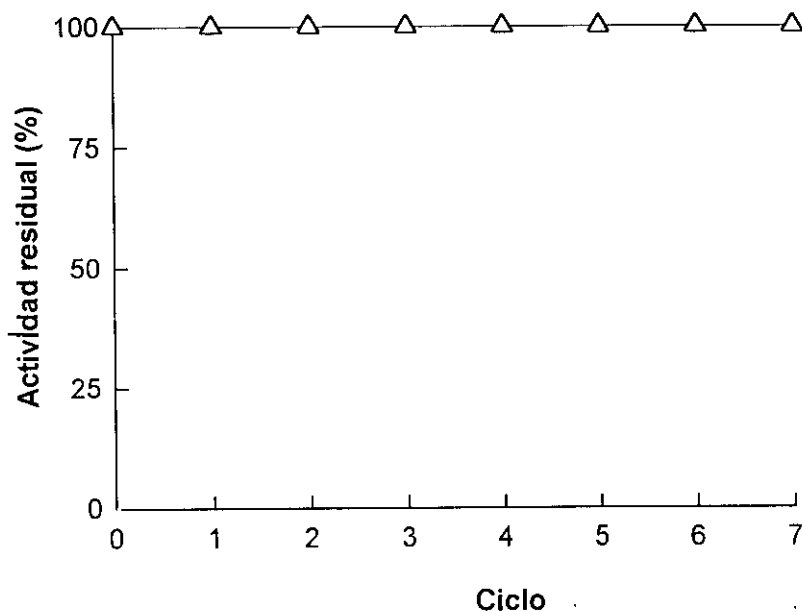
En cuanto a la proporción maltosa/sacarosa empleada, se observa que cuanto más alto es el exceso molar de maltosa, mayor cantidad de GOS se producen, pero con menor selectividad. Por ejemplo, en la relación 6:1 se consiguen unos excelentes rendimientos en producción de panosa (alrededor de 35 g/l), en comparación con la relación 1:5 (en torno a 2.5 g/l). Sin embargo, en 1:5 se producen los GOS con mayor tamaño de la serie (hasta isomaltohexaosil maltosa -G8-), mientras que en 6:1 sólo se detecta formación hasta pentasacáridos - isomaltotriosil maltosa- .

**Tabla IV.11.** Producción a las 24 h de reacción de los diferentes GOS obtenidos en función de la relación maltosa/sacarosa empleada y de la enzima utilizada.

MUESTRA	Maltosa/sacarosa	GLUCOLIGOSACARIDOS PRODUCIDOS (g/l)					
		G3	G4	G5	G6	G7	G8
Nativa	1:5	2.4	4.2	3.1	1.4	0.5	0.3
En alginato	1:5	2.6	3.2	2.4	1.7	1	0.7
Nativa	1:1	17.1	12.6	3.5	0.7		
En alginato	1:1	11.5	7.4	2.8	0.9		
Nativa	2:1	20.8	7.2	1.3	0		
En alginato	2:1	20.3	7.7	1.8	0.4		
Nativa	4:1	30.8	3.4	0.6			
En alginato	4:1	27	3.3	0.7			
Nativa	6:1	36	2.8	0.7			
En alginato	6:1	35	2.5	0.3			

## 4.2 REUTILIZACION DEL BIOCATALIZADOR

Con objeto de comprobar la estabilidad de la enzima en condiciones de la reacción de aceptor, y estudiar la posible reutilización de la enzima inmovilizada en alginato, se diseñaron experimentos de producción durante largos períodos de tiempo. Para ello, se ensayó con la enzima inmovilizada, empleando relaciones molares maltosa/sacarosa 6:1 y 1:5. Tras 24 h de reacción (finalizado el consumo de sacarosa), se separó por filtración la enzima, se lavó con tampón acetato 10 mM pH 5.5 (para eliminar los productos de reacción que pudieran estar asociados al sistema inmovilizado) y se volvió a emplear el biocatalizador en idénticas condiciones de reacción. La actividad catalítica de las esferas de alginato se siguió durante 7 ciclos de 24 h. Como se puede apreciar en la Fig. IV.34, la estabilidad del biocatalizador con relaciones molares 6:1 de maltosa/sacarosa es sobresaliente (no se observó disminución en la actividad catalítica). Con relaciones molares maltosa/sacarosa 1:5 se obtuvieron resultados similares; sin embargo, las bolas de alginato fueron adquiriendo progresivamente un volumen mayor, debido al dextrano que producía la enzima en estas condiciones, por lo que al séptimo día de ensayo tuvo lugar la descomposición de la esfera de alginato.



**Figura IV.34.** Reutilización de la enzima inmovilizada en alginato cálcico tras 7 ciclos de 24 h, empleando una relación molar maltosa/sacarosa 6:1. La actividad residual viene expresada con respecto a los g/l de panosa producidos al finalizar cada ciclo de reacción.

# **V. DISCUSION**

## **1. PURIFICACION DE LA CGTasa**

## **2. MODIFICACION QUIMICA DE LA CGTasa**

### **2.1 MODIFICACION DE LOS GRUPOS AMINO DE LA CGTasa**

#### **2.1.1 ACETILACION**

#### **2.1.2 SUCCINILACION**

### **2.2 MODIFICACION DE LOSGRUPOS CARBOXILO DE LA CGTasa**

#### **2.2.1 SUBSITIOS DEL CENTRO ACTIVO**

#### **2.2.2 REGION DE INFLUENCIA DEL EJE DE CICLACION**

### **2.3 MODIFICACION DE LA CYS DE LA CGTasa**

## **3. INMOVILIZACION DE LA DEXTRANSACARASA**

### **3.1 INMOVILIZACION COVALENTE EN SILICE POROSA**

### **3.2 INMOVILIZACION POR ATRAPAMIENTO EN ESFERAS DE ALGINATO**

### **3.3 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD EN PRESENCIA DE DISOLVENTES ORGANICOS**

## **4. ESTUDIO DE LA REACCION DE ACEPTOR DE LA DEXTRANSACARASA**



## 1. PURIFICACION DE LA CGTasa

Se emplearon dos metodologías diferentes para la purificación de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501. Es fundamental que la preparación final sea pura para los experimentos posteriores de modificación química, ya que si la CGTasa se viera contaminada por otras enzimas, los cálculos y, sobre todo, la interpretación de los resultados de modificación serían ambiguos. En primer lugar, se utilizó el protocolo basado en las propiedades de la matriz tiofilica AFFI-T que fue diseñada para purificar inmunoglobulinas, y se propuso por Novo Nordisk para la purificación de la CGTasa. La matriz AFFI-T está formada por ligandos no proteicos, tiofilicos, inmovilizados sobre una agarosa activada con divinilsulfona. En términos prácticos, dichos ligandos interactúan con los grupos tiol, amino e hidroxilo de las proteínas (Porath y Belew, 1987; Hutchens y Porath, 1987). El factor de purificación (en torno a 3), y especialmente, el rendimiento de la purificación (cerca del 13%) no se consideraron satisfactorios.

Los experimentos de modificación química recogidos en esta Memoria requieren cantidades importantes de proteína (alrededor de 3 mg por ensayo). Esto se debe a que la CGTasa una vez modificada debe someterse a un estudio completo de actividades, tanto a tiempos cortos como a tiempos largos, así como a su caracterización (determinación de  $pI$ , electroforesis, grado de modificación, etc.). Por otro lado, estos estudios deben hacerse, en la mayoría de los casos, por duplicado ya que no sólo se trabaja con la CGTasa modificada, sino también con un control de la enzima nativa en ausencia del agente modificante. En definitiva, se decidió desarrollar otra metodología de purificación con la que se consiguiesen mejores resultados, fundamentalmente en lo que a recuperación final de CGTasa pura se refiere. Para ello se utilizó la cromatografía de afinidad con una Sepharosa activada con  $\alpha$ -ciclodextrina. Con este sistema se lograron rendimientos próximos al 70% y factores de purificación en torno a 4-5. Por lo tanto, se obtuvo una significativa mejora (en particular con respecto al rendimiento -aumentado unas 5 veces-). La explicación de la interacción específica gel/proteína se deduce de la propia estructura de la CGTasa de *Thermoanaerobacter*. Esta enzima posee una elevada afinidad por las moléculas de ciclodextrinas (especialmente por  $\alpha$ - y  $\beta$ -ciclodextrina), gracias a su conformación del centro activo, en el que el residuo de Phe196 se dispone de forma dominante actuando como modulador (eje de ciclación) en los procesos de ciclación y acoplamiento. Por lo tanto, la CGTasa se unirá específicamente a la ciclodextrina inmovilizada en la matriz de Sepharosa y no sólo a través de la interacción entre la Phe196 y la ciclodextrina, sino de otros muchos residuos del centro activo (Asp, Glu, Tyr, His, Lys y Arg) que reconocen la ciclodextrina permitiendo que se acomode perfectamente en la estructura proteica.

Como resultado, se consigue una recuperación satisfactoria de la enzima, si la comparamos con la AFFI-T, en la que las interacciones eran mucho menos selectivas.

Por todo ello, los experimentos de modificación química que se describen en esta Memoria se han realizado a partir de la CGTasa purificada en un gel de Sepharosa activada con  $\alpha$ -ciclodextrina.

## 2. MODIFICACION QUIMICA DE LA CGTasa

Actualmente algunas empresas y grupos de investigación están desarrollando un esfuerzo importante para obtener mutantes de CGTasas termoestables que produzcan mayoritariamente una de las ciclodextrinas ( $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$ -ciclodextrina). A pesar de que se han realizado numerosos trabajos para ampliar el conocimiento del mecanismo de acción de estas enzimas, todavía no se conoce con certeza de qué parámetros depende la selectividad de la reacción. La modificación química, como herramienta complementaria, puede aportar informaciones adicionales sobre las actividades catalíticas y los factores que las rigen. Dichos estudios es conveniente complementarlos con técnicas físico-químicas a fin de comprobar que la modificación no ha dado lugar a cambios conformacionales considerables. En la actualidad estamos analizando mediante algunas de estas técnicas si dichos cambios han tenido lugar con nuestras especies modificadas.

Para la interpretación de los resultados de las modificaciones químicas realizadas sobre la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501, se realizaron unos estudios complementarios de accesibilidad de los aminoácidos de la enzima (ver Anexo II). Dichos estudios son ampliamente empleados en investigación de modelado molecular, pudiendo aplicarse para calcular la accesibilidad de los átomos y residuos superficiales, tanto de proteínas como de ácidos nucleicos. En la presente Memoria, esta información adicional permite establecer hipótesis acerca de qué aminoácidos podrían considerarse los más susceptibles de ser modificados, en función de su mayor exposición al medio. Por otro lado, la interpretación del papel de los distintos aminoácidos en la actividad catalítica se ha realizado empleando la estructura cristalina de la CGTasa de *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (Tabium-CGTasa). Las secuencias de aminoácidos de las CGTasas de *Thermoanaerobacter* y Tabium muestran una gran homología (91%, ver Anexo III), por lo que se asume una similar arquitectura para ambas enzimas. Con respecto a los tipos de residuos sobre los que se ha realizado modificación química, 22 de 24 Lys, 40 de 43 Asp, 15 de 17 Glu y la única Cys ocupan la misma posición en la secuencia de aminoácidos de ambas enzimas.

## 2.1 MODIFICACION DE LOS GRUPOS AMINO DE LA CGTasa

Los estudios de la selectividad  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ -ciclodextrina en función del pH realizados sobre la CGTasa nativa (ver Fig. IV.5) conducen a pensar que, a no ser que se produzcan modificaciones químicas cuantitativas que afecten de forma pronunciada al balance de cargas positivas-negativas de la proteína, la selectividad de la reacción no variará significativamente. Por ello, se buscaron modificaciones extensivas mediante la acilación de los grupos amino de la CGTasa. Sin embargo, y a pesar del alto grado de sustitución conseguido (en torno al 85%), no se consiguió variar significativamente la selectividad de producción de ciclodextrinas (ver Fig. IV.14). No obstante, los resultados de la acilación de los grupos amino de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501, demuestran que los residuos de Lys de esta proteína son fundamentales en sus procesos catalíticos. Tanto mediante acetilación como succinilación, las actividades de ciclación y acoplamiento son las más perjudicadas, mientras que las actividades de transferencia e hidrólisis se ven menos afectadas. Por ello, las actividades a tiempos largos de ambas especies modificadas muestran un aumento en la producción de oligosacáridos en perjuicio de la síntesis de ciclodextrinas. En cualquier caso, el comportamiento de las enzimas modificadas presenta matices diferentes dependiendo del reactivo empleado, como cabe esperar de la distinta carga de los agentes modificantes.

### 2.1.1 ACETILACION

La CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 es una glicosiltransferasa que exhibe una actividad de hidrólisis (actividad  $\alpha$ -amilasa) excepcionalmente alta. La modificación química de sus grupos amino con anhídrido acético produce un significativo desplazamiento hacia su actividad  $\alpha$ -amilasa, ya que, tras la modificación, aumenta su actividad de hidrólisis mientras que el resto de actividades (especialmente la ciclación y el acoplamiento) disminuyen considerablemente.

Estos resultados sugieren la participación de uno o más grupos amino en los procesos de transglicosilación -probablemente a través de la formación de puentes de hidrógeno- y permiten avanzar en el estudio del diferente comportamiento de las CGTasas y las  $\alpha$ -amilasas, dos grupos de enzimas estructuralmente muy relacionadas. En la reacción de ciclación, la cadena de amilosa se dispone en forma espiral en torno a la Phe196 (eje de ciclación) creándose un complejo de inclusión. Asimismo, las ciclodextrinas formadas durante la reacción pueden acceder al centro activo de la enzima desde el medio de reacción, por interacción con el eje de ciclación; produciéndose la posterior reacción de acoplamiento. Por lo tanto, el hecho de que las

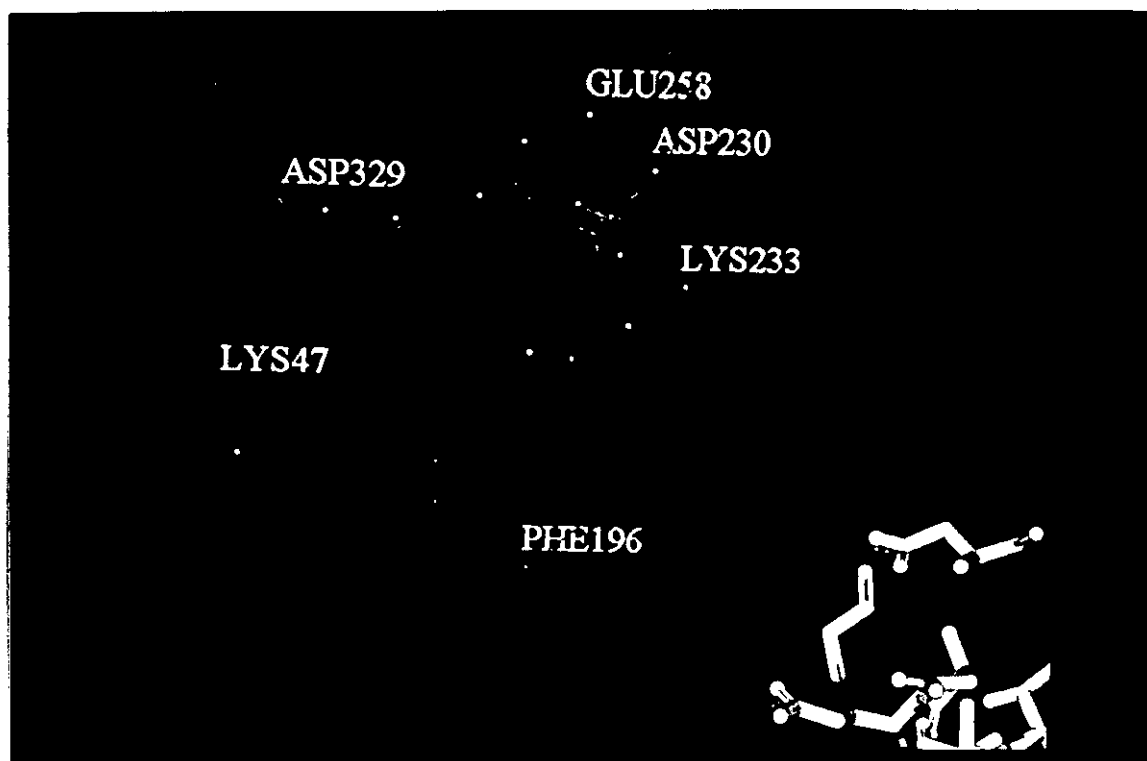
actividades de ciclación y acoplamiento experimenten un descenso considerable tras la modificación es síntoma de que se han alterado los contactos que se establecían entre la ciclodextrina y el centro activo (ya fuera durante su formación -ciclación- o durante su degradación -acoplamiento-).

En este punto conviene recordar que el centro activo de la CGTasa, además de la tríada catalítica (Asp230, Glu258, Asp329) y el eje de ciclación (Phe196), presenta al menos siete subsitios (designados 2', 1', 1, 2, 3, 4, y 5) en los que se sitúa el sustrato (cadena de oligosacárido o ciclodextrina), y en los que se producen interacciones específicas que resultan fundamentales para el rendimiento global de la reacción (ver Fig. I.13). En concreto, se ha postulado que el aminoácido Lys47 desempeña una función primordial en la estabilización del subsitio 3 (S-3) mediante la creación de un puente de hidrógeno con la glucosa en dicha posición (Wind y cols., 1998a). En el caso de que la Lys47 fuera acetilada, se produciría un efecto doble: por un lado, la cadena lateral del aminoácido aumentaría de tamaño; además, al cambiar la carga del residuo de positiva a neutra, éste perdería su capacidad de donador de protones para la formación de puentes de hidrógeno. Por lo tanto, estas alteraciones se podrían traducir en la interrupción del contacto entre la Lys47 y la glucosa en S-3. Esto explicaría la notable reducción de la actividad de ciclación, ya que es requisito imprescindible que la amilosa interactúe en S-3, favoreciendo la torsión de la cadena de azúcar y, en definitiva, la posterior formación de la ciclodextrina. Por el mismo motivo disminuiría la actividad de acoplamiento.

Conviene reseñar, que la principal reacción catalizada por la CGTasa de cualquier especie es la transferencia (Nakamura y cols., 1994a). Las ciclodextrinas únicamente serán producidas cuando el extremo no reductor de la cadena de amilosa escindida sea reconocida por el sitio de unión de aceptor (subsitios S-1' y S-2'). La diferencia fundamental entre los mecanismos de las reacciones de hidrólisis y de transferencia catalizadas por la CGTasa reside en la molécula que actúa como aceptor: el agua (en el caso de la hidrólisis) o el grupo hidroxilo C-4 de un carbohidrato (en el caso de la transferencia). La explicación que se deriva de la baja actividad de transferencia en la CGTasa acetilada involucraría a residuos de lisina que pertenezcan al sitio de unión de aceptor. En este caso, la Lys233 es un residuo clave en la estabilización del subsitio S-2', concretamente a través de un puente de hidrogeno entre el  $\epsilon$ -N de la Lys y la glucosa de S-2' (ver Fig. I.11). La acetilación del amino de dicha lisina supondría la ruptura del puente de hidrógeno, siguiendo el mismo razonamiento sugerido en el caso de la modificación de la Lys47. Así pues, los sustratos lineares que actuaran como aceptores verían dificultada su unión al sitio de aceptor, reduciéndose por ello la reacción de transferencia. Sin embargo, esta alteración no perjudicaría a la reacción de hidrólisis, ya que el agua tiene muchos

menos requerimientos espaciales y es más fácilmente activada; además, su unión al sitio de aceptor únicamente depende del subsitio S-1' (que no se ve afectado).

De ahí que en las actividades a tiempos largos se aprecie un aumento de la síntesis de oligosacáridos, consecuencia de la actividad hidrolítica sobre las cadenas de azúcar en el centro activo (Alcalde y cols., 1999).



**Figura V.1.** Disposición de las Lys47 y Lys233 en el centro activo. En azul se muestra el eje de ciclación, en rojo la tríada catalítica, en verde las Lys47 y Lys233 y en amarillo el segundo sitio de unión de maltosa. Estructura tridimensional procesada con el programa de simulación molecular WebLab ViewerLite 3.10 (MSI).

De los cálculos de accesibilidad de las cadenas laterales de las Lys de la CGTasa (Tabla V.1), se deduce que la Lys47 muestra una elevada exposición al medio de reacción, apoyando la hipótesis de su modificación como principal causa de la pérdida de actividad de ciclación. Del mismo modo, la Lys233 también es probable que haya sido acetilada. El alto grado de modificación (85%) implica que únicamente 4 lisinas (probablemente las Lys132, Lys399, Lys510 y Lys557, todas ellas con accesibilidades relativas inferiores al 7%) posiblemente no hayan sido modificadas.

**Tabla V.1.** Accesibilidad de una molécula de agua (absoluta y relativa) con respecto a las cadenas laterales de los residuos de Lys de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 (se incluye el grupo amino terminal). Los cálculos se han realizado asumiendo la similitud entre las estructuras tridimensionales de la Tabium-CGTasa y la CGTasa de *Thermoanaerobacter*. En el Anexo II se recogen los datos completos de accesibilidad.

RESIDUO	Accesibilidad del agua		RESIDUO	Accesibilidad del agua	
	Absoluta (Å <sup>2</sup> )	Relativa (%)		Absoluta (Å <sup>2</sup> )	Relativa (%)
α-NH <sub>2</sub>	29	---			
Lys47	32	67	Lys393	24	50
Lys48	11	24	Lys399	3.3	7
Lys60	11	23	Lys410	37	77
Lys107	13	27	Lys510	0	0
Lys108	44	93	Lys547	42	87
Lys132	1.5	3.2	Lys549	28	59
Lys213	15	31	Lys557	1.3	2.6
Lys217	10	22	Lys563	18	37
Lys233	6.2	13	Lys617	48	101
Lys241	13	27	Lys648	5.7	12
Lys289	7.2	15	Lys651	21	44
Lys392	49	103	Lys652	21	43

## 2.1.2 SUCCINILACION

A pesar de que los grados de modificación obtenidos tanto con la acetilación (85%) como con la succinilación (80%) son similares, los resultados en las actividades son muy diferentes. La succinilación de los grupos amino de la CGTasa no supone una pérdida importante de sus actividades de ciclación o acoplamiento, mientras que la hidrólisis es prácticamente la misma que en la especie nativa, y experimenta un sorprendente aumento la actividad de transferencia.

Una vez más, se debe discutir la importancia de los residuos de Lys47 y Lys233 en la actividad de la enzima. La hipotética succinilación de la Lys47, aunque provocaría un cambio en el tamaño de la cadena lateral, permitiría seguir interaccionando con la glucosa en S-3, ya que el grupo amino de la cadena lateral de la Lys es reemplazado por un grupo carboxilo que mantiene su capacidad de formar puentes de hidrógeno. En el pH del medio de reacción (5.5), es muy probable que las lisinas succiniladas se encuentren en forma de anión carboxilato (cargado negativamente) el cual es susceptible de formar puentes de hidrógeno, al actuar como aceptores de protones los dos oxígenos del carboxilato. Esto podría explicar que no disminuyan notablemente las actividades de ciclación, y por ende las de acoplamiento.

En cuanto a la Lys233, y empleando la misma línea argumental, su modificación supondría cambios en las interacciones con la glucosa del subsitio S-2', que favorecerían la unión de oligosacáridos al sitio de unión de aceptor.

Como se describió en el capítulo de Introducción (apartado 2.6.2), la unión de la amilosa a la CGTasa se realiza en una zona alejada del centro activo: el sitio de unión de almidón, el cual se compone de dos sitios de unión de maltosa interconectados. La cadena de almidón, unida en su región específica, accede al centro activo a través de un largo canal. La Lys233 no sólo es fundamental en la estabilización del sitio de unión de aceptor de la CGTasa, sino que está posicionada en el límite entre el canal de almidón y el centro activo (Knegtel y cols., 1995). En definitiva, este residuo actúa como modulador de la entrada de sustratos lineares al centro activo, y su posible succinilación beneficiaría los procesos de transferencia (en los análisis de la actividad a tiempos largos, se puede apreciar un considerable incremento en la síntesis de oligosacáridos -de 3.5% de almidón convertido en oligosacáridos a 4.4% en la enzima succinilada-).

El siguiente reto será poner en práctica diversas reacciones con aceptores variados para la obtención de sustancias de alto valor añadido. La reacción de transferencia permite sintetizar azúcares que numerosas veces muestran propiedades mejoradas: mayor poder edulcorante, incremento de su solubilidad en agua, aumento de su estabilidad frente a agentes químicos, estimulación de Bifidobacterias de la microflora intestinal, etc.

## 2.2 MODIFICACION DE LOS GRUPOS CARBOXILO DE LA CGTasa

La modificación química de los grupos carboxilo de la CGTasa condujo a grados de sustitución relativamente bajos, especialmente si se comparan con los conseguidos en la acilación de los grupos amino. Una posible explicación se extrae del análisis de las accesibilidades de los grupos polares de las cadenas laterales (ver Tabla V.1 y Tabla V.2). Así, alrededor de la mitad de los residuos carboxílicos de la CGTasa presentan accesibilidades inferiores al 10% (la mayoría de ellos no superan el 3%), en contrapartida con los grupos amino, de los que tan solo un 15% del total presentan accesibilidades tan bajas. Por otro lado, la modificación con carbodiimida y una amina nucleófila no es tan directa como en la acetilación o succinilación de la proteína. Se trata de una reacción que transcurre en dos pasos consecutivos, y que está limitada por la naturaleza de la carbodiimida (un compuesto muy inestable, con una vida media corta, y un elevado tamaño molecular que puede dificultar su acceso hasta los residuos más escondidos). Como consecuencia de todo ello, los grados de modificación no superaron en el mejor de los casos el 8%.

Estudios preliminares de mutagénesis dirigida sobre la tríada catalítica de la CGTasa dieron lugar a una pérdida absoluta de las actividades de la enzima (Knegtel y cols., 1995). Las accesibilidades relativas del Asp230, Glu258 y Asp329 son 0, 5.4 y 12% respectivamente, por lo que es poco probable que se vean sometidas a modificación. No obstante, se decidió proteger el centro activo con acarbosa durante la modificación. Este inhibidor competitivo es un análogo de la maltotetraosa, y se une en los subsitios del centro activo S-2', S-1', S-1 y S-2, aislando de esta manera la tríada catalítica de la posible modificación química (Villete y cols., 1993; Strokopytov y cols., 1995). Esta molécula no es escindida por la CGTasa debido a sus propiedades inhibitorias derivadas de la ausencia de un grupo hidroxilo en la posición C6 del anillo B (ver Fig. IV.16). Con independencia del nucleófilo empleado durante la modificación química, la tendencia general fue una disminución de las actividades de ciclación y acoplamiento, y en menor medida de hidrólisis y transferencia. En consecuencia, existen uno o varios residuos carboxílicos (diferentes de los de la tríada catalítica) que también participan de algún modo en las actividades de la CGTasa. Con los experimentos de modificación química desarrollados, se han sustituido entre 3 y 5 carboxilos (dependiendo del nucleófilo empleado). Tras el análisis de la estructura de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501, y teniendo en cuenta las accesibilidades relativas de los grupos carboxílicos (hay 18 residuos con accesibilidades superiores al 40%; y de éstos, 5 son mayores del 70%), se sugiere la hipótesis de que la modificación de los residuos ácidos de la CGTasa podría afectar a los subsitios del centro activo y a la región de influencia del eje de ciclación.



**Tabla V.2.** Accesibilidad de una molécula de agua (absoluta y relativa) con respecto a las cadenas laterales de los residuos Glu y Asp de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* (se incluye el grupo carboxilo terminal). Los cálculos se han realizado asumiendo la similitud entre las estructuras tridimensionales de la Tabium-CGTasa y la CGTasa de *Thermoanaerobacter*. Para más información consultar Anexo II.

RESIDUO	Accesibilidad del agua		RESIDUO	Accesibilidad del agua	
	Absoluta (Å <sup>2</sup> )	Relativa (%)		Absoluta (Å <sup>2</sup> )	Relativa (%)
Asp3	1.3	2.4	Asp267	12	23
Asp15	0.8	1.5	Glu276	32	42
Asp23	0.9	1.8	Asp283	0.1	0.2
Asp27	12	21	Asp296	26	47
Asp37	69	126	Asp299	23	43
Asp40	10	19	Asp305	19	35
Asp53	0	0	Asp314	37	68
Asp63	17	32	Asp320	5.4	10
Glu81	16	21	Asp326	2.5	4.6
Asp89	13	24	Asp329	6.6	12.1
Asp105	0.3	0.6	Asp331	41	76
Asp118	34	62	Glu343	5.2	6.9
Asp136	3.2	5.8	Glu363	0	0
Glu147	38	50	Asp371	18	34
Asp149	27	49	Asp382	30	55
Glu154	9.3	12	Asp417	16	29
Asp160	31	57	Glu422	1.4	1.8
Asp171	75	122	Asp458	0	0
Glu188	4.2	5.5	Glu486	7.9	10
Asp189	2.8	5.2	Asp518	0.4	0.7
Asp197	16	29	Glu542	34	44
Asp200	2.1	3.9	Asp543	31	56
Asp202	21	38	Glu545	8.3	11
Asp209	4.0	7.3	Glu599	13	17
Asp221	39	72	Glu609	0	0
Asp225	4.3	8	Asp614	31	56
Asp230	0	0	Asp636	3.9	7.1
Asp245	6.7	12	Glu646	58	76
Glu258	4.1	5.4	Glu660	0	0
Glu265	31	41	Asp680	36	67
			α-COOH	284	---

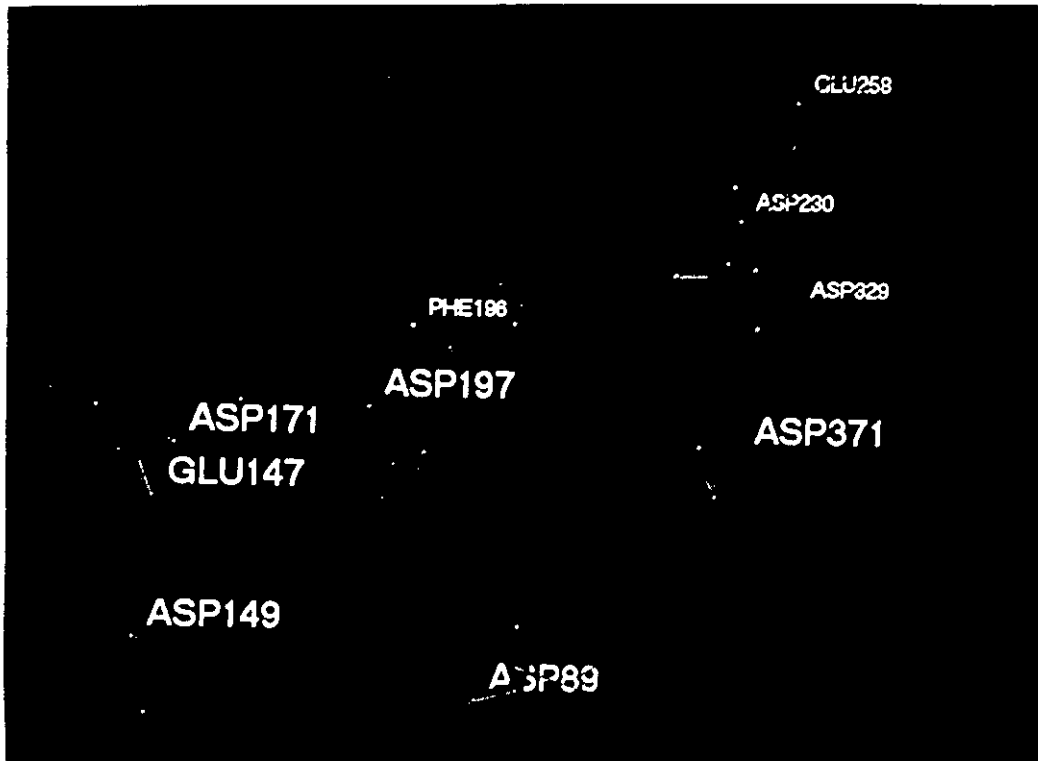
### 2.2.1 SUBSITIOS DEL CENTRO ACTIVO

Durante la modificación química, la molécula de acarbosa protege los subsitios S-2, S-1, S-1' y S-2', pero no el resto de subsitios (de S-3 a S-5). En la región proximal al subsitio S-5, denominada por Strokopytov y cols. (1996) como subsitios S-6 y S-7, tienen lugar interacciones del sustrato (mediante puentes de hidrógeno) con los grupos ácidos del Glu147, Asp149 y Asp171. La elevada accesibilidad relativa de dichos residuos (50, 49 y 122% respectivamente) probablemente favorecería la modificación con carbodiimida, traduciéndose en último término en la desestabilización de la formación de la ciclodextrina. En colaboración con el Dr. Carsten Andersen de la empresa Novo Nordisk, se han realizado estudios paralelos de mutagénesis dirigida sobre los residuos Glu147 y Asp149 de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501, corroborando nuestra hipótesis sobre el importante papel de dichos aminoácidos en la actividad catalítica. Por otro lado, el Asp89 que se dispone adyacente a la Lys47 (Wind y cols., 1998a), en el supuesto caso de que se viera modificado, podría interrumpir la interacción existente entre la Lys47 y la glucopiranososa en S-3 lo que repercutiría en una disminución de la actividad de ciclación y acoplamiento.

Asimismo, el Asp371 desempeña una importante misión, ya que estabiliza junto con la Arg375, el residuo de glucosa en S-2 (Knegtel y cols., 1996). Sin embargo, es poco probable que este residuo haya sido modificado, ya que a pesar de su accesibilidad relativa (34%), durante el proceso de modificación se ve protegido por la molécula de acarbosa.

### 2.2.2 REGION DE INFLUENCIA DEL EJE DE CICLACION

El Asp197 posee una accesibilidad relativa cercana al 30%, y aunque no es de los residuos más expuestos, conviene destacar su importancia en la actividad de la CGTasa. Este aminoácido está situado próximo al eje de ciclación de la CGTasa, y una alteración en su estructura podría variar las interacciones que establece la Phe196 con los sustratos lineares para formar productos cíclicos, o con las ciclodextrinas durante la reacción de acoplamiento. Esta hipótesis se ve reforzada por los trabajos de Wind y cols. (1998a), en los que el mutante D197H en la Tabium-CGTasa presenta menores actividades de ciclación y acoplamiento que la enzima nativa. Las variaciones producidas tras la modificación, entre el Asp197 y la región de influencia de la Phe196 se desconocen. Se hace necesario el estudio cristalográfico detallado de esta zona en presencia de sustratos cíclicos para poder comprender en profundidad el papel que desempeña el Asp197 durante las reacciones de formación o degradación de ciclodextrinas.



**Figura V.2.** Aminoácidos carboxílicos más importantes en la actividad de la CGTasa. En azul se muestra la tríada catalítica y el eje de ciclación, en rojo los residuos carboxílicos. Los Asp149, Glu147 y Asp171 están situados en la región S-6/S-7. El Asp 197 está en la región de influencia de la Phe196. El Asp89 aparece en S-3. El Asp371 se sitúa en S-2 muy próximo a la tríada catalítica. Estructura tridimensional procesada con el programa de simulación molecular WebLab ViewerLite 3.10 (MSI).

Por último, las diferencias observadas en las actividades de las especies modificadas con taurina, con éster etílico de glicina o con éster metílico de norleucina derivan de la propia estructura de estos nucleófilos. En el caso de la taurina, al conservar la carga negativa tras la modificación podría establecer contactos alternativos (mediante puentes de hidrógeno) a los que presentaba la enzima nativa, disminuyendo en parte los efectos perjudiciales de la modificación. Con respecto a la modificación con glicina o norleucina, esta posibilidad se ve debilitada debido a que en ambos casos se transforma la carga negativa en neutra, de ahí su mayor pérdida de actividad y su similar comportamiento.

En resumen, la modificación de los grupos ácido de la CGTasa conduce a un descenso de actividad de ciclación y acoplamiento, y levemente de hidrólisis y transferencia. Sin embargo, estas modificaciones no afectan de manera significativa al comportamiento de la enzima a tiempos largos (y en particular a su selectividad), ya que aunque emplea más tiempo en alcanzar el equilibrio de reacción (debido a su menor actividad inicial), finalmente logra producciones equivalentes a las de la enzima nativa (especialmente en el caso de la variedad modificada con taurina).

## 2.3 MODIFICACION DE LA CYS DE LA CGTasa

La CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 posee un residuo de Cys en la posición 585. Debido a su localización cercana a los sitios de unión de maltosa, y por ser el único residuo de Cys en la enzima, se consideró interesante modificarlo para evaluar el papel de este aminoácido en las actividades de la CGTasa. Sin embargo, tras numerosos intentos con diferentes reactivos -comúnmente utilizados en este tipo de modificaciones-, como son el disulfuro de 2,2'-dipiridilo o el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico), no se consiguió acceder al residuo de Cys. Sometiendo la enzima a condiciones desnaturalizantes (en presencia de SDS o urea) tampoco se logró la modificación química. Una posible explicación de la ausencia de reactividad es que la Cys585 no fuera excesivamente accesible a los agentes modificantes. Efectivamente, si se analiza la accesibilidad de este residuo se comprueba que es 0 (ver Anexo II), lo que conduce a pensar que se encuentra resguardado del medio.



### 3. INMOVILIZACION DE LA DEXTRANSACARASA

La búsqueda de oligosacáridos de interés industrial sintetizados por la dextransacarasa, requiere como paso previo la inmovilización de la enzima que facilite su recuperación del medio de reacción, la reutilización del catalizador y, posiblemente, el aumento de su estabilidad operacional. De entre todos los soportes empleados en inmovilización de la dextransacarasa, se escogieron la sílice porosa y el alginato cálcico. El primero de ellos permite una inmovilización covalente de la enzima que en teoría podría conducir a un aumento de la estabilidad del catalizador (admitiendo la formación de enlaces multipuntuales entre la enzima y el soporte). Los trabajos anteriores con este tipo de soportes (López y Monsan, 1980; Monsan y López, 1981a; Monsan y López, 1981b; Monsan y cols., 1987) no aportaban ningún dato de estabilidad, por lo que se consideró conveniente investigar este punto. En cuanto al alginato cálcico, suponía un adecuado sistema de inmovilización por atrapamiento, aprovechando la estructura macromolecular del complejo enzima-dextrano.

#### 3.1 INMOVILIZACION COVALENTE EN SILICE POROSA

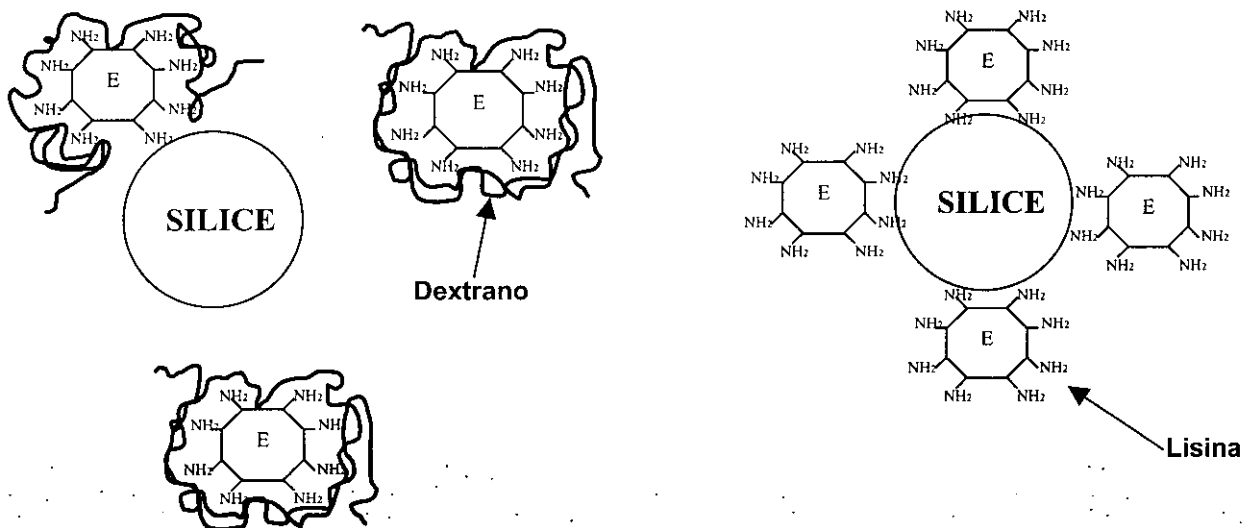
El área específica superficial de la sílice y su diámetro de poro son parámetros importantes en este tipo de inmovilizaciones. De hecho, mientras que para muchas enzimas las condiciones óptimas de inmovilización suponen áreas superficiales en torno a  $100 \text{ m}^2/\text{g}$ , la dextransacarasa obtiene tanto mejor resultado cuanto menor es el área superficial del soporte (o mayor es su diámetro de poro). En efecto, cuando se inmovilizó la enzima sobre soportes con áreas de  $185 \text{ m}^2/\text{g}$  ( $150 \text{ \AA}$  de diámetro de poro) el rendimiento fue prácticamente la mitad del obtenido con sílice de  $50 \text{ m}^2/\text{g}$  ( $600 \text{ \AA}$  de diámetro de poro). La explicación de este resultado se puede extraer de la estructura y del comportamiento intrínseco de la enzima. En primer lugar, el tamaño macromolecular del complejo dextrano-enzima influye sobremanera en la unión de la enzima a la sílice, que penetrará con mayor dificultad en el poro del soporte a medida que el diámetro de éste sea más reducido. Además, una vez que la dextransacarasa es inmovilizada sobre sílice activada, su acción dentro de los poros genera un incremento de la viscosidad del medio como consecuencia de la producción de dextrano, lo que se traduce en limitaciones difusionales. En este caso, el fenómeno de transferencia de masa está en gran medida limitado tanto para el sustrato -desde el medio de reacción hacia la dextransacarasa inmovilizada-, como para los productos -desde el microentorno de la enzima hacia la disolución de trabajo-.

Una vez establecidos los rendimientos de la inmovilización en los diferentes soportes síliceos, se decidió trabajar con una preparación de dextransacarasa sin dextranos y con el

soporte de menor área específica. La principal finalidad de la eliminación del dextrano es facilitar el contacto entre la dextransacarasa y el soporte ya que, como se ha descrito, el complejo dextrano-enzima sufre serios problemas estéricos en su interacción con los grupos activos del soporte. Además, los trabajos previos citados en la literatura de eliminación de la cubierta de dextranos se realizaron con el objeto de tener acceso a determinados residuos de la enzima durante experimentos de modificación química (Funane y cols., 1993; Funane y cols., 1995). Sin embargo, este trabajo es el primero en el que se hace uso de la dextransacarasa sin dextranos para facilitar su inmovilización covalente a un soporte. De hecho, las uniones que se producen entre la enzima y la sílice activada con glutaraldehído involucran a los aminoácidos de Lys de la enzima -74 residuos- (Douglas y cols., 1989) que en la dextransacarasa nativa se encuentran en su mayor parte ocultos por el dextrano envolvente, lo que dificulta este tipo de inmovilización. Por lo tanto, la eliminación de la cubierta de dextranos tiene una doble ventaja: facilitar el acceso de la enzima al interior del poro, y permitir un mayor número de contactos covalentes con el soporte. Esta hipótesis se vio confirmada al lograrse un mayor rendimiento de inmovilización (22 veces superior al de la enzima nativa), lo que supone los mejores resultados descritos hasta el momento en inmovilización de la dextransacarasa sobre sílice porosa. No obstante, el valor absoluto del rendimiento (13%) se puede considerar bajo, por lo que es necesario profundizar más en las interacciones dextransacarasa/sílice.

1. Dextransacarasa nativa

2. Dextransacarasa sin dextrano



**Figura V.4.** Inmovilización covalente de la dextransacarasa en sílice porosa: 1. Enzima con dextranos, que originan un impedimento estérico en el acceso a los poros del soporte, y reducen el número de contactos posibles entre las Lys de la enzima y la sílice. 2. Enzima sin dextranos. Se aumenta el rendimiento de la inmovilización como consecuencia del incremento de interacciones y el menor tamaño de la dextransacarasa. E: enzima.

Respecto a la estabilidad de la enzima inmovilizada, se deben discutir varios aspectos. En primer lugar, la eliminación del dextrano de la dextransacarasa disminuye de manera drástica la vida media. Se ha demostrado que la asociación del dextrano confiere a la enzima propiedades añadidas de estabilidad y solubilidad en agua. Es más, dependiendo del contenido relativo de dextrano, las estabilidades varían considerablemente. Por ejemplo, preparaciones de dextransacarasa con un contenido en dextrano de 2 g/l tienen una vida media a 37°C de 3 h. Con 1.5 g/l la vida media se reduce a 38 min (Willemot, 1993). Por ello, la preparación de dextransacarasa purificada da lugar a una pérdida considerable de actividad a partir de las 6 h de incubación. En el trabajo de la presente Memoria, cuando la dextransacarasa (tanto con dextrano como sin él) fue inmovilizada, su comportamiento en el medio de reacción cambió considerablemente. La enzima nativa inmovilizada sufrió una clara desestabilización (su actividad es nula a las 24 h). No obstante, se trata de los primeros resultados de estabilidad descritos en la literatura con este tipo de inmovilización. Parece claro que las pocas interacciones que se producen entre la dextransacarasa y la sílice no confieren propiedades añadidas de estabilidad -al menos en tampón acetato 10 mM pH 5.4-, sino que repercuten de forma negativa sobre el comportamiento de la enzima. Probablemente, la orientación del complejo dextrano-enzima durante la inmovilización no sea la más adecuada; además, la limitación en el número de contactos entre la enzima y el soporte supone que, en la mayoría de los casos, la dextransacarasa se unirá a éste únicamente por las regiones donde la capa de dextrano sea más tenue y las Lys estén más expuestas. Para corroborar dichas hipótesis sería adecuado realizar experimentos de inmovilización en presencia de inhibidores análogos reversibles, que protejan el centro activo y eviten una orientación incorrecta durante la unión a la sílice.

En cuanto a la preparación sin dextranos, presentará muchos más sitios de unión por lo que la interacción entre la enzima y el soporte no será tan restringida. De ahí que se consiga estabilizar finalmente la preparación sin dextranos, reteniendo cerca del 20% de su actividad tras 48 h de incubación (aunque la pérdida inicial de actividad es más rápida que la de la enzima soluble). Estos resultados sugieren la posible existencia de varias poblaciones de dextransacarasa inmovilizada, con menor o mayor número de interacciones enzima-soporte, y que dan lugar a curvas bifásicas de estabilidad.



## **3.2 INMOVILIZACION POR ATRAPAMIENTO EN ESFERAS DE ALGINATO CALCICO**

Con este tipo de inmovilización se han conseguido rendimientos excelentes a partir de preparaciones de dextransacarasa nativa (con dextranos). Precisamente se aprovecha la peculiar conformación de la enzima para obtener elevados rendimientos de inmovilización. Generalmente una preparación nativa de dextransacarasa contiene menos del 3% de proteína pura; el resto está constituido por dextrano (en torno al 70%), polietilenglicol (19%), acetato sódico y agua. Este elevado contenido de dextrano confiere a la enzima unas características especiales: los dextranos no pueden difundir a través de la red de alginato, por ello el complejo dextrano-enzima evita la salida de la dextransacarasa. Otra explicación alternativa a este fenómeno sería la formación de agregados supramoleculares entre varias moléculas de dextransacarasa y el dextrano (ver Fig. I.17).

Como resultado del atrapamiento en alginato, la dextransacarasa es mucho más estable que la enzima nativa, o que las preparaciones inmovilizadas en sílice. La principal ventaja que otorga esta inmovilización con respecto a la unión covalente en sílice porosa, reside en la ausencia de impedimentos estéricos durante los procesos catalíticos. Mientras que en la esfera de alginato la dextransacarasa retenida posee absoluta libertad de movimiento, y los sustratos difunden a través de los poros del gel con facilidad, la dextransacarasa inmovilizada en sílice presenta una orientación determinada e invariable, que limita (especialmente en el caso de la preparación con dextranos) su actividad catalítica.

## **3.3 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD EN PRESENCIA DE DISOLVENTES ORGANICOS**

La utilización de disolventes orgánicos en reacciones de síntesis catalizadas por enzimas produce dos efectos principales:

-Los disolventes pueden incidir sobre la tasa hidrolasa/transferasa de la enzima, al disminuir la actividad de agua, variando la posición final de equilibrio de la reacción.

-Los disolventes influyen en la solubilidad de los diferentes productos de la reacción, e incluso afectan a las interacciones enzima-sustrato, modificándose de esta forma la selectividad de la reacción. Además, como consecuencia de esas diferencias de solubilidad, se facilita la recuperación de los productos y/o el biocatalizador.

Los resultados de este trabajo sobre la actividad y estabilidad de la dextranasa en presencia de disolventes orgánicos, especialmente en DMSO, son prometedores.

Si se analiza la actividad en la enzima nativa (ver Tabla IV.10), los mejores resultados se obtuvieron en presencia de DMSO, donde la actividad fue mantenida en su mayor parte. Respecto a las variedades inmovilizadas, también con DMSO se consiguieron buenos rendimientos. En el resto de disolventes, las actividades de las enzimas nativas e inmovilizadas fueron significativamente más bajas que las observadas en tampón acetato.

En cuanto a la estabilidad en disolventes orgánicos, la enzima nativa sufre una rápida inactivación tras 15 min de incubación, sobre todo en presencia de DMF y DMA; sin embargo, en DMSO (hasta concentraciones del 25%) la enzima es bastante estable. En este intervalo de concentraciones, el DMSO establece interacciones con el complejo enzima-dextrano (probablemente a través de la formación de puentes de hidrógeno entre la capa de dextrano envolvente y el disolvente orgánico). Se ha descrito el efecto estabilizador del DMSO en otros sistemas enzimáticos (como la  $\alpha$ -quimotripsina) -en concentraciones alrededor del 20% (v/v)- (Moresoli y cols., 1992; Flaschel y Ebmeier, 1998). Sin embargo, en DMSO 50% la enzima disminuye rápidamente su actividad residual. Las especies inmovilizadas en sílice también muestran una tendencia similar. No obstante, la enzima sin dextranos en sílice, en presencia de DMSO, es mucho más estable que la nativa en sílice, como consecuencia de su comportamiento durante la inmovilización. A pesar de ello, su actividad residual tras 6 h de incubación se considera insuficiente para trabajar en reacciones con aceptores.

Cuando la enzima está atrapada en alginato, su actividad residual varía en función del disolvente empleado. De hecho, la inmovilización en esferas de alginato mejora la estabilidad en DMSO más que en cualquier otro disolvente orgánico, mostrando una excelente resistencia bajo concentraciones de hasta el 50%.

En definitiva, el disolvente polar más apropiado para la dextranasa es el DMSO, lo cual parece estar relacionado con su valor de  $\log P$  (-1.3), el más bajo de todos los disolventes orgánicos empleados (Laane y cols., 1987). A concentraciones del 25% (v/v), la enzima nativa presenta una gran estabilidad (incluso ligeramente más alta que en tampón acetato). Al 50% (v/v), sin embargo, la estabilidad es muy baja (perdiendo la actividad completamente tras 6 h). Por el contrario, la dextranasa en alginato retiene el 40% de su actividad inicial en DMSO al 50% (v/v) después de un día de incubación. En consecuencia, las mejores condiciones para trabajar con la dextranasa en presencia de DMSO son con la especie inmovilizada en alginato. El siguiente paso sería explorar la reacción de aceptor en este medio para mejorar el rendimiento o variar la selectividad.

## 4. ESTUDIO DE LA REACCION DE ACEPTOR DE LA DEXTRANSACARASA

Los resultados obtenidos en la reacción de aceptor con maltosa utilizando la dextransacarasa soluble e inmovilizada en alginato, permiten extraer conclusiones relevantes del comportamiento de esta enzima, al tiempo que abren nuevas vías para la obtención de neosacáridos de potencial interés. Existen dos parámetros que deben analizarse para comprender el comportamiento de la dextransacarasa en reacciones con aceptores: la concentración de sustratos y la relación molar de éstos.

Se decidió realizar un estudio completo partiendo de una concentración constante de sacarosa (100 mM) y variando con respecto a ésta la de maltosa. Conviene recordar que el centro activo de la dextransacarasa contiene dos sitios de unión de sacarosa, dos sitios de polimerización de la cadena de dextrano y un sitio de unión de aceptor. Si se emplean concentraciones cercanas a 200 mM de sacarosa, se activa un tercer sitio de unión de sacarosa que únicamente trabaja a elevadas concentraciones, y que liga la sacarosa promoviendo cambios alostéricos en el centro activo de la enzima. Dichos cambios afectan de manera determinante a la actividad de la dextransacarasa (Tanriseven y Robyt, 1993). Con concentraciones de sacarosa inferiores a 100 mM, las producciones son más limitadas (Su y Robyt, 1993).

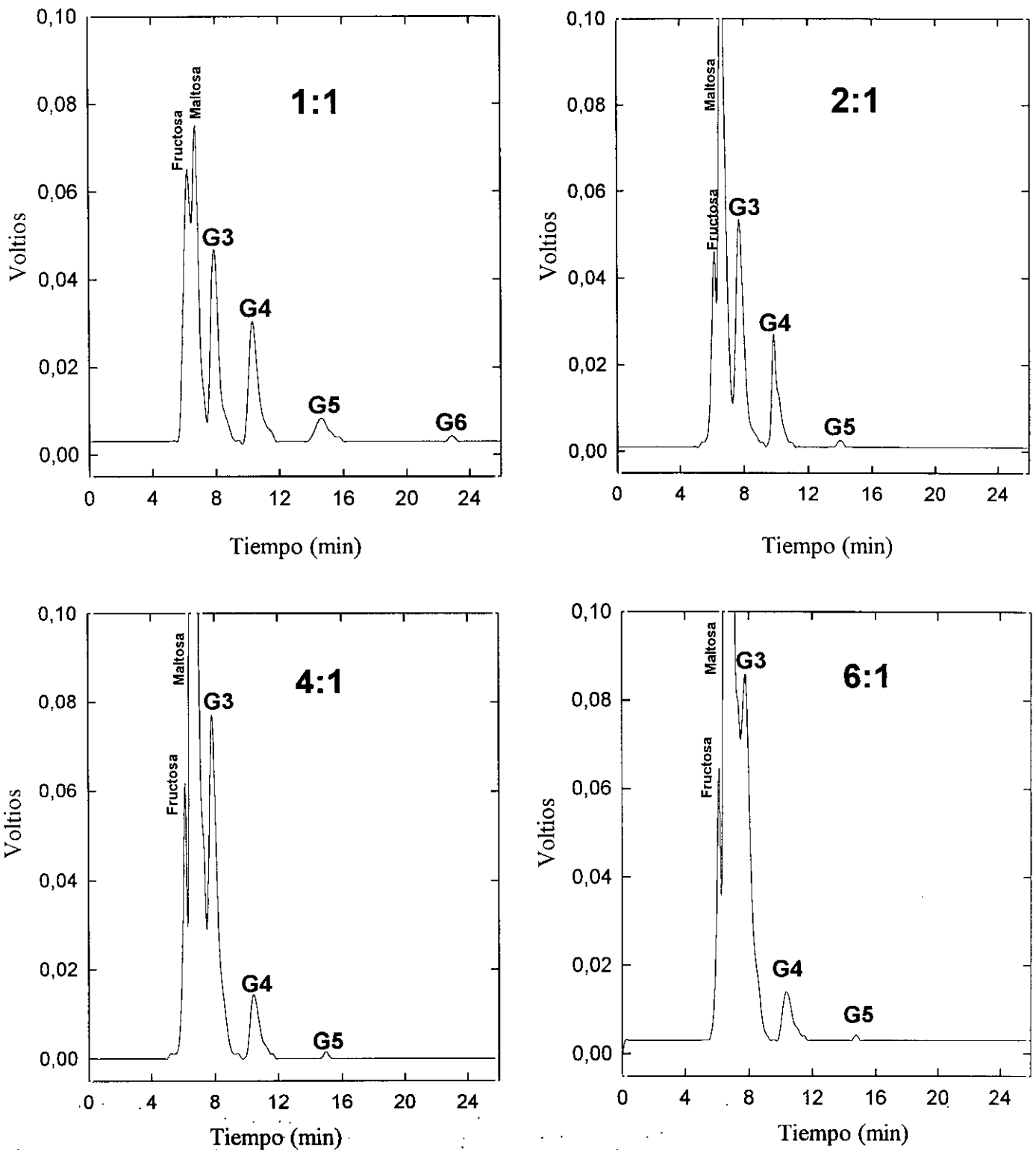
Por otro lado, con este tipo de sistemas, cuanto mayor sea la relación molar maltosa/sacarosa, más cantidad de producto de aceptor se obtiene en detrimento de la síntesis de dextrano. Este comportamiento se debe a razones meramente competitivas. Cuando la sacarosa es el sustrato mayoritario de la reacción, sus sitios de unión son ocupados continuamente debido a la necesidad de suministrar glucosa para favorecer la síntesis de dextrano. Sin embargo, cuando el aceptor (en este caso la maltosa) está presente en la reacción competirá con la síntesis de la cadena de dextrano, desviando moléculas de glucosa de uno de los dos sitios de polimerización del dextrano hacia el sitio de unión de aceptor y, en definitiva, promoviendo la síntesis de glucooligosacáridos (GOS). Por este motivo, con relaciones molares 6:1 de maltosa/sacarosa, se consiguen elevadas producciones de panosa (35 g/l) en comparación con las obtenidas con una relación 1:5 (2.5 g/l).

No obstante, el empleo de relaciones molares maltosa/sacarosa elevadas, si bien permite producir importantes cantidades de GOS, la variedad de éstos en la serie homóloga es muy limitada. De hecho, con relaciones 1:5 se pueden llegar a sintetizar GOS de hasta 8 residuos de glucopiranosas, mientras que con relaciones 6:1, solamente se consiguen grados de polimerización de 5. En los casos intermedios (1:1, 2:1, y 4:1) a medida que aumentó la

relación maltosa/sacarosa, disminuye el grado de polimerización. Cuando la concentración del primer producto de aceptor (en este caso la panosa) se hace suficientemente alta (con respecto al resto de sustratos que compiten por el sitio de aceptor), podrá actuar a su vez como aceptor para generar el siguiente producto de la serie. Por ello, cuando se trabaja con exceso de sacarosa frente a maltosa, se forman una gran variedad de productos de aceptor. Sin embargo, cuando se emplean concentraciones de maltosa elevadas, aunque se incrementa la producción de GOS (mediante el desplazamiento de la síntesis de dextrano), no se favorece el desarrollo de la serie homóloga. De esta manera, y en función del producto que se quiera obtener, se hará uso de unas relaciones u otras. La Fig. V.5 recoge los cromatogramas de producción de GOS con diferentes relaciones maltosa/sacarosa.

En resumen, las concentraciones relativas de los distintos productos de aceptor, así como la cantidad de dextrano producido, dependen de la relación molar aceptor/sacarosa y de las concentraciones de aceptor y sacarosa. Por otro lado, el empleo de la dextransacarasa inmovilizada en alginato presenta numerosas ventajas para este tipo de reacciones. En primer lugar, la reutilización de la enzima es un factor importante, ya que se ha comprobado el mantenimiento de la actividad de la dextransacarasa en alginato tras varios ciclos de producción. Respecto al curso de la reacción, se han apreciado comportamientos equivalentes tanto de la enzima nativa como de la inmovilizada, pero con pequeñas diferencias. Con la preparación en alginato se observa una mayor producción de GOS de alto grado de polimerización con respecto a la enzima nativa. Como se describió en el capítulo de Resultados, con relaciones molares maltosa/sacarosa 1:5, la dextransacarasa inmovilizada prácticamente dobla su producción de G5, G6, G7 y G8 con respecto a la nativa. La principal causa de este comportamiento podría estar relacionada con las estabilidades relativas de la enzima nativa e inmovilizada. Mientras que la variedad inmovilizada retiene el 100% de su actividad tras 24 h de incubación, la enzima nativa sólo conserva alrededor del 60% en el mismo tiempo. Dado que la formación de G5 a G8 se produce en las últimas etapas de la reacción (cuando los GOS de alto peso molecular alcanzan una concentración suficiente como para poder actuar como aceptores), en esta fase la enzima nativa será menos activa que la variedad inmovilizada.

La reacción de aceptor empleando la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512F inmovilizada en esferas de alginato es un método prometedor y versátil, que permite de una manera sencilla la obtención de azúcares que pueden tener inmediatas aplicaciones. El siguiente paso será diseñar reactores continuos de lecho fijo con la dextransacarasa inmovilizada, para aplicarlos a reacciones con diversos aceptores.



**Figura V.5.** Análisis de HPLC de la reacción de la dextransacarasa con maltosa como aceptor, empleando diferentes relaciones maltosa/sacarosa. A medida que se baja la concentración de maltosa, aumenta el grado de polimerización, pero disminuye la cantidad de productos sintetizados.

## **VI. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se desprenden del trabajo presentado en esta Memoria son las siguientes:

1) La purificación de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 es preferible que se realice con geles de Sepharosa activados con  $\alpha$ -ciclodextrina.

2) La CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. 501 presenta la actividad hidrolítica más alta descrita hasta el momento para cualquier CGTasa.

3) La modificación química de los residuos de Lys de la CGTasa con anhídrido acético produce un desplazamiento de su actividad glicosiltransferasa hacia su actividad  $\alpha$ -amilasa. El análisis estructural y los cálculos de accesibilidad permiten sugerir las Lys47 y Lys233 como responsables de dicho efecto.

4) El descenso en las actividades de ciclación, acoplamiento (y en menor medida hidrólisis y transferencia) tras la modificación química de los residuos carboxílicos de la CGTasa indica el importante papel de dichos grupos, especialmente los que circundan a la tríada catalítica.

5) La selectividad  $\alpha$ : $\beta$ : $\gamma$ -ciclodextrina de la CGTasa no se ve apenas afectada por la modificación química de sus grupos polares o la variación del pH del medio de reacción, lo que parece indicar que se trata de una selectividad intrínseca, dependiente del microorganismo productor de la enzima, y sobre la que es difícil actuar.

6) La eliminación de la cubierta de dextrano de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512F facilita la inmovilización covalente de la enzima sobre soportes de sílice porosa, mejorando 22 veces el rendimiento obtenido con la enzima nativa.

7) El atrapamiento de la dextransacarasa en esferas de alginato cálcico es el sistema de inmovilización más adecuado para este tipo de enzimas, obteniéndose resultados óptimos en cuanto al rendimiento de inmovilización, la estabilidad operacional y la reutilización del biocatalizador.

8) El disolvente polar más apropiado para la dextransacarasa es el dimetilsulfóxido (DMSO), siendo preferible trabajar con la enzima inmovilizada en alginato.

9) La reacción con maltosa como aceptor de la dextransacarasa está modulada por la relación molar aceptor/sacarosa y la concentración de éstos en el medio de reacción. Cuanto mayor es la relación maltosa/sacarosa, mayor es la producción glucooligosacáridos (GOS) en perjuicio de la síntesis de dextrano, y menor tamaño tiene la serie homóloga. Sin embargo, con relaciones pequeñas aumenta la serie homóloga, pero se reduce la cantidad global de GOS producidos.



## VII. BIBLIOGRAFIA

1. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1974, 1(1), 1-10.
2. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1975, 2(1), 1-10.
3. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1976, 3(1), 1-10.
4. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1977, 4(1), 1-10.
5. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1978, 5(1), 1-10.
6. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1979, 6(1), 1-10.
7. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1980, 7(1), 1-10.
8. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1981, 8(1), 1-10.
9. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1982, 9(1), 1-10.
10. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1983, 10(1), 1-10.
11. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1984, 11(1), 1-10.
12. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1985, 12(1), 1-10.
13. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1986, 13(1), 1-10.
14. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1987, 14(1), 1-10.
15. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1988, 15(1), 1-10.
16. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1989, 16(1), 1-10.
17. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1990, 17(1), 1-10.
18. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1991, 18(1), 1-10.
19. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1992, 19(1), 1-10.
20. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1993, 20(1), 1-10.
21. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1994, 21(1), 1-10.
22. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1995, 22(1), 1-10.
23. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1996, 23(1), 1-10.
24. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1997, 24(1), 1-10.
25. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1998, 25(1), 1-10.
26. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 1999, 26(1), 1-10.
27. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2000, 27(1), 1-10.
28. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2001, 28(1), 1-10.
29. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2002, 29(1), 1-10.
30. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2003, 30(1), 1-10.
31. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2004, 31(1), 1-10.
32. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2005, 32(1), 1-10.
33. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2006, 33(1), 1-10.
34. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2007, 34(1), 1-10.
35. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2008, 35(1), 1-10.
36. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2009, 36(1), 1-10.
37. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2010, 37(1), 1-10.
38. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2011, 38(1), 1-10.
39. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2012, 39(1), 1-10.
40. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2013, 40(1), 1-10.
41. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2014, 41(1), 1-10.
42. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2015, 42(1), 1-10.
43. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2016, 43(1), 1-10.
44. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2017, 44(1), 1-10.
45. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2018, 45(1), 1-10.
46. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2019, 46(1), 1-10.
47. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2020, 47(1), 1-10.
48. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2021, 48(1), 1-10.
49. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2022, 49(1), 1-10.
50. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 2023, 50(1), 1-10.

## BIBLIOGRAFIA

Aeckersberg, F.; Bak, F. and Widdel, F. (1991). Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO<sub>2</sub> by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.*, 156: 5-14.

Alcalde, M.; Plou, F.J.; Pastor, E. and Ballesteros, A. (1996). Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) from *Thermoanaerobacter* sp. Effects of chemical modification on its activity and product specificity. In: "Comunicaciones del III Congreso Ibérico de Biotecnología", 409-410. Eds.: Fernández-Polanco, F.; García Encina, P.A.; González Benito, G. y Peña Miranda, M.P. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Valladolid.

Alcalde, M., Plou, F.J., Pastor, E. and Ballesteros, A. (1998a). Effect of chemical modification of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) from *Thermoanaerobacter* sp. on its activity and product selectivity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 864: 183-187

Alcalde, M.; Plou, F.J.; Martín, M.T.; Remaud, M.; Monsan, P. and Ballesteros, A. (1998b). Stability in the presence of organic solvents of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F immobilized in calcium-alginate beads. In: "Stability and Stabilization of Biocatalysts", 535-540. Eds.: Ballesteros, A.; Plou, F. J.; Iborra, J.L. and Halling, P. Elsevier, Amsterdam.

Alcalde, M.; Plou, F. J.; Andersen, C.; Martín, M.T.; Pedersen, S. and Ballesteros, A. (1999). Chemical modification of lysine side chains of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Thermoanaerobacter* causes a shift from CGTase to  $\alpha$ -amylase specificity. *FEBS Lett.*, 445: 333-337.

Auriol, D. (1985). Production et purification en continu de la dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Tesis Doctoral. INSA. Toulouse.

Bar, R. and Ulitzur, S. (1994). Bacterial toxicity of cyclodextrins: Luminous *Escherichia coli* as a model. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41: 574-577.

Barker, P.E. and Ajongwen, N.J. (1991). The production of the enzyme dextransucrase using nonaerated fermentation techniques. *Biotechnol. Bioeng.*, 37: 703-707.

Bekers, O.; Beijnen, J.N. and Underberg W.J.M. (1988). The effect of cyclodextrins on the mitomycin stability in acidic aqueous media. In: "Proceedings of the 4<sup>th</sup> Int. Symp. on Cyclodextrins", 313-317. Eds.: Huber, O. and Szejtli, J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Bender, H. (1986). Production, characterization, and application of cyclodextrins. In: "Advances in Biotechnological Processes", 6:31-71. Eds.: Mizrahi, A. Alan R. Liss Inc. New York.

Bernfeld, P. (1955). Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Meth. Enzymol.*, 1: 149-158

Böker, M.; Jördening, H.J. and Buchholz, K. (1994). Kinetics of leucrose formation from sucrose by dextransucrase. *Biotechnol. Bioeng.*, 43: 856-864.

Boyce, C.O. (1986). Amylases-Enzymes that hydrolyze starch. In: "Novo's Handbook of Practical Biotechnology", 70-77. Eds.: Boyce, C.O. Novo Industry A/S, Denmark.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

Brocklehurst, K. and Little, G. (1973). Reactions of papain and of low-molecular-weight thiols with aromatic disulfides. 2, 2'-Dipiridyl disulfide as a convenient active-site titrant for papain even in the presence of other thiols. *Biochem. J.*, 133: 67-80.

Buchholz, K.; Stoppok, E.; Matalla, K.; Reh, K. and Jördening, H.J. (1991) Enzymatic sucrose modification and saccharide synthesis. In: "Carbohydrates as organic raw materials", 155-168 Ed.: Lichtenthaler, F.W. VCH, Weinheim.

Carraway, K.L. and Koshland, D.E. (1972). Carbodiimide modification of proteins. *Meth. Enzymol.*, 25: 616-622.

Castillo, E.; Iturbe, F.; Lopez-Munguia, A.; Pelenc, V.; Paul, F. and Monsan, P. (1992). Dextran and Oligosaccharide Production with Glucosyltransferases from Different Strains of *Leuconostoc mesenteroides*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 672: 425-430.

Chang, H.N.; Ghim, Y.S.; Cho, Y.R.; Landis, D. and Reilly, P.J. (1981). Immobilization of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase to porous phenoxyacetyl cellulose beads. *Biotechnol. Bioeng.*, 23: 2647-2653.

Chothia, C. (1976). The nature of the accessible and buried surfaces in proteins. *J. Mol. Biol.*, 105: 1-14

Dalmia, B.K.; Schutte, K. and Niokolov, Z.L. (1995). Domain E of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase: an independent starch-binding domain. *Biotechnol. Bioeng.*, 47: 575-584.

Delbourg, M.F.; Drouet, P.; De Moraes, F.; Thomas, D. and Barbotin, J.N. (1993). Effect of PEG and other additives on cyclodextrin production by *Bacillus macerans* cyclomaltodextringlycosyltransferase. *Biotechnol. Lett.*, 15: 157-162.

Dijkhuizen, L.; Penninga, D.; Rozeboom, H.J.; Strokopytov, B. and Dijkstra, B.W. (1995). Protein engineering of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251. In: "Carbohydrate Bioengineering", 165-174. Eds.: Petersen, S.B.; Svensson, B. and Pedersen, S. Elsevier Science, Amsterdam.

Dols, M.; Remaud-Simeon, M. and Monsan, P. (1997a). Dextranucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Comparison with *L. mesenteroides* NRRL B-512F. *Enzyme and Microb. Technol.*, 20: 523-530.

Dols, M.; Remaud-Simeon, M.; Willemot, R.M.; Vignon, M. and Monsan, P. (1997b). Characterization of dextranucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 62: 47-59.

Dols, M.; Remaud-Simeon, M. and Monsan, P. (1998a). Optimization of the production of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 and its applications to the synthesis on non digestible glucooligosaccharides. In: "Proceedings of 2<sup>nd</sup> European Symposium on Biochemical Engineering Science", 86-87.

Dols, M.; Remaud-Simeon, M.; Willemot, R.M. and Monsan, P. (1998b). Residence time distribution analysis of reactors packed with calcium alginate gel beads containing *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 insoluble dextranucrase. In: "Proceedings of 2<sup>nd</sup> European Symposium on Biochemical Engineering Science", 364-365.

Dols, M.; Remaud-Simeon, M.; Willemot, R.M.; Vignon, M. and Monsan, P. (1998c). Characterization of the different dextranucrase activities excreted in glucose, fructose, or sucrose medium by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Appl. Environ. Microb.*, 64: 1298-1302.

Duchene, D. (1988). New trends in pharmaceutical applications of cyclodextrin inclusion compounds. In: "Proceedings of the 4<sup>th</sup> Int. Symp. on Cyclodextrins", 265-275. Eds.: Huber, O. and Szejtli, J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

El-Sayed, A.H.; Mahmoud, W.M. and Robert, W. (1990a). Comparative study of production of dextranucrase and dextran by cells of *Leuconostoc mesenteroides* immobilized on celite and in calcium alginate beads. *Biotechnol. Bioeng.*, 36: 83-91.

El-Sayed, A.H.; Mahmoud, W.M. and Coughling, R.W. (1990b). Production of dextranucrase and dextran by *Leuconostoc mesenteroides* immobilized in calcium-alginate beads: semicontinuous fed-batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 36: 346-353.

Feederle, R.; Pajatsch, M.; Kremmer, E. and Bock, A. (1996). Metabolism of cyclodextrins by *Klebsiella oxytoca* M5a1: Purification and characterization of a cytoplasmically located cyclodextrinase. *Arch. Microbiol.*, 165: 206-212.

Flaschel, E. and Ebmeier, L. (1998). Stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by DMSO. In: Stability and Stabilization of Biocatalysts., 233-228. Eds.: Ballesteros, A.; Plou, F. J.; Iborra, J. L. and Halling, P. Elsevier, Amsterdam.

- French, D. and Rundle, R.E. (1942). The molecular weights of the schardinger  $\alpha$ - and  $\beta$ -dextrins. *J. Am. Chem. Soc.*, 64: 1651-1655.
- Freudenberg K. and Jacobi, R. (1935). Über schardinger dextrine aus stärke. *Liebigs. Ann. Chem.*, 518: 102-108.
- Freudenberg K. and Cramer, F. (1948). Die konstitution der schardinger-dextrine  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . *Naturforsch.*, 3: 464-468.
- Fu, D. and Robyt J.F. (1990). A facile purification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextransucrase. *Prep. Biochem.*, 20: 93-106.
- Funane, K.; Shiraiwa, M.; Hashimoto, K.; Ichishima, E. and Kobayashi, M. (1993). An active-site peptide containing the second essential carboxyl group of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* by chemical modifications. *Biochemistry*, 32: 13696-13702.
- Funane, K; Arai, T.; Chiba, Y.; Hashimoto, K.; Ichishima, E. and Kobayashi, M. (1995) Sucrose and dextran-binding sites of dextransucrase analyzed by chemical modification with O-phthalaldehyde. *Oyo Toshitsu Kagaku* 42: 27-35.
- Gawande, B.N.; Singh, R.K.; Chauhan, A.K.; Goel, A. and Patkar, A.Y. (1998). Optimization of cyclomaltodextrin glucanotransferase production from *Bacillus firmus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 22: 288-291
- Germaine, G.R. and Schachtele, C.F. (1976). *Streptococcus mutants* dextransucrase: mode of interaction with high-molecular-weight dextran and role in cellular aggregation. availability of disaggregated enzyme after growth in a chemically defined medium. *Infect. Immun.*, 13: 365-372.
- Gilles, M. A., Hudson, A. Q and Borders, C. L. (1990). Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. *Anal. Biochem.*, 184: 244-248.
- Glazer, A.N.; Delange, R.J. and Sigman, D. S. (1975). Chemical modification of proteins. Selected methods and analytical procedures. Eds.: Work, T. S. and Work, E. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Goel, A. and Nene, S. (1995). A novel raw starch degrading cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*. *Biotechnol. Lett.*, 17: 411-416.
- Gueguen, J.; Bollecker, S.; Schwenke, K.D. and Raab, B. (1990). Effect of succinylation on some physicochemical and functional properties of the 12S storage protein from rapessed (*Brassica napus L.*). *J. Agric. Food. Chem.*, 38: 61-69.

Habeeb, A.F. (1966). Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.*, 14: 328-336.

Haga, K.; Harata, K.; Nakamura, A. and Yamane, K. (1994). Crystallization and preliminary X-ray studies of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011. *J. Mol. Biol.*, 237: 163-164.

Hartmeier, W. (1984). Immobilisierte Biokatalysatoren. Springer Verlag, Berlin.

Hashimoto, H. (1988). Applications of cyclodextrins to foods, toiletries, and other products in Japan. *In: "Proceedings of the 4<sup>th</sup> Int. Symp. on cyclodextrins"*. Eds.: Huber, O. and Szejtli, J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Hirai, H.; Toshima, N. and Uenoyama, S. (1981). Inclusion complex formation of cyclodextrin with large dye molecule. *Polymer Journal* 13: 607-610.

Hoare, D.G. and Koshland, D.E. (1967). A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *J. Biol. Chem.*, 242: 2447-2453.

Horikoshi, K. (1988). Enzymology and molecular genetics of cyclodextrin-forming enzymes. *In: "Proceedings of the 4<sup>th</sup> Int. Symp. on Cyclodextrins"*, 7-17. Eds.: Huber, O. and Szejtli, J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Hubbard, S.J.; Campbell, S.F. and Thornton, J.M. (1991). Molecular recognition. Conformational analysis of limited proteolytic sites and serine proteinase protein inhibitors. *J. Mol. Biol.*, 220: 507-530.

Hubbard, S.J. and Thornton, M.M. (1993). NACCESS V2.1.1. Atomic solvent accessible area calculations. Computer Program, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College, London.

Hutchens, T.W. and Poratch J.O. (1987). Protein recognition of immobilized ligands: promotion of selective adsorption. *Clin. Chem* 33: 1502-1508.

Jamuna, R.; Saswathi, N.; Sheela, R. and Ramakrishna, S.V. (1993). Synthesis of cyclodextrin glucosyltransferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 43: 163-176

Janecek, S. (1994). Parallel  $\beta/\alpha$  barrels of  $\alpha$ -amylase, cyclodextrin glycosyltransferase and oligo-1,6-glucosidase versus the barrel of  $\beta$ -amylase: evolutionary distance is a reflection of unrelated sequences. *FEBS Lett.*, 353: 119-123.

- Jeang, C.L. and Lin, Y.W. (1994). Evidence for the presence of essential histidines on cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus macerans*. *Biotechnol. Appl. Bioc.* 19: 85-92.
- Juhász, A.; Salgo, A. and Sebok, A. (1988). Application of  $\beta$ -cyclodextrin in meat industry. In: "Proceedings of the 4<sup>th</sup> Int. Symp. on cyclodextrins", 551-555. Eds.: Huber, O. and Szejtli, J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Kaboli, H. and Reilly, P. (1981). Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. *Biotech. Bioeng.*, 22: 1055-1069.
- Kato, C. and Horikoshi, H. (1984). *Anal. Chem.*, 56: 1738-1740.
- Kierstan, M. and Bucke, C. (1977). The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. *Biotech. Bioeng.*, 19: 387-397.
- Kim, D. and Robyt, J.F. (1994a). Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC constitutive dextransucrase. *Enzyme Microb. Technol.*, 16: 1010-1014.
- Kim, D. and Robyt, J.F. (1994b). Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrases. *Enzyme Microb. Technol.*, 16: 659-664.
- Kim, T.J.; Kim, B.C. and Lee, H.S. (1995). Production of cyclodextrins using moderately heat-treated cornstarch. *Enzyme Microb. Technol.*, 17: 1057-1061.
- Kim, D. and Robyt, J.F. (1995a) Dextransucrase constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. *Enzyme Microb. Technol.*, 17: 1050-1056.
- Kim, D. and Robyt, J.F. (1995b) Production, selection, and characteristics of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-742 constitutive for dextransucrases. *Enzyme Microb. Technol.*, 17: 689-695.
- Kitaoka, M. and Robyt, J.F. (1998). Large-scale preparation of highly purified dextransucrase from a high-producing constitutive mutant of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC. *Enzyme Microb. Technol.*, 23: 386-391.
- Klein, C.; Hollender, J.; Bender, H. and Schulz, G.E. (1992). Catalytic center of cyclodextrin glycosyltransferase derived from X-ray structure analysis combined with site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 31: 8740-8746.
- Knegtel, R.M.A.; Strokopytov, B.; Penninga, D.; Faber, O.G.; Rozeboom, H.J.; Kalk, K.H.; Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B.W. (1995). Crystallographic studies of the interaction of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 with natural substrates and products. *J. Biol. Chem.*, 270: 29256-29264.

- Knegtel, R.M.A.; Wind, R.D.; Rozeboom, H.J.; Kalk, K.H.; Buitelaar, R.M.; Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B.W. (1996). Crystal structure at 2.3 Å resolution and revised nucleotide sequence of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. *J. Mol. Biol.*, 256: 611-622.
- Kobayashi, M. and Matsuda, K. (1980). Characterization of the multiple forms and main component of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biochim. et Biophys. Acta*, 614:46-62.
- Kobayashi, M. and Matsuda, K. (1986). Electrophoretic analysis of the multiple forms of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Biochem.*, 100: 615-621.
- Kobayashi, S. (1996). Cyclodextrin producing enzyme (CGTase). In: "Enzymes for Carbohydrate Engineering", 23-41. Eds.: Park, K. H.; Robyt, J. F. and Choi, D. Elsevier Science B. V., Amsterdam.
- Kobs, S.F. (1991). Acceptor activity of affinity-immobilized dextranucrase from *Streptococcus sanguis* ATCC 10558. *Carbohydr. Res.*, 211: 337-342
- Koch, R. (1981). Verschiedene Gährungen. Hahresber. *Gährungsorganismen*, 2: 242-245.
- Kohlrausch, U.; Cully, J. and Vollbrecht, H.R. (1994). β-Cyclodextrins removal from low-cholesterol egg yolk. *Trends in Food & Technology*, 5: 333.
- Korpela, T.; Mattsson, P.; Hellman, J.; Paavilainen, S. and Makela, M. (1988). Cyclodextrins: production, properties and applications in food chemistry. In: "Symposium on food and feed", Espoo, Finland.
- Kubota, M.; Matsuura, Y.; Sakai, S. and Katsube, Y. (1991). Molecular structure of *B. stearothersophilus* cyclodextrin glucanotransferase and analysis of substrate binding site. *Denpun Kagaku*, 38: 141-146.
- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K. and Veeger, C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, 30: 81-87.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lamothe, J.P.; Marchenay, Y.; Monsan, P.; Paul, F. and Pelenc, V. (1991). Compositions cosmétiques contenant des glucooligosaccharides. Patent FR 2678166.
- Lawson, L.; Bergsma, J.; Bruinenberg, P.M.; de Vries, G.; Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B.W. (1990). Maltodextrin-dependent crystallization of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*. *J. Mol. Biol.*, 214: 807-809.



Lawson C.L.; van Montfort, R.; Strokopytov, B.; Rozeboom, H.H.; Kalk, K.H.; Penninga, D.; de Vries, G.; Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B.W. (1992). Protein Engineering of cyclodextrin glycosyl transferase (CGTase) from *Bacillus circulans* strain 251. In: "6<sup>th</sup> International cyclodextrins symposium". Chicago.

Lawson, C.L.; van Montfort, R.; Strokopytov, B.; Rozeboom, H.J.; Kalk, K.H.; de Vries, G.E.; Penninga, D.; Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B.W. (1994). Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *J. Mol. Biol.*, 236: 590-600.

Lazic, M.L.; Veljkovic, V.B.; Savic, D.S.; Rutic, D.J.; Vucetic, J.I. and Vrvic, M.M. (1991). pH control and the production of extracellular dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. *World J. Microb. Biot.*, 7: 25-28.

Lee, B. and Richards F.M. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.*, 55: 379-400.

López, A. and Monsan, P. (1980) Dextran synthesis by immobilized dextransucrase. 1980. *Biochimie.*, 62: 323-329.

Lundblad, R. L. (1991). Chemical reagents for protein modification. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Martin, C. and Smith, A. M. (1995). Starch biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 971-985.

Mattson, P.; Pohjalainen; T. and Korpela, T. (1992). Chemical modification of cyclomalto-dextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* var. *alkalophilus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1122: 33-40.

Means, G.E. and Feeney, R.E. (1971). Chemical modification of proteins. Holden-Day Inc., San Francisco.

Miller, A.W. and Robyt, J.F. (1984) Stabilization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F by nonionic detergents, poly(ethylene glycol) and high-molecular-weight dextran. *Biochim. Biophys. Acta.*, 785: 89-96.

Miller, A.W.; Eklund, S.N. and Robyt, J.F. (1986). Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr. Res.*, 147: 119-133.

Mizutani, N.; Yamada, M.; Takayama, K. and Shoda, M. (1994). Constitutive mutants for dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *J. Ferment. Bioeng.*, 77: 248-251.

- Monchois, V.; Remaud-Simeon, M.; Russell, R.R.B.; Monsan, P. and Willemot, R.M. (1997). Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase (DSR-S) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 465-472.
- Monchois, V.; Reverte, A.; Remaud-Simeon, M.; Monsan, P. and Willemot, R.M. (1998). Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F Dextransucrase carboxyl-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. *Appl. Environ. Microb.* 64, 5: 1644-1649.
- Monsan, P. and López, A. (1981a). Dextran production by free and immobilized dextransucrase. *Adv. Biotechnol.* 1: 679-684.
- Monsan, P. and López, A. (1981b) On the production of dextran by free and immobilized dextransucrase. *Biotechnol. Bioeng.*, 23: 2027-2037.
- Monsan, P.; Paul, F.; Auriol, D. and López, A. (1987). Dextran Synthesis Using Immobilized *Leuconostoc mesenteroides* Dextransucrase. *Method Enzymol.*, 136: 239-254.
- Monsan, P. (1990). Microbial reactions with and derivatives of carbohydrates. In: "Proceedings of a Symposium: Towards a carbohydrate-based chemistry", 121-140. Eds.: Ellwood, D.C.; Sargeant, K.; Sergheraert, G.; Van Bekkum, H. and Woelk, H.U. Commission of the European Communities, Luxembourg.
- Monsan, P. and Paul, F. (1990). New Developments in the application of enzyme catalyst to synthesis reactions. In: "Proceedings of 5<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology", 233-238. Eds.: Christiansen, C.; Munck, L. and Villadsen, J. Munksgaard International Publisher, Copenhagen.
- Monsan, P.; Paul, F. and Auriol, D. (1995). New developments in the application of enzymes to synthesis reactions peptides and oligosaccharides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 750: 357-363.
- Monsan, P. and Paul, F. (1995). Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiol. Rev.*, 16: 187-192.
- Moresoli, C.; Zaza, P.; Flaschel, E. and Renken, A. (1992). Transesterification of phenylalanine by means of chymotrypsin in the presence of dimethylsulfoxide. *Biocatalysis*, 5: 203-211.
- Nakamura, A.; Haga, K. and Yamanè, K. (1993). Three histidine residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus sp.* 1011. Effects of the replacement on pH dependence and transition-state stabilization. *Biochemistry*, 32: 6624-6631
- Nakamura, A.; Haga, K. and Yamane, K. (1994a). The transglycosylation reaction of cyclodextrin glucanotransferase is operated by a ping-pong mechanism. *Febs Lett.*, 337: 66-70.

- Nakamura, A.; Haga, K. and Yamane, K. (1994b). Four aromatic residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic sp. 1011: effects of replacement on substrate binding and cyclization characteristics. *Biochemistry*, 33: 9929-9936.
- Newsome, R. (1993). Sugar substitutes. In: "Low-calorie foods handbook", 139-170. Ed.: Altschul, A. M. Marcel Dekker Inc., New York.
- Nielsen, H. K. (1991). Novel Bacteriolytic enzymes and cyclodextrin glycosyltransferase for the food industry. *Food Technol.*, 45: 102-104.
- Nilsson, K.G.I. (1991). Enzymatic synthesis of complex carbohydrates and their glycosides. *Applied Biocatalysis*, 1: 117-177.
- Norman, B. E. and Jorgensen, S. T. (1992). *Thermoanaerobacter* sp. CGTase: its properties and application. *Denpun Kagaku* 39: 101-108.
- Oakes, J.V.; Shewmaker, C.K. and Stalker, D.M. (1991). Production of cyclodextrins, a novel carbohydrate, in tubers of transgenic potato plants. *Biotechnology*, 9: 982-986.
- Ohnishi, M.; Abe, M.; Azuma, T.; Kubota, M. and Rokushika, S. (1994a). Tryptophan residues of Bacillus cycloamylose glucanotransferase: effect of modification with N-bromosuccinimide on the enzyme-catalyzed synthesis of cyclomaltoheptaose from maltotriose. *Starch* 46: 272-275.
- Ohnishi, M.; Azuma, T. and Kubota, M. (1994b). Cycloamylose glucanotransferase-catalyzed cyclization for a substrate maltose. Modification with N-bromosuccinimide on the tryptophan residues. *Starch* 46, 7: 276-279.
- Otero, C.; Cruzado, C. and Ballesteros, A. (1991). Use of cyclodextrins in enzymology to enhance the solubility of hydrophobic compounds in water. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27: 185-194.
- Parnaik, V.K.; Luzio, G.A.; Grahame, D.A.; Ditson, S.L. and Mayer, R.M.A. (1983). D-glucosylated form of dextranucrase: preparation and characteristics. *Carbohydr. Res.*, 121: 257-268.
- Paul, F.; Oriol, E.; Auriol, D and Monsan, P. (1986). Acceptor reaction of a highly purified dextranucrase with maltose and oligosaccharides. Application to the synthesis of controlled-molecular-weight dextrans. *Carbohydr. Res.*, 149: 433-441
- Paul, F.; Orens, S.; López, A.; Remaud, M.; Pelenc, V. and Monsan, P. (1992) Method for the production of  $\alpha(1\rightarrow2)$  oligodextrans using *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. U.S. Patent. 5.141.858.
- Pedersen, S.; Dijkhuizen, L.; Dijkstra, B.W.; Jensen, B.F. and Jørgensen, S.T. (1995). A better enzyme for cyclodextrins. *Chemtech*, December, 1995. 19-25.

Pennell, R.D. and Barker, P.E. (1992). The production of the enzyme dextranucrase using unaerated continuous fermentations. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 53: 21-27.

Penninga, D.; Strokopytov, B.; Rozeboom, H.H.; Lawson, C.L.; Dijkstra, B.W.; Bergsma, J. and Dijkhuizen, L. (1995). Site-directed mutations in Tyrosine 195 of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 affect activity and product specificity. *Biochemistry*, 34: 3368-3376.

Pitha, J. (1988). Biomedical uses of amorphous water soluble derivatives of cyclodextrins. In: "Proceedings of the 4<sup>th</sup> Int. Symp. on cyclodextrins", 381-391. Eds.: Huber, O. and Szejtli, J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Porath, J. and Belew, M. (1987). Thiophilic interaction and the selective adsorption of proteins. *Trends Biotechnol.*, 5: 225-229.

Pulley, O. and French, D. (1961). Studies of the schardinger dextrans XI. The isolation of new schardinger dextrans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 5: 11-15.

Quirasco, M.; López, A.; Pelenc, V.; Remaud, M.; Paul, F. and Monsan, P. (1995). Enzymatic production of glucooligosaccharides containing  $\alpha(1\rightarrow2)$  osidic bonds. *Ann.N.Y. Acad. Sci.*, 750: 317-320.

Reh, K.D.; Noll-Borchers, M. and Buchholz, K. (1996). Productivity of immobilized dextranucrase for leucrose formation. *Enzyme Microb. Tech.*, 19: 518-524.

Reischwitz, A.; Dieter, K. and Buchholz, K. (1995). Unconventional immobilization of dextranucrase with alginate. *Enzyme Microb. Tech.*, 17: 457-461

Remaud, M.; Paul, F. and Monsan, P. (1991) Molecular weight characterization and structural properties of controlled molecular weight dextrans synthesized by acceptor reaction using highly purified dextranucrase. *J. Carbohyd Chem.* 10: 861-876.

Remaud, M.; Paul, F. and Monsan, P. (1992). Characterization of  $\alpha(1\rightarrow3)$  branched oligosaccharides synthesized by acceptor reaction with the extracellular glucosyltransferases from *L. mesenteroides* NRRL B-742. *J. Carbohyd Chem.*, 11: 359-378.

Remaud, M.; López, A.; Pelenc, V.; Paul, F. and Monsan, P. (1994). Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing  $\alpha(1\rightarrow2)$  linkages. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 44: 101-117.

Riguetti, P. G. (1983). Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

- Riordan, J.F. and Vallee, B.L. (1967a). Acetylation. *Method Enzymol.*, 11: 565-570.
- Riordan, J.F. and Vallee, B.L. (1967b). O-acetyltyrosine. *Method Enzymol.*, 11: 570-576.
- Roby, J.F.; Kimble, B.K. and Walseth, T.F. (1974). The mechanism of dextransucrase action. Direction of dextran biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 165: 634-640.
- Roby, J.F. and Taniguchi, H. (1976). The mechanism of dextransucrase action. Biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextrans. *Biochem. Biophys.*, 174: 129-135.
- Roby, J.F. and Walseth, T.F. (1978). The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. *Carbohydr. Res.*, 61: 433-445.
- Roby, J.F. and Walseth, T.F. (1979). Production, purification and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr. Res.*, 68: 95-111.
- Roby, J.F. (1995) Mechanism and action of glucansucrases. In: "Carbohydrate Bioengineering", 295-312. Eds.: Petersen, S. B.; Svensson, B. and Pedersen, S. Elsevier, Amsterdam.
- Roby, J.F. (1996). Mechanism and action of glucansucrases. In: "Carbohydrate Bioengineering", 1-22. Eds.: Park, K.H.; Roby, J.F. and Choi, Y.D. Elsevier, Amsterdam.
- Roca, E.; Meinander, N.; Nuñez, M.J.; Hahn-Hägerdal, B. and Lema, J.M. (1996). Continuous fermentation by conventional and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in Ca-alginate beads hardened with trivalent ion. In: "Immobilized Cells: Basics and Applications", 173-180. Eds.: Wijffels, R.H.; Buitelaar, R.M.; Bucke, C. and Tramper, J. Elsevier, Amsterdam.
- Romberger, M. L. (1997). Cyclodextrins. *Agro-Food-Industry Hi-Tech.*, 8 : 2-5.
- Saenger, W. (1980). Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angew. Chem.*, 19: 344-362.
- Saenger, W. (1984). Structural aspects of cyclodextrins and their inclusion complexes. In: "Inclusion compounds", 231-259. Eds.: Atwood, J.L.; Davids, J.E. D. and MacNicol, D.D. Academic Press, London.
- Saha, B. and Zeikus, J. (1990). Characterization of thermostable cyclodextrinase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2941-2943.
- Sato, M.; Yagi, Y. and Ishikura, T. (1986).  $\alpha$ -linolanic acid containing fat and oil composition as health food. JP Patent nº 61233625.

Schardinger, F. (1903). *Bacillus macerans*, ein aceton bildender rottebacillus. *Zbl Bakter Parasitenkunde* 2: 772-1904.

Schardinger, F. (1911). Bildung kristallisierter polysaccharide (dextrine) aus stärkekleister durch mikroben. *Zentr. Bacteriol. Parasitenk. Abt. 2*: 188-197.

Schmid, G. (1989). Cyclodextrins glycosyltransferase production: Yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Tibtech* 7, 244-248.

Shaw, P.E.; Tatum, J.H. and Wilson, C.W. (1984). Improved flavor of novel orange and grapefruit juices by removal of bitter components with  $\beta$ -cyclodextrin polymer. *Agric. Biol. Chem.*, 32: 832-836.

Sidebotham, R. L. (1974). Dextrans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 30: 371-444.

Sin, K. A.; Nakamura, A.; Maski, H. and Uozumi, T. (1993). Extracellular production of *Bacillus ohbensis* cyclodextrin glucanotransferase by *B. subtilis*. *Biosci. Biotech. Biochem* 57: 346-347.

Sin, K. A.; Nakamura, A.; Masaki, H.; Matsuura, Y. and Uozumi, T. (1994). Replacement of an amino acid residue of cyclodextrin glucanotransferase of *Bacillus ohbensis* doubles the production of gamma-cyclodextrin. *J. Biotechnol.*, 32: 283-288.

Soetaert, W.; Schwengers, D.; Buchholz, K. and Vandamme E.J. (1995). A wide range of carbohydrate modifications by a single microorganism: *Leuconostoc mesenteroides*. In: "Carbohydrate Bioengineering", 351-358. Eds.: Petersen, S.B.; Svensson, B. and Pedersen, S. Elsevier, Amsterdam.

Starnes, R.L.; Flint, V.M. and Katkocin, D.M. (1990a). Cyclodextrin production with a highly thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. In: "5<sup>th</sup> Int. Symp. On Cyclodextrins", 55-61. Paris.

Starnes, R. L. (1990b). Industrial potential of cyclodextrins glycosyl transferases. *Cereal Food World*, 35: 1094-1099.

Starnes, R.L.; Hoffman, C.L.; Flint, V.M.; Trackman, P.C.; Duhart, D.J. and Katkocin, D.M. (1991). Starch liquefaction with a highly thermostable cyclodextrin glycosyl transferase from *Thermoanaerobacter* species. In: "Enzymes in Biomass Conversion", 384-393. Eds.: Leathman, G.F. and Himmel, M.E. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington.

Stocks, S.J., Jones, A.J.M., Ramey, CH.W. and Brooks, D.E. 1986. A fluorimetric assay of the degree of modification of protein primary amines with polyethylene glycol. *Anal. Biochem.*, 154: 232-234.

Strokopytov, B.; Penninga, D.; Rozeboom, H.H.; Kalk, K.H.; Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B.W. (1995). X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases. *Biochemistry*, 34: 2234-2240.

Strokopytov, B.; Knegt, R.M.A.; Penninga, D.; Rozeboom, H.J.; Kalk, K.H.; Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B.W. (1996). Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a maltonaose inhibitor at 2.6 Å resolution. Implications for product specificity. *Biochemistry*, 35: 4241-4249.

Stuchbury, T.; Shipton, M.; Morris, R.; Malthouse, J.P.G.; Brocklehurst, K.; Herbert, J.A.L. and Suschitzky, H. (1975). Reporter group delivery system with both absolute and selective specificity for thiol groups and an improved fluorescent probe containing the 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole moiety. *Biochem. J.*, 151: 417-432.

Su, C.S. and Yang, C.P. (1990). A novel method for continuous production of cyclodextrins using an immobilized enzyme system. *J. Chem. Biotechnol.*, 48: 313-323.

Su, D. and Robyt, J.F. (1993). Control of the synthesis of dextran and acceptor-products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextranase. *Carbohydr. Res.*, 248: 339-348.

Summer, J. B. and Howell, S. F. (1935). *J. Biol.Chem.* 108: 51-54.

Sundberg, L. and Porath, J. (1974). Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. *J. Chromatogr.*, 90: 87-98.

Svensson, B.; Jespersen, H.M.; Sierks, M.R. and MacGregor, E.A. (1989). Sequence homology between putative raw-starch binding domains from different starch-degrading enzymes. *Biochem. J.*, 264: 309-311.

Svensson, B. (1994). Protein engineering in the  $\alpha$ -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity and stability. *Plant Mol. Biol.*, 25: 141-157.

Szejtli, J.(1982a). Cyclodextrins in foods, cosmetics and toiletries. *Starch/Stärke.*, 34: 379-385.

Szejtli, J. (1982b). Cyclodextrins and their inclusion complexes. Akadémiai kiadó, Budapest, Hungary.

Szejtli, J. (1988). Cyclodextrins in diagnostics. *Kontakte (Darmstadt)*, 1: 31-36.

Szejtli, J. (1990). The cyclodextrins and their applications in biotechnology. *Carbohydrate Polymers*, 12: 375-392.

Szente, L.; Harangi, J.; and Szejtli, J. (1988). Long term storage stability studies on flavour  $\beta$ -cyclodextrin complexes. In: "Proceedings of the 4<sup>th</sup> Int. Symp. on cyclodextrins", 545-550. Eds.: Huber, O. and Szejtli, J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Tanriseven, A. and Robyt, J. F. (1993) Interpretation of dextransucrase inhibition at high sucrose concentration. *Carbohydr. Res.*, 245: 97-104.

Thu, B.; Smidsrod, O. and Skjak-Braek, G. (1996). Alginate gels- Some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. In: "Immobilized Cells: Basics and Applications", 19-30. Eds.: Wijffels, R.H.; Buitelaar, R.M.; Bucke, C. and Tramper, J. Elsevier, Amsterdam.

Tilden, E. B. and Hudson, C. S. (1942). Preparation and properties of the amylases produced by *B. macerans* and *B. polymyxa*. *J. Bacteriol.*, 43: 527.

Uekama, K. and Irie, T. (1987). Pharmaceutical applications of methylated cyclodextrin derivatives. In: "Cyclodextrins and their industrial uses", 393-439. Ed. Duchene, D. Editions de Sante, Paris.

Valette, P.; Pelenc, V.; Djouzi, Z.; Andrieux, C; Paul, F.; Monsan, P. and Szytli, O. (1993) Bioavailability of new synthesised glucooligosacchrides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *J. Sci. Food. Agric.*, 62: 121-127.

Villete, J.R., Sicard, P.J. and Bouquelet, S.J.L. (1992). Cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E192: III. Chemical modification by diethylpyrocarbonate: evidence for an induced fit at the active site resulting from the binding of an acceptor. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15: 69-79.

Villete, J.R.; Helbecque, N.; Albani, J.R., Sicard, P.J. and Bouquelet, J.L. (1993). Cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans* E 192: nitration with tetranitromethane. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 17: 205-216.

Villiers, M.A. (1981). Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Comptes Rendus Acad. Sci.*, 112: 536-538.

Vogelsang, R. and Ostgaard, K. Stability of alginate gels applied for cell entrapment in open systems. In: "Immobilized Cells: Basics and Applications", 213-220. Eds.: Wijffels, R.H.; Buitelaar, R.M.; Bucke, C. and Tramper, J. Elsevier, Amsterdam.

Vokk, R.; Menert, A. and Saar, E.K. Biotechnology of  $\beta$ -cyclodextrin. Inclusion complexes with essential oils and spices. *BFE* 8: 509-516

Weiszfeiler, V. and Szejtli, J. (1988). Bitterness reduction with  $\beta$ -cyclodextrin. In: "Proceedings of the 4<sup>th</sup> Int. Symp. on cyclodextrins", 359-366. Eds.: Huber, O. and Szejtli, J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.



Wenz, G. (1994). Cyclodextrins as building blocks for supramolecular structures and functional units. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 33: 803-822.

Wilke-Douglas, M; Perchorowicz, J.T.; Houck, C.M. and Thomas, B.R. (1989). Method and compositions for altering physical characteristics of fruit and fruit products. WO Patent 89/12386.

Willemot, R. M. (1993). Etude de la dextrane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Tesis doctoral. INSA. Toulouse.

Wind, R. D.; Liebl, W.; Buitelaar, R. M.; Penninga, D.; Spreinat, A.; Dijkhuizen, L. and Bahl, H. (1995). Cyclodextrin formation by the thermostable  $\alpha$ -amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. *Appl. Environ. Microb.* 61: 1257-1265.

Wind, R.D.; Uitdehaag, J.C.M.; Buitelaar, R.M.; Dijkstra, B.W. and Dijkhuizen, L. (1998a). Engineering of cyclodextrin product specificity and pH optima of the thermostable cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. *J. Biol. Chem.* 273: 5771-5779.

Wind, R. D.; Buitelaar, R. M. and Dijkhuizen, L. (1998b). Engineering of factors determining  $\alpha$ -amylase and cyclodextrin glycosyltransferase specificity in the cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. *Eur. J. Biochem.*, 253: 598-605.

Yamada, H.; Imoto, T.; Fujita, K.; Okazaki, K. and Motomura, M. (1981). Selective modification of aspartic acid-101 in Lysozime by carbodiimide reaction. *Biochemistry*, 20: 4836-4842

Zamost, B.L.; Nielsen, H.K. and Starnes, R.L. (1991). Thermostable enzymes for industrial applications. *J. Ind. Microbiol.*, 8: 71-82.

Zeffren, E. and Hall, P.L. (1973). "The study of enzyme mechanism". John Wiley & Sons, New York.

## **VIII ANEXOS**

I. PROGRAMAS EMPLEADOS EN LA PURIFICACION DE LA CGTasa

II. CALCULOS DE ACCESIBILIDADES ABSOLUTAS Y RELATIVAS DE LA CGTasa

III. SECUENCIAS DE AMINOACIDOS DE LAS CGTasas DE *Thermoanaerobacter* sp. 501 y *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*.

IV. PUBLICACIONES Y CONGRESOS A LOS QUE HA DADO LUGAR LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

## ANEXO I

Programa de trabajo FPLC desarrollado para la purificación de la CGTasa en la matriz AFFI-T.

Tiempo (min)	Instrucción		Comentario
0.00	VALVE.POS	1.2	El tampón sulfato amónico entra en la columna.
0.00	CONC%B	0	Bomba A: 1.5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH 7.0.
0.00	ML/MIN	0	Cargado de la muestra con la bomba peristáltica auxiliar.
0.00	PORT.SET	6.1	Puesta en marcha del colector (parte no retenida)
50.00	ML/MIN	0	Finalizado el cargado de la preparación enzimática.
50.00	ML/MIN	1	Flujo de trabajo.
75.00	PORT.SET	6.0	Parada del colector.
120.0	CONC%B	0	Parada de la bomba A.
120.0	CONC%B	100	Bomba B: tampón borato 10 mM pH 7.0.
120.0	PORT.SET	6.1	Puesta en marcha del colector (residuo)
170.0	CONC%B	100	Parada de la bomba B.
170.0	PORT.SET	6.0	Parada del colector.
170.0	VALVE.POS	1.3	Cambiar tampón de bomba A por borato:isopropanol 1:1
170.0	WASH A.B	1.0	Lavar bomba A con nuevo tampón borato:isopropanol 1:1
170.0	VALVE.POS	1.2	El tampón entra en la columna.
170.0	CONC%B	0	Bomba A: tampón borato: isopropanol 1:1
170.0	ML/MIN	1	Flujo de trabajo.
170.0	PORT.SET	6.1	Puesta en marcha del colector ( <b>CGTasa purificada</b> )
230.0	PORT.SET	6.0	Parada del colector.
230.0	CONC%B	0	Parada de la bomba A.
	END		

Programa de trabajo FPLC desarrollado para la purificación de la CGTasa en la matriz de Sepharosa activada con  $\alpha$ -ciclodextrina.

Tiempo (min)	Instucción		Comentario
0.00	VALVE. POS	1.2	El tampón entra en la columna.
0.00	CONC%B	0	Bomba A: tampón acetato 10 mM pH 5.5
0.00	ML/MIN	0	Cargado de la muestra con bomba peristáltica.
0.00	PORT.SET	6.1	Puesta en marcha del colector (parte no retenida).
10.00	ML/MIN	2.5	Flujo de trabajo.
20.00	PORT.SET	6.0	Parada del colector.
140.0	CONC%B	0	Parada de la bomba A.
140.0	CONC%B	100	Bomba B: tampón acetato 10 mM pH 5.5 con 1% de $\alpha$ -CD
140.0	PORT.SET	6.1	Puesta en marcha del colector ( <b>CGTasa purificada</b> ).
180.0	PORT.SET	6.0	Parada del colector.
240.0	CONC%B	100	Parada de la bomba B.
	END		

## ANEXO II

Accesibilidades de los residuos de la CGTasa de *Thermotoga* sp. 501. calculadas empleando el programa NACCESS

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)
ALA	1	78.52	72.8	49.61	71.7	0	0	49.61	71.7	28.91	74.8
PRO	2	59.78	44	59.78	50	0	0	59.78	50	0	0
ASP	3	2.36	1.7	0	0	1.32	2.4	1.32	1.3	1.05	2.8
THR	4	34.77	25	8.12	10.9	18.85	69.6	26.97	26.5	7.8	20.7
SER	5	22.94	19.7	21.05	45	1.89	6	22.94	29.3	0	0
VAL	6	33.96	22.4	28.62	25.1	0	0	28.62	25.1	5.34	14.3
SER	7	84.8	72.8	50.12	107	16.15	51.5	66.27	84.8	18.53	48.3
ASN	8	10.14	7	6.41	14.3	3.73	6.1	10.14	9.5	0	0
VAL	9	18.27	12.1	15.2	13.3	0	0	15.2	13.3	3.06	8.2
VAL	10	17.57	11.6	12.45	10.9	0	0	12.45	10.9	5.12	13.7
ASN	11	1.19	0.8	0.26	0.6	0	0	0.26	0.2	0.93	2.4
TYR	12	0.35	0.2	0	0	0	0	0	0	0.35	1
SER	13	0.08	0.1	0	0	0.08	0.3	0.08	0.1	0	0
THR	14	3.24	2.3	0.73	1	1.55	5.7	2.28	2.2	0.96	2.6
ASP	15	1.11	0.8	0.27	0.6	0.83	1.5	1.11	1.1	0.01	0
VAL	16	1.29	0.9	1.17	1	0	0	1.17	1	0.12	0.3
ILE	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TYR	18	0.04	0	0.04	0	0	0	0.04	0	0	0
GLN	19	8.36	4.7	1.38	2.7	6.98	7.8	8.36	5.9	0	0
ILE	20	2.17	1.2	0	0	0	0	0	0	2.17	5.8
VAL	21	9.61	6.3	9.61	8.4	0	0	9.61	8.4	0	0
THR	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASP	23	0.97	0.7	0	0	0.96	1.8	0.96	0.9	0.01	0
ARG	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PHE	25	3.57	1.8	0.27	0.2	0	0	0.27	0.2	3.29	9.3
LEU	26	29.19	16.4	29.13	20.7	0	0	29.13	20.7	0.06	0.2
ASP	27	45.51	32.4	12.43	25.9	11.56	21.2	23.99	23.4	21.52	56.9
GLY	28	22.91	28.5	2.48	7.7	0	0	2.48	7.7	20.43	42.5
ASN	29	40.3	28	14.42	32.1	25.88	42.2	40.3	37.9	0	0
PRO	30	104.99	77.3	92.83	77.6	0	0	92.83	77.6	12.16	75.2

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)
SER	31	100.08	85.9	52.19	111.5	18.69	59.7	70.88	90.7	29.2	76.1
ASN	32	27.7	19.2	20.41	45.4	3.62	5.9	24.04	22.6	3.67	9.7
ASN	33	26.39	18.3	5.73	12.8	3.64	5.9	9.37	8.8	17.02	45
PRO	34	6.49	4.8	1.48	1.2	0	0	1.48	1.2	5.01	31
THR	35	121.37	87.2	69.22	92.8	35.38	130.6	104.6	102.9	16.77	44.6
GLY	36	52.79	65.7	33.01	102.2	0	0	33.01	102.2	19.79	41.2
ASP	37	97.96	69.8	24.93	51.9	68.64	125.8	93.57	91.2	4.39	11.6
LEU	38	15.7	8.8	14.75	10.5	0	0	14.75	10.5	0.95	2.5
TYR	39	48.8	23	27.35	20.3	13.89	33.1	41.24	23.4	7.56	21.3
ASP	40	12.54	8.9	2.2	4.6	10.34	19	12.54	12.2	0	0
PRO	41	91.61	67.4	69.59	58.2	0	0	69.59	58.2	22.02	136.1
THR	42	84.81	60.9	68.38	91.7	0.55	2	68.94	67.8	15.87	42.2
HIS	43	66.61	36.4	32.77	34.1	18.5	36.4	51.27	34.9	15.34	42.8
THR	44	103.39	74.2	66.75	89.5	18.03	66.6	84.78	83.4	18.61	49.5
SER	45	24	20.6	17.05	36.4	6.96	22.2	24	30.7	0	0
LEU	46	26.18	14.7	26.18	18.6	0	0	26.18	18.6	0	0
LYS	47	40.61	20.3	8.53	7.4	32.07	67	40.61	25	0	0
LYS	48	27.75	13.9	16.51	14.4	11.23	23.5	27.75	17.1	0	0
TYR	49	2.4	1.1	0.65	0.5	1.75	4.2	2.4	1.4	0	0
PHE	50	0.58	0.3	0.58	0.4	0	0	0.58	0.4	0	0
GLY	51	3.23	4	2.85	8.8	0	0	2.85	8.8	0.39	0.8
GLY	52	0.98	1.2	0	0	0	0	0	0	0.98	2
ASP	53	0.46	0.3	0	0	0	0	0	0	0.46	1.2
TRP	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLN	55	58.2	32.7	18.71	36.9	38.78	43.1	57.48	40.9	0.72	1.9
GLY	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ILE	57	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0	0.1	0.1	0	0
ILE	58	12.54	7.2	12.54	9.1	0	0	12.54	9.1	0	0
ASN	59	56.22	39	16.08	35.8	38.51	62.8	54.59	51.4	1.63	4.3
LYS	60	20.04	10	9.19	8	10.84	22.6	20.04	12.3	0	0
ILE	61	1.55	0.9	0	0	0	0	0	0	1.55	4.2

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)
ASN	62	94.54	65.6	25.36	56.4	38.44	62.7	63.8	60	30.74	81.3
ASP	63	90.8	64.7	43.34	90.2	17.23	31.6	60.56	59	30.24	79.9
GLY	64	32.39	40.3	22.31	69.1	0	0	22.31	69.1	10.08	21
TYR	65	8.69	4.1	8.07	6	0	0	8.07	4.6	0.62	1.8
LEU	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
THR	67	46.41	33.3	31.4	42.1	1.85	6.8	33.25	32.7	13.16	35
GLY	68	33.14	41.2	27.75	86	0	0	27.75	86	5.38	11.2
MET	69	0.08	0	0.08	0.1	0	0	0.08	0.1	0	0
GLY	70	17.49	21.8	14.77	45.8	0	0	14.77	45.8	2.71	5.6
VAL	71	4.28	2.8	0	0	0	0	0	0	4.28	11.5
THR	72	24.67	17.7	24.58	33	0	0	24.58	24.2	0.09	0.2
ALA	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ILE	74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRP	75	7.44	3	5.43	2.9	1.99	8.4	7.43	3.5	0.01	0
ILE	76	0.31	0.2	0	0	0	0	0	0	0.31	0.8
SER	77	9.09	7.8	4.73	10.1	4.36	13.9	9.09	11.6	0	0
GLN	78	0.12	0.1	0	0	0.01	0	0.01	0	0.11	0.3
PRO	79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VAL	80	0.16	0.1	0	0	0	0	0	0	0.16	0.4
GLU	81	17.66	10.3	2.09	3.6	15.57	20.6	17.66	13.1	0	0
ASN	82	2.61	1.8	0.73	1.6	0	0	0.73	0.7	1.88	5
ILE	83	1.29	0.7	0.07	0.1	0	0	0.07	0.1	1.22	3.3
TYR	84	74	34.9	61.31	45.5	5.05	12	66.36	37.6	7.64	21.6
ALA	85	25.04	23.2	24.66	35.6	0	0	24.66	35.6	0.38	1
VAL	86	53.79	35.5	26.49	23.2	0	0	26.49	23.2	27.3	73.1
LEU	87	11.7	6.6	10.09	7.2	0	0	10.09	7.2	1.61	4.3
PRO	88	114.05	84	91.65	76.6	0	0	91.65	76.6	22.4	138.4
ASP	89	27.36	19.5	6.78	14.1	12.92	23.7	19.7	19.2	7.66	20.2
SER	90	123	105.5	58.89	125.8	30.63	97.8	89.52	114.5	33.48	87.3
THR	91	105.99	76.1	51.64	69.2	27.28	100.7	78.92	77.6	27.07	72
PHE	92	42	21.1	31.98	19.5	0	0	31.98	19.5	10.01	28.3
GLY	93	54.87	68.3	29.97	92.8	0	0	29.97	92.8	24.9	51.8

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)
GLY	94	3.76	4.7	3.47	10.7	0	0	3.47	10.7	0.29	0.6
SER	95	13.6	11.7	3.92	8.4	9.68	30.9	13.6	17.4	0	0
THR	96	1.39	1	0	0	0	0	0	0	1.39	3.7
SER	97	0.06	0.1	0	0	0	0	0	0	0.06	0.2
TYR	98	1.96	0.9	1.5	1.1	0.46	1.1	1.96	1.1	0	0
HIS	99	6.41	3.5	3.76	3.9	0.76	1.5	4.52	3.1	1.89	5.3
GLY	100	0.49	0.6	0.43	1.3	0	0	0.43	1.3	0.05	0.1
TYR	101	9.37	4.4	6.09	4.5	2.83	6.7	8.93	5.1	0.45	1.3
TRP	102	12.55	5	12.55	6.7	0	0	12.55	5.9	0	0
ALA	103	0.55	0.5	0.55	0.8	0	0	0.55	0.8	0	0
ARG	104	45.61	19.2	0.75	1	44.86	36	45.61	22.8	0	0
ASP	105	0.43	0.3	0.12	0.2	0.31	0.6	0.43	0.4	0	0
PHE	106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LYS	107	30.24	15.1	16.99	14.8	13.01	27.2	30	18.5	0.24	0.6
LYS	108	75.16	37.6	30.73	26.8	44.43	92.8	75.16	46.3	0	0
THR	109	17.62	12.7	0	0	10.76	39.7	10.76	10.6	6.86	18.3
ASN	110	1.41	1	0.61	1.4	0.8	1.3	1.41	1.3	0	0
PRO	111	60.31	44.4	51.99	43.5	0	0	51.99	43.5	8.32	51.4
PHE	112	27.12	13.6	26.05	15.9	0	0	26.05	15.9	1.07	3
PHE	113	1.34	0.7	0.25	0.2	0	0	0.25	0.2	1.08	3.1
GLY	114	3.9	4.9	2.03	6.3	0	0	2.03	6.3	1.87	3.9
SER	115	53.22	45.7	31.73	67.8	19.89	63.5	51.62	66	1.59	4.2
PHE	116	62.92	31.6	60.9	37.2	0	0	60.9	37.2	2.02	5.7
THR	117	79.18	56.9	53.24	71.4	25.17	93	78.41	77.1	0.76	2
ASP	118	39.37	28	5.25	10.9	34.12	62.5	39.37	38.4	0	0
PHE	119	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLN	120	90.39	50.7	23.11	45.6	64.84	72.1	87.95	62.6	2.44	6.5
ASN	121	73.9	51.3	14.3	31.8	59.02	96.3	73.33	69	0.58	1.5
LEU	122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ILE	123	9.69	5.5	9.69	7	0	0	9.69	7	0	0
ALA	124	64.17	59.5	58.41	84.4	0	0	58.41	84.4	5.76	14.9



Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)
THR	125	22.85	16.4	6.82	9.1	15.76	58.2	22.58	22.2	0.27	0.7
ALA	126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HIS	127	54.68	29.9	28.77	29.9	18.43	36.2	47.2	32.1	7.48	20.9
ALA	128	82.81	76.8	53.87	77.8	0	0	53.87	77.8	28.94	74.9
HIS	129	67.09	36.7	38.13	39.7	20.93	41.1	59.06	40.2	8.03	22.4
ASN	130	98.98	68.7	22.54	50.1	70.85	115.6	93.39	87.9	5.59	14.8
ILE	131	1.22	0.7	1.22	0.9	0	0	1.22	0.9	0	0
LYS	132	2.91	1.5	1.37	1.2	1.54	3.2	2.91	1.8	0	0
VAL	133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ILE	134	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ILE	135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASP	136	3.19	2.3	0	0	3.19	5.8	3.19	3.1	0	0
PHE	137	0.26	0.1	0.15	0.1	0	0	0.15	0.1	0.11	0.3
ALA	138	0.67	0.6	0.4	0.6	0	0	0.4	0.6	0.27	0.7
PRO	139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASN	140	1.6	1.1	0	0	1.46	2.4	1.46	1.4	0.14	0.4
HIS	141	0.5	0.3	0.39	0.4	0	0	0.39	0.3	0.11	0.3
THR	142	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SER	143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PRO	144	2.98	2.2	2.98	2.5	0	0	2.98	2.5	0	0
ALA	145	8.72	8.1	0.13	0.2	0	0	0.13	0.2	8.58	22.2
SER	146	34.63	29.7	20.62	44	14	44.7	34.63	44.3	0	0
GLU	147	76.97	44.7	27.41	46.6	37.96	50.1	65.38	48.6	11.59	30.8
THR	148	127.07	91.3	66.51	89.2	35.69	131.8	102.2	100.5	24.87	66.2
ASP	149	53.19	37.9	26.42	55	26.76	49.1	53.19	51.8	0	0
PRO	150	69.01	50.8	60.51	50.6	0	0	60.51	50.6	8.5	52.5
THR	151	112.69	80.9	60.69	81.4	36.49	134.8	97.19	95.6	15.5	41.2
TYR	152	65.22	30.8	48.28	35.9	16.93	40.3	65.21	36.9	0	0
ALA	153	20.82	19.3	1.95	2.8	0	0	1.95	2.8	18.87	48.8
GLU	154	18.9	11	9.57	16.2	9.34	12.3	18.9	14	0	0
ASN	155	7.86	5.5	0.38	0.8	7.48	12.2	7.86	7.4	0	0

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)
GLY	156	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARG	157	76.01	31.9	17.44	23	58.25	46.8	75.69	37.8	0.33	0.9
LEU	158	0.24	0.1	0.24	0.2	0	0	0.24	0.2	0	0
TYR	159	31.98	15.1	18.55	13.8	13.43	32	31.98	18.1	0	0
ASP	160	42.23	30.1	8.88	18.5	31.17	57.1	40.05	39	2.17	5.8
ASN	161	83.6	58	20.42	45.4	50.76	82.8	71.18	67	12.42	32.8
GLY	162	41.66	51.8	20.64	63.9	0	0	20.64	63.9	21.02	43.7
VAL	163	101.63	67.1	101.33	88.8	0	0	101.33	88.8	0.3	0.8
LEU	164	87.19	48.9	64.21	45.6	0	0	64.21	45.6	22.98	61.1
LEU	165	37.72	21.1	18.86	13.4	0	0	18.86	13.4	18.87	50.2
GLY	166	16.89	21	16.82	52.1	0	0	16.82	52.1	0.06	0.1
GLY	167	8.78	10.9	1	3.1	0	0	1	3.1	7.78	16.2
TYR	168	11.14	5.3	8.03	6	3.11	7.4	11.14	6.3	0	0
THR	169	38.87	27.9	30.35	40.7	0	0	30.35	29.9	8.53	22.7
ASN	170	25.52	18.2	4.29	8.9	2.2	4	6.49	6.3	19.04	50.3
ASP	171	125.02	86.8	32.14	71.5	74.89	122.2	107.02	100.7	18	47.6
THR	172	117.19	84.2	65.94	88.4	19.67	72.7	85.62	84.2	31.57	84
ASN	173	94.6	65.7	7.49	16.7	69.33	113.1	76.82	72.3	17.78	47
GLY	174	23.3	29	22.62	70.1	0	0	22.62	70.1	0.68	1.4
TYR	175	26.87	12.7	4.67	3.5	22.2	52.9	26.87	15.2	0	0
PHE	176	4.85	2.4	0.08	0	0	0	0.08	0	4.77	13.5
HIS	177	12.05	6.6	9.45	9.8	2.6	5.1	12.05	8.2	0	0
HIS	178	67.77	37.1	41.31	43	0.96	1.9	42.27	28.8	25.49	71
TYR	179	78.29	36.9	46.46	34.5	22.35	53.2	68.8	39	9.48	26.8
GLY	180	46.98	58.5	38.27	118.6	0	0	38.27	118.6	8.7	18.1
GLY	181	41.74	51.9	14.58	45.2	0	0	14.58	45.2	27.17	56.5
THR	182	15.36	11	0.4	0.5	0	0	0.4	0.4	14.95	39.8
ASN	183	106.27	73.8	41.74	92.8	46.52	75.9	88.26	83.1	18.01	47.6
PHE	184	71.39	35.8	48.42	29.5	0	0	48.42	29.5	22.97	64.9
SER	185	84.96	72.9	47	100.4	6.95	22.2	53.96	69	31.01	80.8
SER	186	43.93	37.7	35.01	74.8	0	0	35.01	44.8	8.92	23.2

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)
TYR	187	49.46	23.3	35.5	26.4	6.99	16.7	42.5	24.1	6.96	19.7
GLU	188	8.68	5	3.9	6.6	4.19	5.5	8.09	6	0.59	1.6
ASP	189	3.32	2.4	0.51	1.1	2.81	5.2	3.32	3.2	0	0
GLY	190	4.91	6.1	3.84	11.9	0	0	3.84	11.9	1.06	2.2
ILE	191	2.81	1.6	2.55	1.9	0	0	2.55	1.9	0.25	0.7
TYR	192	5.58	2.6	4.63	3.4	0.95	2.3	5.58	3.2	0	0
ARG	193	64.17	27	7.32	9.7	54.68	43.9	62.01	30.9	2.16	5.8
ASN	194	8.79	6.1	0.28	0.6	8.5	13.9	8.77	8.3	0.02	0.1
LEU	195	3.03	1.7	2.79	2	0	0	2.79	2	0.24	0.6
PHE	196	112.5	56.4	99.42	60.7	0	0	99.42	60.7	13.08	37
ASP	197	53.58	38.2	37.19	77.4	15.82	29	53.01	51.7	0.58	1.5
LEU	198	1.05	0.6	1.04	0.7	0	0	1.04	0.7	0.01	0
ALA	199	0.24	0.2	0.24	0.3	0	0	0.24	0.3	0	0
ASP	200	2.34	1.7	0.23	0.5	2.11	3.9	2.34	2.3	0	0
LEU	201	0.06	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0.1
ASP	202	24.34	17.3	3.79	7.9	20.55	37.7	24.34	23.7	0	0
GLN	203	11.4	6.4	3.68	7.2	7.15	8	10.82	7.7	0.57	1.5
GLN	204	23.38	13.1	13.2	26	1.61	1.8	14.8	10.5	8.57	22.8
ASN	205	28.72	19.9	12.35	27.5	16.31	26.6	28.66	27	0.06	0.1
SER	206	56.05	48.1	36.65	78.3	13.47	43	50.12	64.1	5.94	15.5
THR	207	60.72	43.6	25.13	33.7	33.49	123.7	58.63	57.7	2.09	5.6
ILE	208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASP	209	4.66	3.3	0.67	1.4	3.99	7.3	4.66	4.5	0	0
SER	210	61.46	52.7	36.57	78.1	22.69	72.4	59.26	75.8	2.21	5.7
TYR	211	7.77	3.7	7.11	5.3	0	0	7.11	4	0.66	1.9
LEU	212	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LYS	213	34.11	17	19.18	16.7	14.74	30.8	33.92	20.9	0.19	0.5
SER	214	49.08	42.1	39.51	84.4	2.74	8.8	42.25	54.1	6.82	17.8
ALA	215	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ILE	216	0.4	0.2	0.4	0.3	0	0	0.4	0.3	0	0
LYS	217	59.23	29.6	48.72	42.5	10.28	21.5	59	36.3	0.23	0.6

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)
LEU	218	32.17	18	30.13	21.4	0	0	30.13	21.4	2.04	5.4
TRP	219	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LEU	220	3.33	1.9	0.03	0	0	0	0.03	0	3.3	8.8
ASP	221	98.43	70.1	30.34	63.1	39.39	72.2	69.73	68	28.7	75.9
MET	222	29.54	15.3	20.18	12.9	0	0	20.18	12.9	9.36	24.9
GLY	223	21.65	26.9	20.24	62.7	0	0	20.24	62.7	1.41	2.9
ILE	224	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASP	225	4.35	3.1	0	0	4.35	8	4.35	4.2	0	0
GLY	226	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ILE	227	0.48	0.3	0.48	0.3	0	0	0.48	0.3	0	0
ARG	228	0.62	0.3	0	0	0.62	0.5	0.62	0.3	0	0
MET	229	0.07	0	0.07	0	0	0	0.07	0	0	0
ASP	230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALA	231	0.28	0.3	0.28	0.4	0	0	0.28	0.4	0	0
VAL	232	0.71	0.5	0	0	0	0	0	0	0.71	1.9
LYS	233	42.41	21.2	35.02	30.6	6.15	12.8	41.16	25.3	1.25	3.3
HIS	234	5.99	3.3	5.16	5.4	0.27	0.5	5.44	3.7	0.55	1.5
MET	235	0.5	0.3	0	0	0	0	0	0	0.5	1.3
ALA	236	8.51	7.9	8.32	12	0	0	8.32	12	0.19	0.5
PHE	237	26.07	13.1	21.83	13.3	0	0	21.83	13.3	4.24	12
GLY	238	1.96	2.4	1.53	4.7	0	0	1.53	4.7	0.43	0.9
TRP	239	2.56	1	2.56	1.4	0	0	2.56	1.2	0	0
GLN	240	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LYS	241	17.91	8.9	5.09	4.4	12.82	26.8	17.91	11	0	0
ASN	242	0.67	0.5	0.02	0	0.26	0.4	0.28	0.3	0.39	1
PHE	243	0.48	0.2	0.48	0.3	0	0	0.48	0.3	0	0
MET	244	0.86	0.4	0.86	0.6	0	0	0.86	0.6	0	0
ASP	245	6.85	4.9	0.04	0.1	6.74	12.4	6.79	6.6	0.06	0.2
SER	246	22.05	18.9	18.67	39.9	1.49	4.8	20.16	25.8	1.89	4.9
ILE	247	0.19	0.1	0.19	0.1	0	0	0.19	0.1	0	0
LEU	248	8.35	4.7	5.15	3.7	0	0	5.15	3.7	3.2	8.5

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)
SER	249	53.44	45.9	22.62	48.3	0.13	0.4	22.75	29.1	30.69	80
TYR	250	97.12	45.8	54.2	40.3	17.97	42.8	72.18	40.9	24.95	70.4
ARG	251	75.64	31.8	55.66	73.4	19.98	16.1	75.64	37.8	0	0
PRO	252	46.74	34.4	39.78	33.2	0	0	39.78	33.2	6.96	43
VAL	253	2.05	1.4	0	0	0	0	0	0	2.05	5.5
PHE	254	12.79	6.4	12.79	7.8	0	0	12.79	7.8	0	0
THR	255	6.73	4.8	0.7	0.9	0	0	0.7	0.7	6.03	16
PHE	256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLY	257	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLU	258	5.7	3.3	0.77	1.3	4.08	5.4	4.85	3.6	0.85	2.3
TRP	259	1.07	0.4	0.35	0.2	0.09	0.4	0.43	0.2	0.63	1.7
TYR	260	63.19	29.8	28.71	21.3	30.62	72.9	59.33	33.6	3.86	10.9
LEU	261	1.95	1.1	1.95	1.4	0	0	1.95	1.4	0	0
GLY	262	13.32	16.6	11.54	35.8	0	0	11.54	35.8	1.77	3.7
THR	263	78.63	56.5	30.81	41.3	26.15	96.6	56.96	56	21.67	57.7
ASN	264	119.27	82.8	34	75.6	57.21	93.4	91.2	85.8	28.07	74.2
GLU	265	72.35	42	39	66.2	30.75	40.6	69.75	51.8	2.6	6.9
VAL	266	92.01	60.7	67.39	59	0	0	67.39	59	24.62	66
ASP	267	23.41	16.7	9.88	20.6	12.44	22.8	22.31	21.7	1.09	2.9
PRO	268	108.8	80.1	103.44	86.5	0	0	103.44	86.5	5.36	33.1
ASN	269	52.23	36.3	2.08	4.6	49.04	80	51.12	48.1	1.11	2.9
ASN	270	4.95	3.4	0.24	0.5	4.71	7.7	4.95	4.7	0	0
THR	271	21.77	15.6	18.16	24.3	3.61	13.3	21.77	21.4	0	0
TYR	272	105.24	49.6	83.66	62.2	21.26	50.6	104.93	59.4	0.31	0.9
PHE	273	1.9	1	1.9	1.2	0	0	1.9	1.2	0	0
ALA	274	9.52	8.8	2.65	3.8	0	0	2.65	3.8	6.87	17.8
ASN	275	22.27	15.5	0.77	1.7	14.24	23.2	15.01	14.1	7.26	19.2
GLU	276	42.51	24.7	8.99	15.3	31.98	42.2	40.97	30.4	1.54	4.1
SER	277	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLY	278	15.13	18.8	2.88	8.9	0	0	2.88	8.9	12.25	25.5
MET	279	10.27	5.3	2.74	1.8	0	0	2.74	1.8	7.54	20

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)
SER	280	11.23	9.6	8.27	17.7	2.16	6.9	10.43	13.3	0.8	2.1
LEU	281	1.37	0.8	1.37	1	0	0	1.37	1	0	0
LEU	282	7.33	4.1	3.35	2.4	0	0	3.35	2.4	3.98	10.6
ASP	283	0.71	0.5	0.58	1.2	0.12	0.2	0.71	0.7	0	0
PHE	284	6.53	3.3	4.06	2.5	0	0	4.06	2.5	2.46	7
ARG	285	20.76	8.7	11.11	14.6	6.75	5.4	17.86	8.9	2.9	7.7
PHE	286	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALA	287	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLN	288	18.85	10.6	2.9	5.7	14.61	16.3	17.51	12.5	1.34	3.6
LYS	289	26.32	13.2	18.2	15.9	7.17	15	25.37	15.6	0.95	2.5
VAL	290	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARG	291	23.68	10	2.52	3.3	21.17	17	23.68	11.8	0	0
GLN	292	13.94	7.8	4.89	9.6	8.83	9.8	13.72	9.8	0.22	0.6
VAL	293	4.23	2.8	0	0	0	0	0	0	4.23	11.3
PHE	294	14.65	7.4	3.1	1.9	0	0	3.1	1.9	11.55	32.6
ARG	295	49.37	20.7	5.81	7.7	18.47	14.8	24.29	12.1	25.08	66.7
ASP	296	65.75	46.8	23	47.9	25.63	47	48.63	47.4	17.12	45.3
ASN	297	111.41	77.3	32.65	72.6	59.92	97.8	92.58	87.1	18.83	49.8
THR	298	87.39	62.8	60.41	81	2.29	8.5	62.7	61.7	24.68	65.7
ASP	299	35.73	25.4	11.18	23.3	23.4	42.9	34.58	33.7	1.16	3.1
THR	300	38.24	27.5	30.81	41.3	7.42	27.4	38.24	37.6	0	0
MET	301	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TYR	302	116.99	55.2	83.36	61.9	25.39	60.4	108.74	61.6	8.25	23.3
GLY	303	10.07	12.5	9.16	28.4	0	0	9.16	28.4	0.91	1.9
LEU	304	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASP	305	20.39	14.5	1.18	2.5	19.2	35.2	20.39	19.9	0	0
SER	306	60.04	51.5	50.34	107.5	7.53	24	57.87	74	2.18	5.7
MET	307	11.72	6	11.07	7.1	0	0	11.07	7.1	0.65	1.7
ILE	308	4.54	2.6	3.76	2.7	0	0	3.76	2.7	0.77	2.1
GLN	309	81.58	45.8	38.91	76.7	35.28	39.3	74.19	52.8	7.39	19.6
SER	310	48.47	41.6	41.69	89	6.04	19.3	47.73	61.1	0.74	1.9

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)
THR	311	0.28	0.2	0.28	0.4	0	0	0.28	0.3	0	0
ALA	312	56.6	52.5	35.81	51.7	0	0	35.81	51.7	20.79	53.8
ALA	313	85.45	79.2	56.42	81.5	0	0	56.42	81.5	29.03	75.1
ASP	314	49.85	35.5	9.89	20.6	36.99	67.8	46.89	45.7	2.97	7.8
TYR	315	8.94	4.2	1.17	0.9	2.56	6.1	3.72	2.1	5.22	14.7
ASN	316	56.99	39.6	7.95	17.7	28.12	45.9	36.07	33.9	20.93	55.3
PHE	317	17.67	8.9	15.72	9.6	0	0	15.72	9.6	1.94	5.5
ILE	318	44.65	25.5	44.65	32.4	0	0	44.65	32.4	0	0
ASN	319	8.59	6	0.64	1.4	7.86	12.8	8.5	8	0.09	0.2
ASP	320	11.41	8.1	5.94	12.4	5.47	10	11.41	11.1	0	0
MET	321	4.25	2.2	4.25	2.7	0	0	4.25	2.7	0	0
VAL	322	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
THR	323	0.31	0.2	0	0	0.3	1.1	0.31	0.3	0	0
PHE	324	5.06	2.5	5.06	3.1	0	0	5.06	3.1	0	0
ILE	325	7.66	4.4	6.55	4.7	0	0	6.55	4.7	1.11	3
ASP	326	4.23	3	0.04	0.1	2.48	4.6	2.53	2.5	1.71	4.5
ASN	327	9.05	6.3	2.12	4.7	6.74	11	8.86	8.3	0.18	0.5
HIS	328	6.57	3.6	6.57	6.8	0	0	6.57	4.5	0	0
ASP	329	46.3	33	16.73	34.8	6.61	12.1	23.35	22.8	22.95	60.7
MET	330	17.32	8.9	17.32	11.1	0	0	17.32	11.1	0	0
ASP	331	52.2	37.2	7.41	15.4	41.26	75.6	48.67	47.4	3.52	9.3
ARG	332	2.58	1.1	1.26	1.7	1.32	1.1	2.58	1.3	0	0
PHE	333	5.45	2.7	2.24	1.4	0	0	2.24	1.4	3.21	9.1
TYR	334	37.69	17.8	19.99	14.8	16.28	38.8	36.27	20.5	1.42	4
THR	335	86.74	62.3	48.88	65.5	11.18	41.3	60.06	59.1	26.68	71
GLY	336	36.88	45.9	21.41	66.3	0	0	21.41	66.3	15.47	32.2
GLY	337	65.63	81.7	40.13	124.3	0	0	40.13	124.3	25.49	53
SER	338	59.82	51.3	34.02	72.6	10.32	32.9	44.34	56.7	15.48	40.3
THR	339	39.08	28.1	17.85	23.9	17.91	66.1	35.75	35.2	3.33	8.9
ARG	340	46.16	19.4	11.85	15.6	32.89	26.4	44.74	22.3	1.42	3.8
PRO	341	32.69	24.1	32.69	27.3	0	0	32.69	27.3	0	0

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)
VAL	342	3.21	2.1	3.11	2.7	0	0	3.11	2.7	0.11	0.3
GLU	343	5.34	3.1	0.12	0.2	5.22	6.9	5.34	4	0	0
GLN	344	1.5	0.8	0	0	1.5	1.7	1.5	1.1	0	0
ALA	345	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LEU	346	2.65	1.5	2.65	1.9	0	0	2.65	1.9	0	0
ALA	347	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PHE	348	0.75	0.4	0.75	0.5	0	0	0.75	0.5	0	0
THR	349	2.98	2.1	2.77	3.7	0	0	2.77	2.7	0.2	0.5
LEU	350	0.53	0.3	0.31	0.2	0	0	0.31	0.2	0.22	0.6
THR	351	0.32	0.2	0.32	0.4	0	0	0.32	0.3	0	0
SER	352	0.23	0.2	0.04	0.1	0.04	0.1	0.08	0.1	0.16	0.4
ARG	353	7.28	3.1	5.98	7.9	0.73	0.6	6.71	3.3	0.58	1.5
GLY	354	0.05	0.1	0	0	0	0	0	0	0.05	0.1
VAL	355	0.16	0.1	0.16	0.1	0	0	0.16	0.1	0	0
PRO	356	0.5	0.4	0.5	0.4	0	0	0.5	0.4	0	0
ALA	357	5.05	4.7	2.04	3	0	0	2.04	3	3.01	7.8
ILE	358	4.47	2.6	4.47	3.2	0	0	4.47	3.2	0	0
TYR	359	2.82	1.3	0	0	0	0	0	0	2.82	8
TYR	360	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLY	361	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
THR	362	8.59	6.2	6.31	8.5	0.49	1.8	6.8	6.7	1.8	4.8
GLU	363	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLN	364	21.37	12	0.92	1.8	4.21	4.7	5.13	3.7	16.23	43.2
TYR	365	46.3	21.8	37.93	28.2	0.56	1.3	38.49	21.8	7.81	22.1
MET	366	10.96	5.7	8.64	5.5	0	0	8.64	5.5	2.32	6.2
THR	367	71.18	51.1	22.28	29.9	31.56	116.5	53.84	53	17.34	46.1
GLY	368	11.95	14.9	10.05	31.1	0	0	10.05	31.1	1.9	4
ASN	369	88.69	61.6	22.72	50.5	46.99	76.7	69.71	65.6	18.98	50.2
GLY	370	21.03	26.2	21.03	65.2	0	0	21.03	65.2	0	0
ASP	371	60.39	43	15.06	31.3	18.32	33.6	33.38	32.5	27.01	71.4
PRO	372	0.23	0.2	0.23	0.2	0	0	0.23	0.2	0	0



Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)
TYR	373	103.73	48.9	77.17	57.3	22.92	54.6	100.09	56.7	3.64	10.3
ASN	374	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0
ARG	375	1.94	0.8	0.89	1.2	1.05	0.8	1.94	1	0	0
ALA	376	30.12	27.9	29.99	43.3	0	0	29.99	43.3	0.13	0.3
MET	377	34.06	17.6	27.24	17.5	0	0	27.24	17.5	6.82	18.1
MET	378	11.49	5.9	0.04	0	0	0	0.04	0	11.45	30.4
THR	379	87.01	62.5	58.37	78.3	0.05	0.2	58.42	57.5	28.59	76.1
SER	380	48.23	41.4	41.65	88.9	6.58	21	48.23	61.7	0	0
PHE	381	64.95	32.6	41.99	25.6	0	0	41.99	25.6	22.96	64.9
ASP	382	61.76	44	31.49	65.5	30.02	55	61.51	60	0.25	0.7
THR	383	68.41	49.1	29.25	39.2	30.08	111.1	59.33	58.4	9.09	24.2
THR	384	113.24	81.3	77.39	103.7	20.53	75.8	97.92	96.3	15.32	40.8
THR	385	19.88	14.3	19.68	26.4	0	0	19.68	19.4	0.2	0.5
THR	386	42.59	30.6	11.77	15.8	28.84	106.5	40.6	39.9	1.99	5.3
ALA	387	0.28	0.3	0.28	0.4	0	0	0.28	0.4	0	0
TYR	388	4.63	2.2	2.17	1.6	2.46	5.8	4.63	2.6	0	0
ASN	389	35.55	24.7	9.38	20.9	26.17	42.7	35.55	33.5	0	0
VAL	390	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ILE	391	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LYS	392	96.62	48.3	43.4	37.9	49.31	103	92.72	57.1	3.9	10.4
LYS	393	83.78	41.9	53.6	46.8	23.83	49.8	77.43	47.6	6.35	16.9
LEU	394	0.28	0.2	0.04	0	0	0	0.04	0	0.24	0.6
ALA	395	3.97	3.7	0.09	0.1	0	0	0.09	0.1	3.88	10
PRO	396	62.26	45.8	60.25	50.4	0	0	60.25	50.4	2.01	12.4
LEU	397	12.55	7	12.55	8.9	0	0	12.55	8.9	0	0
ARG	398	1.15	0.5	0	0	0.05	0	0.05	0	1.1	2.9
LYS	399	58.79	29.4	42.91	37.4	3.33	7	46.24	28.5	12.55	33.4
SER	400	58.94	50.6	48.05	102.6	1.52	4.9	49.57	63.4	9.37	24.4
ASN	401	0.23	0.2	0	0	0	0	0	0	0.23	0.6
PRO	402	2.66	2	2.66	2.2	0	0	2.66	2.2	0	0
ALA	403	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)
ASN	435	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARG	436	36.87	15.5	12.2	16.1	12.96	10.4	25.16	12.6	11.7	31.1
ASN	437	37.29	25.9	7.08	15.8	30.21	49.3	37.29	35.1	0	0
LEU	438	80.1	44.9	54.26	38.5	0	0	54.26	38.5	25.84	68.7
SER	439	99.86	85.7	45.76	97.7	25.88	82.6	71.64	91.7	28.22	73.5
THR	440	55.04	39.5	31.36	42	23.68	87.5	55.04	54.1	0	0
SER	441	56	48.1	19.53	41.7	14.02	44.7	33.55	42.9	22.45	58.5
TYR	442	51.88	24.5	36.33	27	14.26	33.9	50.58	28.6	1.3	3.7
TYR	443	142.38	67.2	95.79	71.2	28.4	67.6	124.19	70.3	18.2	51.4
ILE	444	1.05	0.6	0.01	0	0	0	0.01	0	1.04	2.8
THR	445	59.64	42.8	22.86	30.6	29.26	108	52.12	51.3	7.52	20
GLY	446	58.57	72.9	34.32	106.3	0	0	34.32	106.3	24.25	50.4
LEU	447	2.18	1.2	0.8	0.6	0	0	0.8	0.6	1.38	3.7
TYR	448	107.2	50.6	70.23	52.2	35.61	84.8	105.84	59.9	1.36	3.8
THR	449	10.33	7.4	0	0	0	0	0	0	10.33	27.5
ALA	450	42.66	39.5	26.34	38	0	0	26.34	38	16.32	42.2
LEU	451	4	2.2	0	0	0	0	0	0	4	10.6
PRO	452	52.89	38.9	52.89	44.2	0	0	52.89	44.2	0	0
ALA	453	61.87	57.3	30.47	44	0	0	30.47	44	31.4	81.2
GLY	454	30.12	37.5	28.37	87.9	0	0	28.37	87.9	1.75	3.6
THR	455	97.01	69.7	52.81	70.8	16.42	60.6	69.23	68.1	27.78	73.9
TYR	456	26.14	12.3	23.01	17.1	3.12	7.4	26.14	14.8	0	0
SER	457	79.36	68.1	35.78	76.4	33.52	107	69.3	88.7	10.05	26.2
ASP	458	14.81	10.6	3.34	7	0	0	3.34	3.3	11.47	30.3
MET	459	62.23	32.1	45.47	29.1	0	0	45.47	29.1	16.76	44.6
LEU	460	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLY	461	60.76	75.6	29.61	91.7	0	0	29.61	91.7	31.15	64.8
GLY	462	33.57	41.8	15.23	47.2	0	0	15.23	47.2	18.35	38.2
LEU	463	54.75	30.7	43.36	30.8	0	0	43.36	30.8	11.38	30.3
LEU	464	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASN	465	83.21	57.8	15.99	35.6	55.88	91.2	71.87	67.6	11.34	30

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)
GLY	466	9.16	11.4	0	0	0	0	0	0	9.16	19.1
SER	467	73.86	63.4	33.87	72.3	38.9	124.2	72.77	93.1	1.09	2.8
SER	468	56.56	48.5	17.86	38.1	19.43	62	37.3	47.7	19.26	50.2
ILE	469	9.32	5.3	9.2	6.7	0	0	9.2	6.7	0.12	0.3
THR	470	67.1	48.2	46.27	62	18.79	69.4	65.06	64	2.04	5.4
VAL	471	5.41	3.6	0	0	0	0	0	0	5.41	14.5
SER	472	45.21	38.8	43.9	93.8	0.06	0.2	43.97	56.3	1.24	3.2
SER	473	116.39	99.9	43.97	93.9	37.75	120.5	81.72	104.6	34.67	90.4
ASN	474	103.2	71.6	47.1	104.8	39.98	65.2	87.08	82	16.12	42.6
GLY	475	10.09	12.6	9.04	28	0	0	9.04	28	1.05	2.2
SER	476	26.36	22.6	16.77	35.8	8.79	28.1	25.56	32.7	0.8	2.1
VAL	477	7.64	5	0.03	0	0	0	0.03	0	7.61	20.4
THR	478	78.87	56.6	63.47	85.1	11.98	44.2	75.45	74.2	3.42	9.1
PRO	479	67.6	49.8	50.19	41.9	0	0	50.19	41.9	17.41	107.6
PHE	480	32.27	16.2	32.27	19.7	0	0	32.27	19.7	0	0
THR	481	80.44	57.8	41.6	55.8	19.08	70.5	60.69	59.7	19.76	52.6
LEU	482	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALA	483	31.46	29.2	31.46	45.4	0	0	31.46	45.4	0	0
PRO	484	51.74	38.1	42.85	35.8	0	0	42.85	35.8	8.89	54.9
GLY	485	0.76	1	0.76	2.4	0	0	0.76	2.4	0	0
GLU	486	7.98	4.6	0.01	0	7.97	10.5	7.98	5.9	0	0
VAL	487	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALA	488	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VAL	489	0.18	0.1	0.18	0.2	0	0	0.18	0.2	0	0
TRP	490	1.43	0.6	1.43	0.8	0	0	1.43	0.7	0	0
GLN	491	39.33	22.1	0.33	0.6	23.85	26.5	24.18	17.2	15.15	40.3
TYR	492	71.84	33.9	43.73	32.5	28.11	66.9	71.84	40.7	0	0
VAL	493	63	41.6	42.31	37.1	0	0	42.31	37.1	20.69	55.4
SER	494	14.74	12.6	0	0	6.77	21.6	6.77	8.7	7.97	20.8
THR	495	140.95	101.2	87.66	117.5	23.4	86.4	111.06	109.2	29.89	79.5
THR	496	100.08	71.9	64.05	85.9	34.67	128	98.72	97.1	1.36	3.6

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)
ASN	497	36.97	25.7	3.97	8.8	11.1	18.1	15.08	14.2	21.9	57.9
PRO	498	65.07	47.9	65.07	54.4	0	0	65.07	54.4	0	0
PRO	499	6.39	4.7	2.48	2.1	0	0	2.48	2.1	3.91	24.2
LEU	500	27.26	15.3	27.26	19.4	0	0	27.26	19.4	0	0
ILE	501	4.32	2.5	0	0	0	0	0	0	4.32	11.6
GLY	502	3.45	4.3	3.23	10	0	0	3.23	10	0.23	0.5
HIS	503	1.69	0.9	1.69	1.8	0	0	1.69	1.1	0	0
VAL	504	0.19	0.1	0	0	0	0	0	0	0.19	0.5
GLY	505	2.86	3.6	2.76	8.6	0	0	2.76	8.6	0.09	0.2
PRO	506	14.37	10.6	14.37	12	0	0	14.37	12	0	0
THR	507	23.47	16.9	7.43	10	11.8	43.6	19.23	18.9	4.24	11.3
MET	508	5.45	2.8	3.04	1.9	0	0	3.04	1.9	2.41	6.4
THR	509	0.95	0.7	0.83	1.1	0	0	0.83	0.8	0.12	0.3
LYS	510	15.77	7.9	15.77	13.8	0	0	15.77	9.7	0	0
ALA	511	47.6	44.1	23.89	34.5	0	0	23.89	34.5	23.71	61.3
GLY	512	54.16	67.4	33.03	102.3	0	0	33.03	102.3	21.13	44
GLN	513	34.43	19.3	27.72	54.7	6.7	7.5	34.43	24.5	0	0
THR	514	39.1	28.1	25.06	33.6	1.58	5.8	26.64	26.2	12.45	33.1
ILE	515	0.43	0.2	0.43	0.3	0	0	0.43	0.3	0	0
THR	516	8.94	6.4	0.14	0.2	8.52	31.5	8.66	8.5	0.29	0.8
ILE	517	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASP	518	0.39	0.3	0	0	0.39	0.7	0.39	0.4	0	0
GLY	519	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARG	520	30.95	13	11.25	14.8	19.7	15.8	30.95	15.4	0	0
GLY	521	13.2	16.4	6.12	19	0	0	6.12	19	7.08	14.7
PHE	522	0.22	0.1	0	0	0	0	0	0	0.22	0.6
GLY	523	25.26	31.4	25.26	78.2	0	0	25.26	78.2	0	0
THR	524	103.8	74.5	56.56	75.8	22.87	84.4	79.43	78.1	24.37	64.8
THR	525	88.97	63.9	79.18	106.2	8.66	32	87.84	86.4	1.13	3
ALA	526	58.22	54	31.25	45.1	0	0	31.25	45.1	26.96	69.7
GLY	527	23.25	28.9	5.32	16.5	0	0	5.32	16.5	17.93	37.3

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)	(Å) <sup>2</sup>	(%)
GLN	528	74.78	42	26.07	51.4	48.7	54.2	74.76	53.2	0.02	0
VAL	529	0.1	0.1	0	0	0	0	0	0	0.1	0.3
LEU	530	23.21	13	23.21	16.5	0	0	23.21	16.5	0	0
PHE	531	0.85	0.4	0.55	0.3	0	0	0.55	0.3	0.3	0.9
GLY	532	36.33	45.2	23.14	71.7	0	0	23.14	71.7	13.19	27.4
THR	533	131.04	94.1	79.99	107.2	30.52	112.7	110.51	108.7	20.53	54.6
THR	534	38.03	27.3	21.21	28.4	16.82	62.1	38.03	37.4	0	0
PRO	535	67.47	49.7	57.75	48.3	0	0	57.75	48.3	9.72	60.1
ALA	536	16.09	14.9	1.12	1.6	0	0	1.12	1.6	14.96	38.7
THR	537	86.42	62.1	52.19	70	33.82	124.9	86.01	84.6	0.41	1.1
ILE	538	48.37	27.6	25.38	18.4	0	0	25.38	18.4	22.99	61.7
VAL	539	68.57	45.3	43.69	38.3	0	0	43.69	38.3	24.88	66.7
SER	540	48.17	41.3	35.66	76.1	12.51	39.9	48.17	61.6	0	0
TRP	541	26.11	10.5	2.43	1.3	0	0	2.43	1.2	23.68	62
GLU	542	58.48	34	24.76	42	33.72	44.5	58.48	43.4	0	0
ASP	543	53.68	38.2	22.91	47.7	30.77	56.4	53.68	52.3	0	0
THR	544	24.87	17.9	20.42	27.4	4.4	16.3	24.82	24.4	0.04	0.1
GLU	545	10.03	5.8	0.78	1.3	8.27	10.9	9.05	6.7	0.98	2.6
VAL	546	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LYS	547	77.98	39	36.43	31.8	41.55	86.8	77.98	48	0	0
VAL	548	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LYS	549	77.36	38.7	48.36	42.2	28.12	58.7	76.48	47.1	0.88	2.3
VAL	550	4.87	3.2	0.7	0.6	0	0	0.7	0.6	4.17	11.2
PRO	551	19.9	14.6	19.9	16.6	0	0	19.9	16.6	0	0
ALA	552	96.61	89.5	61.42	88.7	0	0	61.42	88.7	35.19	91
LEU	553	44.32	24.8	32.8	23.3	0	0	32.8	23.3	11.52	30.6
THR	554	99.85	71.7	59.66	80	35.05	129.4	94.71	93.2	5.14	13.7
PRO	555	38.73	28.5	32.28	27	0	0	32.28	27	6.45	39.9
GLY	556	17.46	21.7	17.46	54.1	0	0	17.46	54.1	0	0
LYS	557	82.59	41.3	51.51	44.9	1.27	2.6	52.78	32.5	29.81	79.3
TYR	558	39.5	18.6	27.87	20.7	11.63	27.7	39.5	22.4	0	0

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)
ASN	559	66.71	46.3	15.43	34.3	48.25	78.7	63.68	59.9	3.03	8
ILE	560	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
THR	561	27.97	20.1	23.57	31.6	4.4	16.2	27.97	27.5	0	0
LEU	562	0.02	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0.1
LYS	563	63.8	31.9	46.05	40.2	17.61	36.8	63.66	39.2	0.14	0.4
THR	564	13.47	9.7	9.09	12.2	0	0	9.09	8.9	4.38	11.6
ALA	565	66.44	61.6	32.74	47.3	0	0	32.74	47.3	33.7	87.2
SER	566	95.13	81.6	50.99	108.9	14.81	47.3	65.8	84.2	29.33	76.4
GLY	567	45.46	56.6	23.02	71.3	0	0	23.02	71.3	22.44	46.7
VAL	568	59.64	39.4	59.64	52.3	0	0	59.64	52.3	0	0
THR	569	77.83	55.9	42.66	57.2	11.37	42	54.03	53.1	23.8	63.3
SER	570	14.42	12.4	0.45	1	0	0	0.45	0.6	13.96	36.4
ASN	571	61.34	42.6	38.85	86.4	21.25	34.7	60.1	56.6	1.25	3.3
SER	572	50.57	43.4	10.05	21.5	19.59	62.5	29.64	37.9	20.93	54.5
TYR	573	29.36	13.8	27.22	20.2	2.14	5.1	29.36	16.6	0	0
ASN	574	63.68	44.2	6.56	14.6	52.44	85.6	58.99	55.5	4.69	12.4
ASN	575	49.33	34.2	1.9	4.2	46.07	75.2	47.97	45.1	1.36	3.6
ILE	576	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASN	577	21.57	15	6.36	14.1	15.21	24.8	21.57	20.3	0	0
VAL	578	2.83	1.9	2.53	2.2	0	0	2.53	2.2	0.3	0.8
LEU	579	6.74	3.8	3.18	2.3	0	0	3.18	2.3	3.56	9.5
THR	580	58.95	42.3	31.09	41.7	0.88	3.2	31.97	31.4	26.98	71.8
GLY	581	19.2	23.9	19.2	59.5	0	0	19.2	59.5	0	0
ASN	582	98.62	68.5	22.36	49.7	70.37	114.8	92.72	87.3	5.9	15.6
GLN	583	10.25	5.8	0	0	0	0	0	0	10.25	27.3
VAL	584	7.91	5.2	7.91	6.9	0	0	7.91	6.9	0	0
CYS	585	1.24	0.9	0.02	0	0	0	0.02	0	1.22	3.2
VAL	586	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARG	587	25.43	10.7	1.61	2.1	23.82	19.1	25.43	12.7	0	0
PHE	588	0.65	0.3	0.65	0.4	0	0	0.65	0.4	0	0
VAL	589	1.51	1	0.65	0.6	0	0	0.65	0.6	0.86	2.3

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)
VAL	590	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASN	591	38.83	27	12.58	28	26.25	42.8	38.83	36.5	0	0
ASN	592	87.33	60.6	26.92	59.9	50.59	82.6	77.51	73	9.82	26
ALA	593	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
THR	594	79.53	57.1	49.29	66.1	22.43	82.8	71.72	70.5	7.81	20.8
THR	595	26.16	18.8	1.32	1.8	5.29	19.5	6.61	6.5	19.55	52
VAL	596	113.12	74.7	109.07	95.6	0	0	109.07	95.6	4.06	10.9
TRP	597	248.48	99.8	197.24	105.4	30.48	128.5	227.72	108	20.76	54.4
GLY	598	49.23	61.3	28.99	89.8	0	0	28.99	89.8	20.25	42.1
GLU	599	20.02	11.6	0.98	1.7	12.82	16.9	13.8	10.3	6.22	16.5
ASN	600	48.17	33.4	0.19	0.4	47.98	78.3	48.17	45.3	0	0
VAL	601	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TYR	602	30.29	14.3	9.24	6.9	21.06	50.1	30.29	17.2	0	0
LEU	603	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
THR	604	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLY	605	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASN	606	60.56	42	1.8	4	42.47	69.3	44.27	41.7	16.28	43.1
VAL	607	13.61	9	13.61	11.9	0	0	13.61	11.9	0	0
ALA	608	31.78	29.5	11.84	17.1	0	0	11.84	17.1	19.94	51.6
GLU	609	14.23	8.3	4.45	7.6	0	0	4.45	3.3	9.79	26
LEU	610	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GLY	611	10.5	13.1	6.25	19.4	0	0	6.25	19.4	4.26	8.9
ASN	612	77.86	54	24.64	54.8	38.26	62.4	62.9	59.2	14.96	39.5
TRP	613	86	34.5	58.66	31.3	13.74	57.9	72.4	34.3	13.6	35.6
ASP	614	55.11	39.2	24.4	50.8	30.71	56.3	55.11	53.7	0	0
THR	615	29.09	20.9	2.28	3.1	23.79	87.8	26.07	25.6	3.02	8
SER	616	87.91	75.4	50.67	108.2	9.79	31.2	60.45	77.3	27.46	71.6
LYS	617	130.59	65.3	73.64	64.3	48.16	100.6	121.8	75	8.79	23.4
ALA	618	15.17	14.1	0.01	0	0	0	0.01	0	15.15	39.2
ILE	619	23.66	13.5	23.66	17.2	0	0	23.66	17.2	0	0
GLY	620	29.11	36.2	0	0	0	0	0	0	29.11	60.5



Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)	Absoluta (Å) <sup>2</sup>	Relativa (%)
PRO	621	63.92	47.1	60.27	50.4	0	0	60.27	50.4	3.64	22.5
MET	622	6.4	3.3	0	0	0	0	0	0	6.4	17
PHE	623	18.2	9.1	18.2	11.1	0	0	18.2	11.1	0	0
ASN	624	31.79	22.1	1.56	3.5	27.34	44.6	28.9	27.2	2.89	7.7
GLN	625	95.02	53.3	29.38	58	58.46	65	87.85	62.5	7.17	19.1
VAL	626	4.83	3.2	0.34	0.3	0	0	0.34	0.3	4.49	12
VAL	627	30.79	20.3	12.44	10.9	0	0	12.44	10.9	18.35	49.2
TYR	628	65.63	31	44.6	33.1	21.04	50.1	65.63	37.2	0	0
GLN	629	106.32	59.7	54.2	106.9	48.03	53.4	102.23	72.7	4.09	10.9
TYR	630	98.49	46.5	71.52	53.1	7.55	18	79.07	44.8	19.43	54.8
PRO	631	49.5	36.4	49.49	41.4	0	0	49.49	41.4	0.01	0.1
THR	632	29.2	21	29.2	39.1	0	0	29.2	28.7	0	0
TRP	633	6.34	2.5	6.34	3.4	0	0	6.34	3	0	0
TYR	634	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TYR	635	29.38	13.9	13.99	10.4	15.39	36.6	29.38	16.6	0	0
ASP	636	7.99	5.7	0.47	1	3.86	7.1	4.34	4.2	3.65	9.7
VAL	637	7.33	4.8	7.33	6.4	0	0	7.33	6.4	0	0
SER	638	3.03	2.6	0.56	1.2	0	0	0.56	0.7	2.47	6.4
VAL	639	1.19	0.8	1.19	1	0	0	1.19	1	0	0
PRO	640	0.89	0.7	0.89	0.7	0	0	0.89	0.7	0	0
ALA	641	26.75	24.8	7.94	11.5	0	0	7.94	11.5	18.81	48.6
GLY	642	41.96	52.2	12	37.2	0	0	12	37.2	29.95	62.3
THR	643	37.31	26.8	27.63	37	9.68	35.7	37.31	36.7	0	0
THR	644	71.93	51.7	38.19	51.2	20.23	74.7	58.42	57.5	13.51	35.9
ILE	645	0.96	0.5	0.75	0.5	0	0	0.75	0.5	0.2	0.5
GLU	646	72.32	42	14.46	24.6	57.86	76.4	72.32	53.7	0	0
PHE	647	0.81	0.4	0.81	0.5	0	0	0.81	0.5	0	0
LYS	648	17.18	8.6	11.51	10	5.67	11.8	17.18	10.6	0	0
PHE	649	0.71	0.4	0.71	0.4	0	0	0.71	0.4	0	0
ILE	650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LYS	651	26.35	13.2	5.22	4.6	21.13	44.1	26.35	16.2	0	0

Aminoácido	Número	RESIDUO COMPLETO		CADENA LATERAL GRUPO NO POLAR		CADENA LATERAL GRUPO POLAR		CADENA LATERAL COMPLETA		CADENA PRINCIPAL	
		Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa
		(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)	(A) <sup>2</sup>	(%)
LYS	652	41.27	20.6	18.82	16.4	20.71	43.2	39.53	24.3	1.74	4.6
ASN	653	100.23	69.6	11.1	24.7	55.62	90.8	66.72	62.8	33.52	88.6
GLY	654	73.44	91.4	35.13	108.8	0	0	35.13	108.8	38.31	79.7
SER	655	104.56	89.7	40.72	87	40.16	128.2	80.88	103.5	23.68	61.7
THR	656	66.79	48	28.6	38.3	31.66	116.9	60.26	59.3	6.53	17.4
VAL	657	67.76	44.7	40.27	35.3	0	0	40.27	35.3	27.49	73.7
THR	658	58.98	42.4	37.58	50.4	21.4	79	58.98	58	0	0
TRP	659	104.37	41.9	72.47	38.7	15.28	64.4	87.74	41.6	16.63	43.6
GLU	660	5.31	3.1	0	0	0	0	0	0	5.31	14.1
GLY	661	18.2	22.7	18.2	56.4	0	0	18.2	56.4	0	0
GLY	662	61.62	76.7	27.49	85.2	0	0	27.49	85.2	34.13	71
TYR	663	191.08	90.1	147.17	109.3	43.26	103	190.43	107.8	0.65	1.8
ASN	664	48.86	33.9	2.95	6.6	36.19	59.1	39.14	36.8	9.72	25.7
HIS	665	18.47	10.1	10.13	10.5	8.35	16.4	18.47	12.6	0	0
VAL	666	95.15	62.8	67.5	59.1	0	0	67.5	59.1	27.66	74.1
TYR	667	41.37	19.5	37.14	27.6	4.22	10	41.36	23.4	0.01	0
THR	668	74.8	53.7	44.43	59.6	16.89	62.4	61.32	60.3	13.48	35.9
THR	669	2.06	1.5	0.62	0.8	0	0	0.62	0.6	1.44	3.8
PRO	670	39.56	29.1	39.56	33.1	0	0	39.56	33.1	0	0
THR	671	113.05	81.2	71.75	96.2	23.62	87.2	95.36	93.8	17.68	47
SER	672	101.98	87.5	48.2	102.9	31.77	101.4	79.98	102.3	22	57.3
GLY	673	22.11	27.5	17.53	54.3	0	0	17.53	54.3	4.57	9.5
THR	674	20.47	14.7	0.86	1.2	4.13	15.3	4.99	4.9	15.48	41.2
ALA	675	10.45	9.7	9.88	14.3	0	0	9.88	14.3	0.57	1.5
THR	676	64.16	46.1	23.77	31.9	15	55.4	38.77	38.1	25.39	67.6
VAL	677	15.49	10.2	15.03	13.2	0	0	15.03	13.2	0.46	1.2
ILE	678	97.71	55.8	70.73	51.3	0	0	70.73	51.3	26.98	72.5
VAL	679	30.83	20.4	30.83	27	0	0	30.83	27	0	0
ASP	680	74.68	53.2	30.32	63.1	36.48	66.9	66.8	65.1	7.88	20.8
TRP	681	34.3	13.8	10.46	5.6	10.99	46.3	21.45	10.2	12.85	33.7
GLN	682	43.37	24.3	22.83	45	20.34	22.6	43.17	30.7	0.2	0.5
PRO	683	159.14	117.2	113.21	94.6	0	0	113.21	94.6	45.93	283.9

## ANEXO III

Comparación de las secuencias de aminoácidos de las CGTasas de *Thermoanaerobacter* sp. 501 y *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (Tabium). La primera línea pertenece a la CGTasa de *Thermoanaerobacter* y la segunda a la de Tabium. En negrita se indican las diferencias en la secuencia. En total existen 64 aminoácidos distintos en ambas estructuras, lo que equivale a un 91 % de homología en la secuencia.

- 1      ala pro asp thr ser val ser asn val val asn tyr ser thr asp val ile tyr gln ile *Thermoanaerobacter*  
 ala **ser** asp thr **ala** val ser asn val val asn tyr ser thr asp val ile tyr gln ile *Tabium*
- 21     val thr asp arg phe leu asp gly asn pro ser asn asn pro thr gly asp leu tyr asp  
 val thr asp arg phe **val** asp gly asn **thr** ser asn asn pro thr gly asp leu tyr asp
- 41     pro thr his thr ser leu lys lys tyr phe gly gly asp trp gln gly ile ile asn lys  
 pro thr his thr ser leu lys lys tyr phe gly gly asp trp gln gly ile ile asn lys
- 61     ile asn asp gly tyr leu thr gly met gly ile thr ala ile trp ile ser gln pro val  
 ile asn asp gly tyr leu thr gly met gly **val** thr ala ile trp ile ser gln pro val
- 81     glu asn ile tyr ala val leu pro asp ser thr phe gly gly ser thr ser tyr his gly  
 glu asn ile tyr ala val leu pro asp ser thr phe gly gly ser thr ser tyr his gly
- 101    tyr trp ala arg asp phe lys lys thr asn pro phe phe gly ser phe thr asp phe gln  
 tyr trp ala arg asp phe lys **arg** thr asn pro tyr phe gly ser phe thr asp phe gln
- 121    asn leu ile ala thr ala his ala his asn ile lys val ile ile asp phe ala pro asn  
 asn leu ile **asn** thr ala his ala his asn ile lys val ile ile asp phe ala pro asn
- 141    his thr ser pro ala ser glu thr asp pro thr tyr gly glu asn gly arg leu tyr asp  
 his thr ser pro ala ser glu thr asp pro thr tyr **ala** glu asn gly arg leu tyr asp
- 161    asn gly val leu leu gly gly tyr thr asn asp thr asn gly tyr phe his his tyr gly  
 asn gly **thr** leu leu gly gly tyr thr asn asp thr asn gly tyr phe his his tyr gly
- 181    gly thr asn phe ser ser tyr glu asp gly ile tyr arg asn leu phe asp leu ala asp  
 gly thr **asp** phe ser ser tyr glu asp gly ile tyr arg asn leu phe asp leu ala asp
- 201    leu asp gln gln asn ser thr ile asp ser tyr leu lys ala ala ile lys leu trp leu  
 leu **asn** gln gln asn ser thr ile asp ser tyr leu lys **ser** ala ile lys **val** trp leu

- 221 asp met gly ile asp gly ile arg met asp ala val lys his met ala phe gly trp gln  
asp met gly ile asp gly ile arg **leu** asp ala val lys his met **pro** phe gly trp gln
- 241 lys asn phe met asp ser ile leu ser tyr arg pro val phe thr phe gly glu trp tyr  
lys asn phe met asp ser ile leu ser tyr arg pro val phe thr phe gly glu trp **phe**
- 261 leu gly thr asn glu val asp pro asn asn thr tyr phe ala asn glu ser gly met ser  
leu gly thr asn glu **ile** asp **val** asn asn thr tyr phe ala asn glu ser gly met ser
- 281 leu leu asp phe arg phe ala gln lys val arg gln val phe arg asp asn thr asp thr  
leu leu asp phe arg phe **ser** gln lys val arg gln val phe arg asp asn thr asp thr
- 301 met tyr gly leu asp ser met ile gln ser thr ala ala asp tyr asn phe ile asn asp  
met tyr gly leu asp ser met ile gln ser thr ala **ser** asp tyr asn phe ile asn asp
- 321 met val thr phe ile asp asn his asp met asp arg phe tyr thr gly gly ser thr arg  
met val thr phe ile asp asn his asp met asp arg phe tyr **asn** gly gly ser thr arg
- 341 pro val glu gln ala leu ala phe thr leu thr ser arg gly val pro ala ile tyr tyr  
pro val glu gln ala leu ala phe thr leu thr ser arg gly val pro ala ile tyr tyr
- 361 gly thr glu gln tyr met thr gly asn gly asp pro tyr asn arg ala met met thr ser  
gly thr glu gln tyr met thr gly asn gly asp pro tyr asn arg ala met met thr ser
- 381 phe asp thr thr thr thr ala tyr asn val ile lys lys leu ala pro leu arg lys ser  
phe **asn** thr **ser** thr thr ala tyr asn val ile lys lys leu ala pro leu arg lys ser
- 401 asn pro ala ile ala tyr gly thr gln lys gln arg trp ile asn asn asp val tyr ile  
asn pro ala ile ala tyr gly thr **thr gln** gln arg trp ile asn asn asp val tyr ile
- 421 tyr glu arg gln phe gly asn asn val ala leu val ala ile asn arg asn leu ser thr  
tyr glu arg **lys** phe gly asn asn val ala leu val ala ile asn arg asn leu ser thr
- 441 ser tyr tyr ile thr gly leu tyr thr ala leu pro ala gly thr tyr ser asp met leu  
ser tyr **asn** ile thr gly leu tyr thr ala leu pro ala gly thr tyr **thr** asp **val** leu
- 461 gly gly leu leu asn gly ser ser ile thr val ser ser asn gly ser val thr pro phe  
gly gly leu leu asn gly **asn** ser ile **ser** val **ala** ser **asp** gly ser val thr pro phe
- 481 thr leu ala pro gly glu val ala val trp gln tyr val ser thr thr asn pro pro leu  
**thr** leu **ser** **ala** gly glu val ala val trp gln tyr val ser **ser** **ser** **asn** **ser** pro leu

- 501 ile gly his val gly pro thr met thr lys ala gly gln thr ile thr ile asp gly arg  
ile gly his val gly pro thr met thr lys ala gly gln thr ile thr ile asp gly arg
- 521 gly phe gly thr thr ala gly gln val leu phe gly thr thr pro ala thr ile val ser  
gly phe gly thr thr **ser** gly gln val leu phe gly **ser** thr **ala** gly thr ile val ser
- 541 trp glu asp thr glu val lys val lys val pro ala leu thr pro gly lys tyr asn ile  
trp **asp** asp thr glu val lys val lys val pro **ser** **val** thr pro gly lys tyr asn ile
- 561 thr leu lys thr ala ser gly val thr ser asn ser tyr asn asn ile asn val leu thr  
ser leu lys thr **ser** ser gly **ala** thr ser asn **thr** tyr asn asn ile asn **ile** leu thr
- 581 gly asn gln val cys val arg phe val val asn asn ala thr thr val trp gly glu asn  
gly asn gln **ile** cys val arg phe val val asn asn ala **ser** thr val **tyr** gly glu asn
- 601 val tyr leu thr gly asn val ala glu leu gly asn trp asp thr ser lys ala ile gly  
val tyr leu thr gly asn val ala glu leu gly asn trp asp thr ser lys ala ile gly
- 621 pro met phe asn gln val val tyr gln tyr pro thr trp tyr tyr asp val ser val pro  
pro met phe asn gln val val tyr gln tyr pro thr trp tyr tyr asp val ser val pro
- 641 ala gly thr thr ile glu phe lys phe ile lys lys asn gly ser thr val thr trp glu  
ala gly thr thr ile **gln** phe lys phe ile lys lys asn gly **asn** thr **ile** thr trp glu
- 661 gly gly tyr asn his val tyr thr thr pro thr ser gly thr ala thr val ile val asp  
gly gly **ser** asn his **thr** tyr thr **val** pro **ser** ser **ser** thr **gly** thr val ile val **asn**
- 681 trp gln pro  
trp gln **gln**

## ANEXO IV

Publicaciones y presentaciones en congresos a los que ha dado lugar la presente Tesis Doctoral.

### 1 PUBLICACIONES

Alcalde, M.; Plou, F.J.; Pastor, E. and Ballesteros, A. (1996). Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) from *Thermoanaerobacter* sp: Effects of chemical modification on its activity and product specificity. In: "Comunicaciones del III Congreso Ibérico de Biotecnología.", 409-410. Eds.: Fernández-Polanco F., García Encina P.A., González Benito G., y Peña Miranda M.P. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Valladolid.

Alcalde, M.; Plou, F.J.; Pastor, E. & Ballesteros, A. (1998). Effect of chemical modification of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Thermoanaerobacter* sp. on its activity and product selectivity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 864: 183-187

Alcalde, M.; Plou, F.J.; Martín, M.T.; Remaud, M.; Monsan, P. and Ballesteros, A. (1998). Stability in the presence of organic solvents of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F immobilized in calcium-alginate beads. In: "Stability and Stabilization of Biocatalysts", 535-540. Eds.: Ballesteros, A.; Plou, F.J.; Iborra, J.L. and Halling, P. Elsevier, Amsterdam.

Alcalde, M.; Plou, F. J.; Andersen, C.; Martín, M.T.; Pedersen, S. and Ballesteros, A. (1999). Chemical modification of lysine side chains of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Thermoanaerobacter* causes a shift from CGTase to  $\alpha$ -amylase specificity. *FEBS Lett.*, 445: 333-337.

Plou, F.J.; Alcalde, M. y Ballesteros, A. (1999). Estabilidad de los Biocatalizadores. *Investigación y Ciencia*. En prensa.

### 2 CONGRESOS

Alcalde, M. & Plou, F. "Structure-Function Relationships of Glucosyltransferases, Workshop on CGTase Methods and Techniques". (Groningen, Holanda. 22-24 Junio 1995).

Alcalde, M. "Dextransucrase in organic solvents." Structure Function Relationships of Glucosyltransferases, Dextransucrase Workshop I. (Toulouse, Francia. 11-13 Julio 1995). Exposición oral.

Alcalde, M. "Work with Chemically Modified Enzymes". III Joint Meeting of the Glycosyltransferase Project. (Londres, Inglaterra 18-20 Abril 1996). Exposición oral.

Alcalde, M.; Plou, F.J.; Pastor, E. & Ballesteros, A. "*Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) from Thermoanaerobacter sp: Effects of chemical modification on its activity and product specificity.*" Congreso Hispano-Luso de Biotecnología.(Valladolid. 10-13 Septiembre 1996). Seleccionado por el comité científico como comunicación oral.

Alcalde, M. "*Chemical modification and immobilization of CGTase and Dextranucrase.*" IV Joint Meeting of the Glycosyltransferase Project. (Braunschweig. Alemania 3-5 Octubre 1996). Exposición oral.

Alcalde, M.; Remaud, M.; Plou, F.J.; Willemot, R.M.; Ballesteros, A. & Monsan, P. "*Dextranucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B512-F: effect of the removal of its dextran layer on the immobilization on silica.*" 2<sup>nd</sup> Carbohydrate Bioengineering Meeting. La Rochelle, Francia. 15-18 Abril 1997. Poster.

Alcalde, M.; Plou, F.J.; Pérez, M. & Ballesteros, A. "*Chemical modification of amino groups of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from Thermoanaerobacter sp.*" 2<sup>nd</sup> Carbohydrate Bioengineering Meeting. La Rochelle, Francia. 15-18 Abril 1997. Poster.

Alcalde, M.; Plou, F.J., Pastor, E. & Ballesteros, A. "*Effect of Chemical modification on activity and product selectivity of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) from Thermoanaerobacter sp.*" Enzyme Engineering XIV Conference. Pekin. China. 15-20 Octubre 1997. Poster. Unico representante español.

Alcalde, M., Plou, F.J.; Monzón, M.T. and Ballesteros, A. "*Stability in the presence of organic solvents of dextranucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F immobilized in calcium-alginate beads*" Stability and Stabilization of Biocatalysts. Córdoba. 19-22 Abril 1998. Poster. Colaborador del Comité Organizador.

Alcalde, M.; Plou, F.J.; Andersen, C.; Martín, M.T.; Gómez de Segura, A.; Pedersen, S. and Ballesteros, A. "*Chemical modification of lysine side chain of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from Thermoanaerobacter causes a shift from CGTase to  $\alpha$ -amylase specificity.*" 3<sup>rd</sup> Carbohydrate Bioengineering meeting, Newcastle, 11-14 Abril, 1999. Poster.

Alcalde, M.; Gómez de Segura, A.; Martín, M. T.; Plou, F. J. and Ballesteros, A. "*Synthesis of glucooligosaccharides by acceptor reaction of dextranucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F entrapped in calcium-alginate beads.*" 3<sup>rd</sup> Carbohydrate Bioengineering meeting, Newcastle, 11-14 Abril, 1999. Poster.

