

L. Plaza-Vinuesa¹, MP. Oquist-Phillip¹, O. Hernández², N. Corzo², F.J. Moreno², R. Muñoz¹ y B. de las Rivas¹.

¹Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), C/ José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, España.

²Química y Funcionalidad de Carbohidratos y Derivados, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, (CIAL-CSIC), C/ Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, España.

INTRODUCCIÓN

Según la base de datos CAZY (Carbohydrate-Active enZymes, <http://www.cazy.org>) existen 153 familias de glicosil hidrolasas. Algunas de estas familias, a su vez, incluyen diferentes subfamilias, como el caso de la familia 13 de glicosil hidrolasas (GH13) que consta de 42 subfamilias. La subfamilia 20 de la familia GH13 (GH13_20) agrupa enzimas con actividad amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133), ciclomaltodextrinasa (EC 3.2.1.54) y neopullulanasa (EC 3.2.1.135). Estas enzimas se distinguen de las típicas α -amilasas por poseer un dominio N-terminal adicional y por mostrar mayor preferencia por ciclomaltodextrinas que por almidón [1].

Lactobacillus plantarum WCFS1 posee 55 proteínas anotadas en la base de datos CAZY como posibles glicosil-hidrolasas (GH). La proteína Lp_2757 de *L. plantarum* WCFS1 está anotada como posible α -amilasa maltogénica. Lp_2757 pertenece a la subfamilia GH13_20 de glicosil hidrolasas. Estructuralmente, las enzimas de la familia GH13 poseen tres dominios estructurales conservados (dominios A, B y C). La proteína Lp_2757 posee además un dominio N-terminal adicional de unión a almidón (CBM), el dominio CBM34 (Fig.1). Lp_2757 posee los dominios típicos de la subfamilia GH13_20 [2].

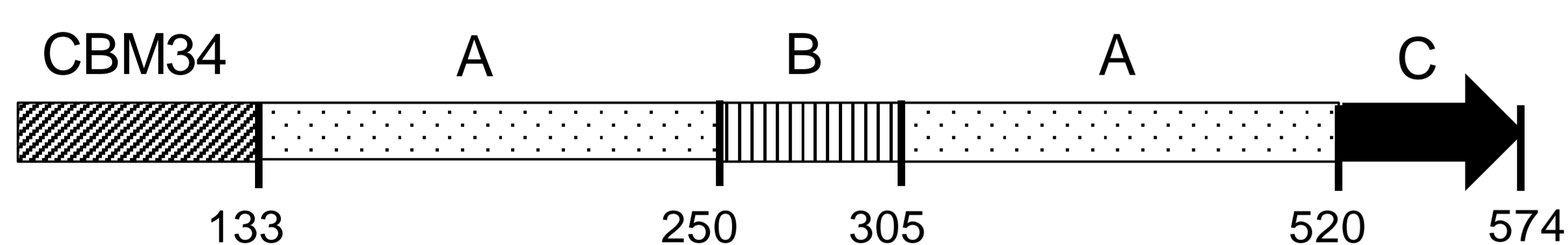


Figura 1. Dominios estructurales de la glicosil hidrolasa Lp_2757 de *L. plantarum* WCFS1.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se clonó el gen mediante una estrategia independiente de ligación [3]. La proteína Lp_2757 de 62,4 kDa (Fig.1) se purificó utilizando la resina TALON® (Clontech). Para conocer la especificidad de sustrato de Lp_2757 se utilizó una librería de 24 derivados *p*-nitrofenilo de azúcares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lp_2757 presentó actividad frente a *p*-nitrofenil- α -D-maltopiranosido y *p*-nitrofenil- α -D-maltopentaósido. Lp_2757 presentó temperatura óptima a 37 °C y pH 6.0. Se trata de una proteína termoestable en el intervalo de 22 a 37°C, manteniendo un 80% de actividad en incubaciones de 24h. La presencia de iones Fe²⁺ y Ca²⁺ incrementó la actividad de Lp_2757, así como la presencia de DMSO, DEPC y EDTA (Fig.2). Lp_2757 presentó un valor de *K*_m de 3.1±0.3 mM y *k*_{cat}/*K*_m de 334 mM⁻¹min⁻¹. Respecto a los parámetros cinéticos calculados con el sustrato α -D-maltopentaósido, Lp_2757 presentó mayor afinidad y especificidad de sustrato que otras enzimas de *L. plantarum* pertenecientes a la familia GH13 caracterizadas previamente [4].

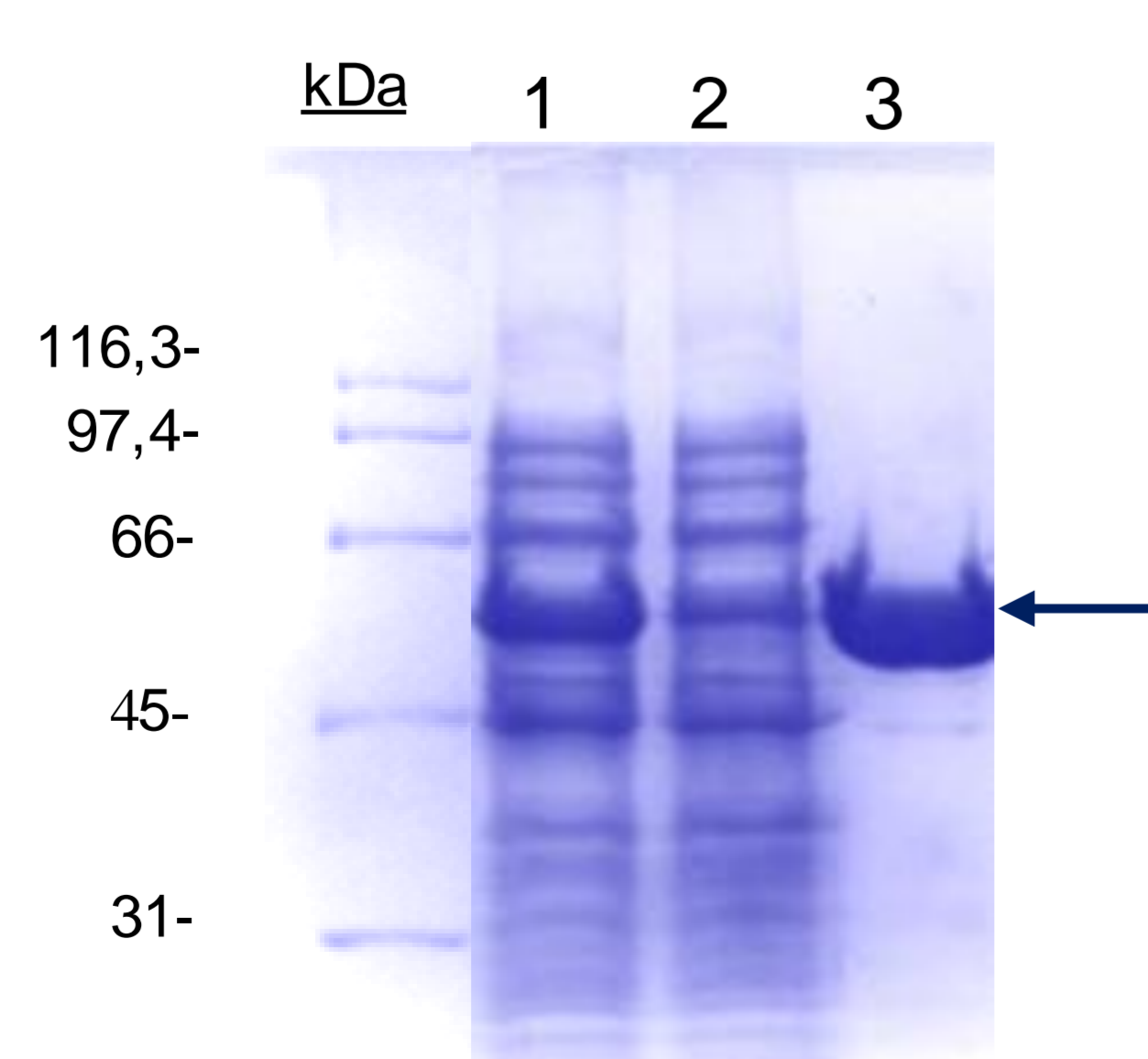


Figura 2. Producción y purificación de la proteína recombinante Lp_2757 de *L. plantarum* WCFS1.

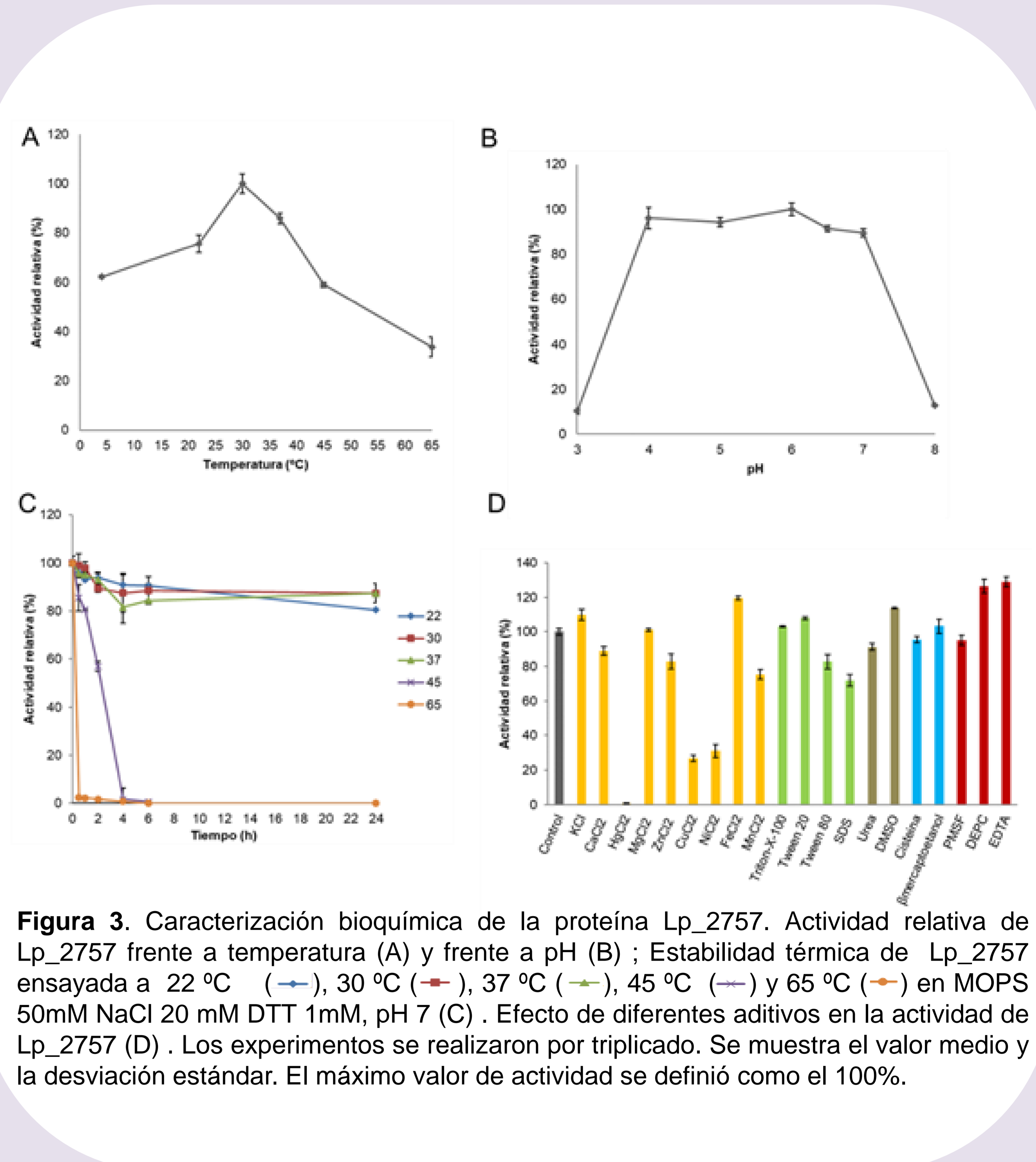


Figura 3. Caracterización bioquímica de la proteína Lp_2757. Actividad relativa de Lp_2757 frente a temperatura (A) y frente a pH (B); Estabilidad térmica de Lp_2757 ensayada a 22 °C (—), 30 °C (—), 37 °C (—), 45 °C (—) y 65 °C (—) en MOPS 50mM NaCl 20 mM DTT 1mM, pH 7 (C). Efecto de diferentes aditivos en la actividad de Lp_2757 (D). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se muestra el valor medio y la desviación estándar. El máximo valor de actividad se definió como el 100%.

CONCLUSIONES

La proteína Lp_2757 de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 incluida en la familia GH13_20 de glicosil hidrolasas posee actividad α -D-maltosidasa. Lp_2757 es termoestable en el intervalo de 22 a 37°C presentando una actividad máxima a 37°C y pH 6.0.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a los proyectos AGL2017-84614-1-R y AGL2017-84614-2-R (AEI/FEDER, UE).

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Miao, B. Jiang, Z. Jin and J.N. BeMiller (2018) Compr Rev Food Sci Food Saf, 17, pp. 1238-1260.
- [2] K. Majzlová, Z. Pukajová and S. Janecek (2013) Carbohydr. Res, 367:48-57
- [3] Curiel, J. A. et al. (2011). Protein Expr Purif 76:44-53
- [4] E. J. Jeon, J. H. Jung, D. H. Seo, D. H. Jung, J. F. Holden and C. S. Park (2014) Enzyme Microb Tech, 60: 9-15.