

Explorando microbiomas extremófilos para descubrir enzimas inéditas que transforman almidón

Las cicloglucanotransferasas (CGTasas) transforman el polímero almidón en nanomoléculas anfipáticas de interés biotecnológico llamadas ciclodextrinas. Aunque las CGTasas termófilas son ideales para procesos industriales, el 75 % de las CGTasas caracterizadas pertenecen a bacterias mesófilas de la sobreexplorada clase Bacilli. Recientemente la minería de datos (meta)genómicos ha permitido detectar nuevas CGTasas presentes en nichos ecológicos inexplorados. El estudio de éstas CGTasas inéditas, ofrece pistas sobre su papel fisiológico en microbiomas extremófilos y su caracterización abre la oportunidad de ampliar el conocimiento sobre su estructura, mecanismos funcionales y proponer modificaciones racionales que incrementen su eficiencia para obtener productos de valor agregado.

Palabras clave:
ciclodextrinas,
cicloglucanotransferasas,
metabolismo de carbohidratos,
minería de (meta)genomas,
termoenzimas.

VÍCTOR MANUEL CARBALLO-UICAB¹, XITLALLI MONTSERRAT ROMERO-JIMÉNEZ¹, JORGE IVÁN ARANDA-CARABALLO¹ Y SARA CENTENO-LEIJA^{2*}

¹Laboratorio de Biología Sintética, Estructural y Molecular, Laboratorio de Agrobiotecnología, Tecnoparque CLQ, Universidad de Colima, Carretera Los Limones-Loma de Juárez, 28627 Colima, Colima, México

²Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Laboratorio de Biología Sintética, Estructural y Molecular, Laboratorio de Agrobiotecnología, Tecnoparque CLQ, Universidad de Colima, Carretera Los Limones-Loma de Juárez, 28627 Colima, Colima, México

* scenteno0@uclm.mx

El almidón es uno de los polisacáridos de reserva de mayor abundancia en las plantas, conformado por monómeros de glucosa unidos por enlaces glucosídicos α -1,4 (amilosa) (Figura 1A), con ramificaciones mediante enlaces α -1,6 (amilopectina) (Pérez y Bertoft 2010) (Figura 1B). Dada su amplia prevalencia en recursos agrícolas, a su alto valor nutricional y al bajo costo de extracción y manufactura, el almidón representa una de las materias primas clave en la síntesis de productos de alto valor agregado (Lloyd y Kossmann 2019). A nivel industrial, la forma más común de transformar almidón es a través del uso de catalizadores biológicos llamados enzimas.

Las α -amilasas, son el grupo más grandes de enzimas (familia 13 de las Glicosil-Hidrolasas (GH13) relacionadas con la transformación de almidón (Paul *et al.* 2021). A grandes rasgos, las α -amilasas tienen la propiedad de romper los enlaces α -1,4 o α -1,6 del almidón para producir carbohidratos más simples tales como glucosa, maltosa (disacárido) o cadenas lineales de tres a 20 unidades de glucosa (oligosacáridos lineales) (Figura 1C). Dentro de la familia GH13 de las α -amilasas se encuentra la subfamilia 2 formada por un pequeño grupo de enzimas llamadas cicloglucanotransferasas (CGTasas, EC 2.4.1.19) aisladas de bacterias y arqueas. Las CGTasas tienen la capacidad única de transformar el

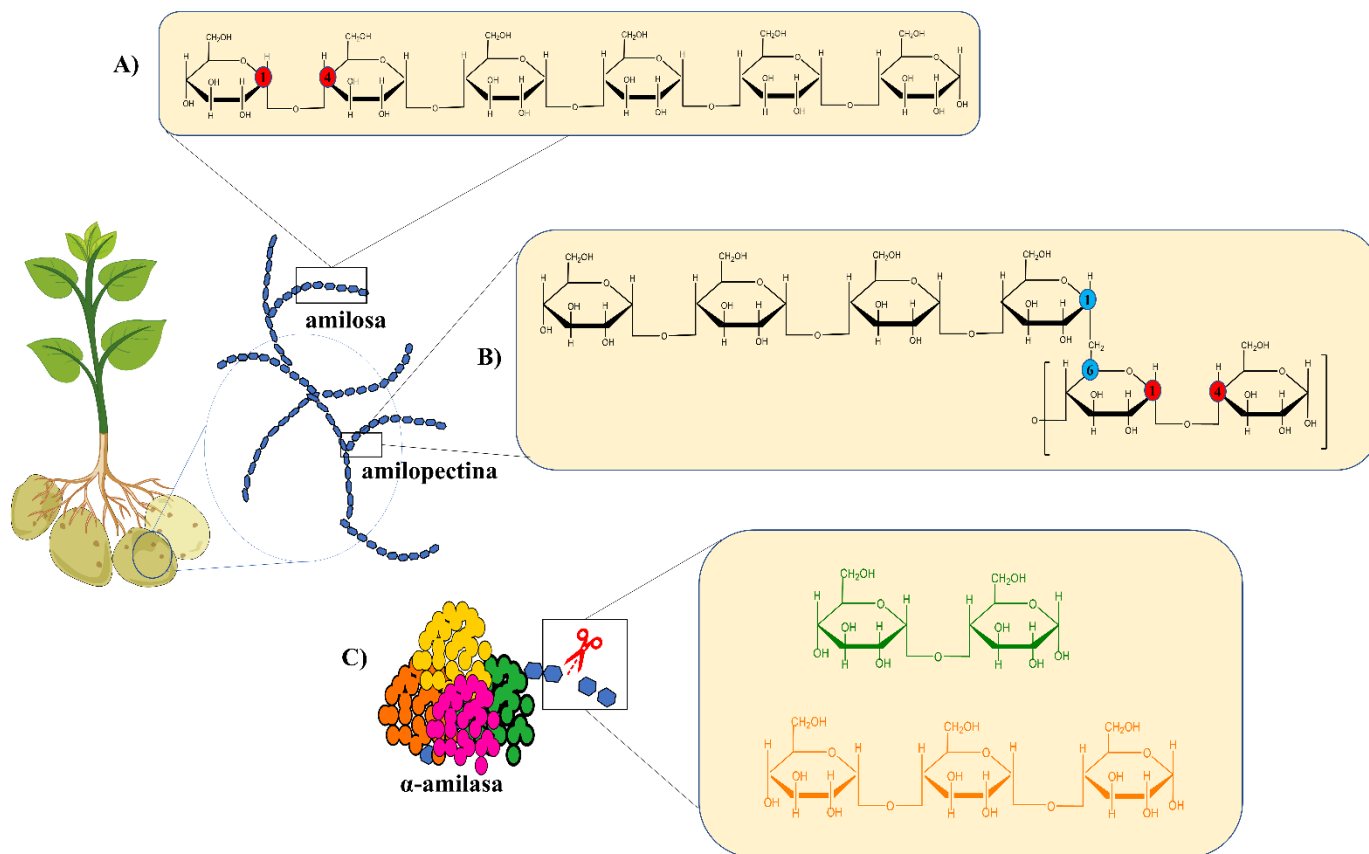


Figura 1. Estructura química de los polímeros que conforman al almidón de una planta de papa (*Solanum tuberosum* L.). **A.** Amilosa polímero lineal helicoidal y **B.** amilopectina polímero ramificado conformados por monómeros de glucosa (negro) unidos por enlaces α -(1,4) (círculos rojos) y α -(1,6) (círculos azules), respectivamente. **C.** El almidón puede ser degradado por enzimas α -amilasas (caricatura de colores) para producir glucosa, maltosa (verde) u oligosacáridos lineales (p. eje. maltotriosa en naranja; $n=3$). (Adaptado de Pérez y Bertoft 2010 por Víctor-Carballo).

almidón a oligosacáridos cíclicos llamados ciclodextrinas (CDs), que son nanomoléculas en forma de anillo, conformadas por seis (α -CD), siete (β -CD) u ocho (γ -CD) monómeros de glucosa (Figuras 2A y 2B), a esta capacidad se le llama actividad de ciclación (Leemhuis *et al.* 2010). Las CDs adoptan una nanoestructura en forma de cono truncado, con una cavidad central hidrofóbica y una superficie exterior hidrofílica (Å^3 174-427, respectivamente) (Figuras 2B y 2C) (Jansook *et al.* 2018). Gracias a su estructura tridimensional y su naturaleza anfipática, las CDs tienen la propiedad de encapsular de forma reversible, moléculas huésped no polares (p. ej., moléculas orgánicas, inorgánicas o biológicas), formando complejos de inclusión para aumentar la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad de la molécula

huésped (Jansook *et al.* 2018) (Figura 2D). Estas propiedades han hecho de las CDs moléculas atractivas para las industrias biotecnológicas (Duchene y Bochot 2016). Sin embargo, dada la relación con las α -amilasas, las CGTasas pueden llevar a cabo otros tres tipos de reacciones que compiten con la actividad de ciclación, estas son: (i) la hidrólisis, (ii) la desproporción y (iii) el acoplamiento, durante las que se producen azúcares fermentables (glucosa y maltosa) u oligosacáridos lineales (Kelly *et al.* 2009) (Figura 3). Por lo tanto, las CGTasas con alta especificidad hacia la actividad de ciclación son ideales para la industria. La capacidad excepcional de realizar reacciones de ciclación radica en la conformación de la estructura tridimensional de las CGTasas. El arquetipo estructural de las CGTasas consta de

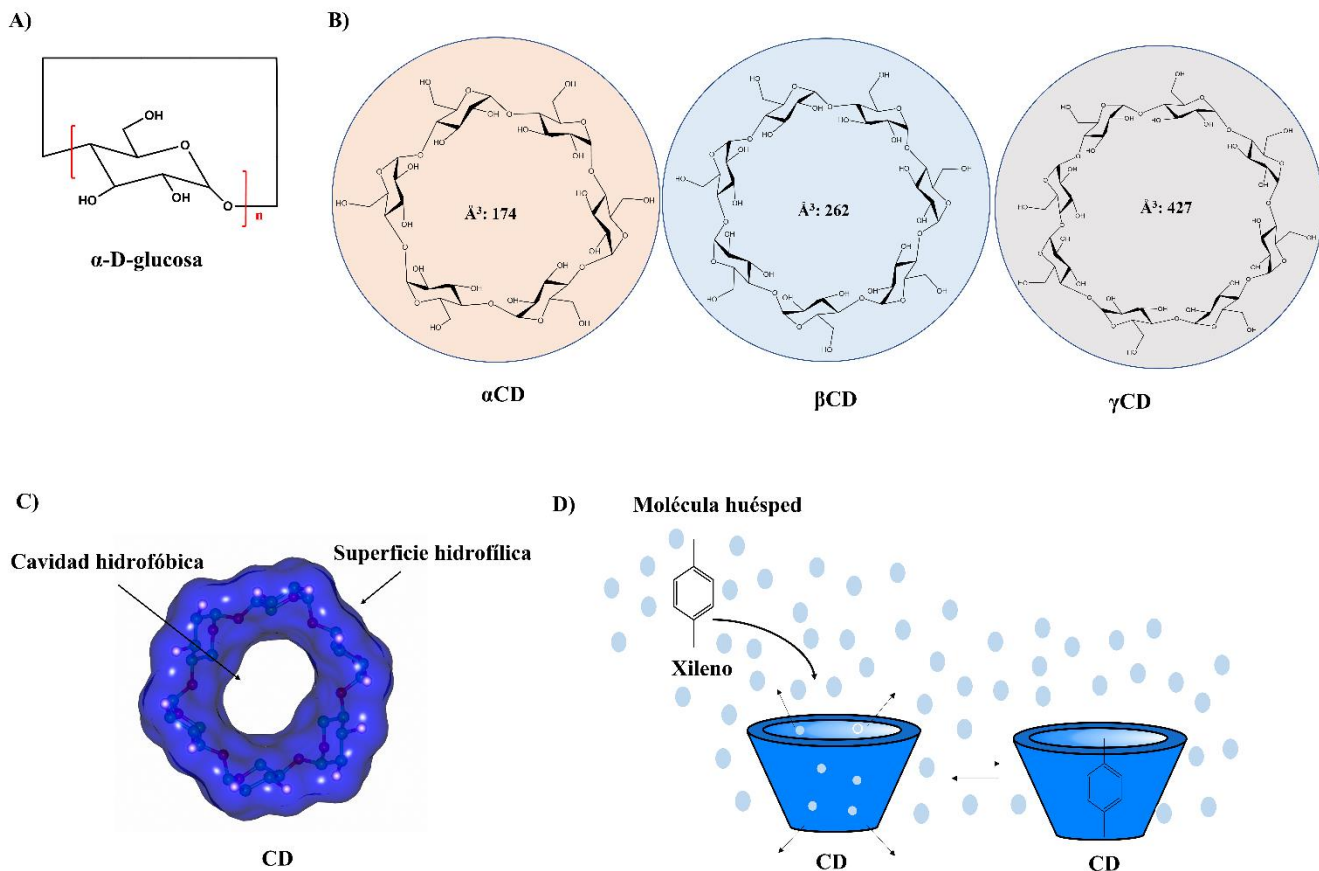


Figura 2. Estructura de las ciclodextrinas (CDs). **A.** Residuos de glucopiranososa que conforman a las CDs. **B.** Representación de la estructura de α -CD, β -CD y γ -CD con un volumen de 174 a 427 Å³. **C.** Estructura tridimensional de una CD con una superficie exterior hidrofílica y una cavidad hidrofóbica. **D.** Representación de la formación del complejo de inclusión de una molécula hidrofóbica de xileno con un CD en solución acuosa (esferas azules). (Adaptado de Jansook *et al.* 2018 por Víctor-Carballo).

cinco dominios estructurales (A-E) (Uitdehaag *et al.* 1999b) (Figura 4A), donde los dominios A y B, adoptan una topología de un barril TIM, cuyo centro activo incluye nueve subsitios (-7 al +2) que acomodan en forma de anillo parte de la cadena de sustrato almidón (Figura 4B). Entre los subsitios -1 y +1, se encuentra la triada catalítica Asp^x/Glu^y/Asp^z que se encarga de la escisión del enlace glucosídico y se encuentra altamente conservada en todas las enzimas de la familia GH13 (Uitdehaag *et al.* 1999a) (Figuras 3 y 4B). Así mismo, un residuo central aromático y una “pinza” hidrofóbica exclusivos de las CGTasas, son clave para la actividad de ciclación (Nakamura *et al.*, 1994) (Figura 4B). Además de los dominios catalíticos, las CGTasas contienen tres dominios C, D y ECBM20 en la región C-terminal, los

cuales adquieren estructura en forma de β -sándwich cada uno (Uitdehaag *et al.* 1999b). De estos tres, los dominios C y E, incluyen tres sitios de unión a maltosa (MBS por sus siglas en inglés) que dirigen la unión de la cadena del polisacárido almidón (MBS3 y MBS1-2, respectivamente) (Figura 4A) (Penninga *et al.* 1996). No obstante, se han identificado arquitecturas funcionales del tipo ABC-E para CGTasas de bacterias Gram negativa (G-) (Janeček *et al.* 2003), así como algunas CGTasas de Arqueas que carecen del dominio E, el cual es reemplazado por un dominio de estructura y función desconocida denominado E_{Arq} (Rashid *et al.* 2002) (Figura 4C).

Dado que el principal interés de las CGTasas es a nivel industrial, no se ha discutido a fondo el papel ecológico y el propósito fisiológico de las CDs en los

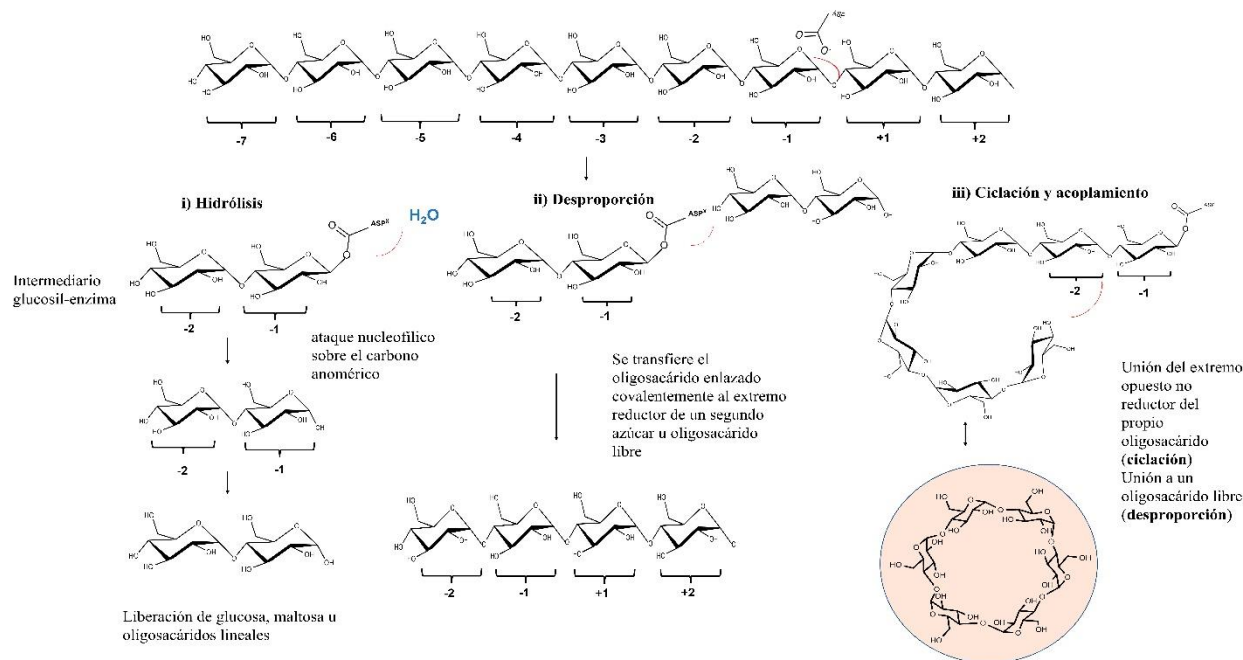


Figura 3. Reacciones catalizadas por las CGTasas. El primer paso es el rompimiento del enlace mediante un ataque nucleofílico para dar paso a la formación del intermediario glucosilo-enzima, posteriormente el oligosacárido se transfiere hacia el aceptor, lo cual determinará la especificidad de la enzima: i) actividad de hidrólisis cuando el aceptor es una molécula de agua, ii) actividad de desproporción cuando el aceptor es otro oligosacárido lineal iii) actividad de ciclación cuando el aceptor es el extremo opuesto del propio oligosacárido y actividad de acoplamiento cuando el sustrato es la propia ciclodextrina y el aceptor es otro oligosacárido lineal. Adaptado de Kelly *et al.* 2009 por Víctor-Carballo.

microbiomas. Sin embargo, es posible deducir que su importancia radica en la capacidad de formar complejos de inclusión y a su termoresistencia, lo que las hace particularmente útiles para sobrevivir en ambientes extremófilos para transportar moléculas antimicrobianas, mitigar la toxicidad de sustratos, así como asegurar la disponibilidad de carbono en comunidades microbianas (Bardi *et al.* 2000, Shishido *et al.* 2015). A pesar de que los procesos industriales exigen CGTasas termoresistentes y que su estudio representa una oportunidad para ampliar el conocimiento sobre su papel en la supervivencia de microorganismos extremófilos, poco se ha explorado sobre la diversidad de estos biocatalizadores. De hecho, de las 48 CGTasas caracterizadas y reconocidas por la base de datos *Carbohydrate-Active Enzyme Database* (CAZy), el 75 % pertenecen a bacterias mesófilas de la clase Bacilli y solo cuatro de ellas pertenecen al dominio de las Arqueas. A pesar de que las propiedades reológicas del almidón exigen

CGTasas extremófilas para procesos industriales, solo 7 son termoresistentes (>80°C) o halófilas.

Con el advenimiento de la metagenómica y la minería de datos, el grupo de investigación del Laboratorio de Biología Sintética, Estructural y Molecular de la Universidad de Colima, realizó un análisis en ~130 metagenomas de ambientes extremófilos, centrando la atención en nuevas CGTasas. La búsqueda llevó a detectar 19 CGTasas inéditas relacionadas con bacterias de la clase Thermoanaerobacterales, presentes en nichos hipertermofílicos (> 80°C) (Lee *et al.* 2013, Sant’Anna *et al.* 2015). La caracterización funcional de una de ellas, denominada como CldA, mostró una actividad máxima en un rango termoacidofílico (pH 4.0 y 80 °C) con una notable diversificación de productos que produjo una mezcla de α:β:γ-CD (34:62:4) a partir de almidón soluble, así como dextrinas lineales (G3-G7) y azúcares fermentables como principales productos (Centeno-Leija *et al.* 2022). Lo más interesante, es

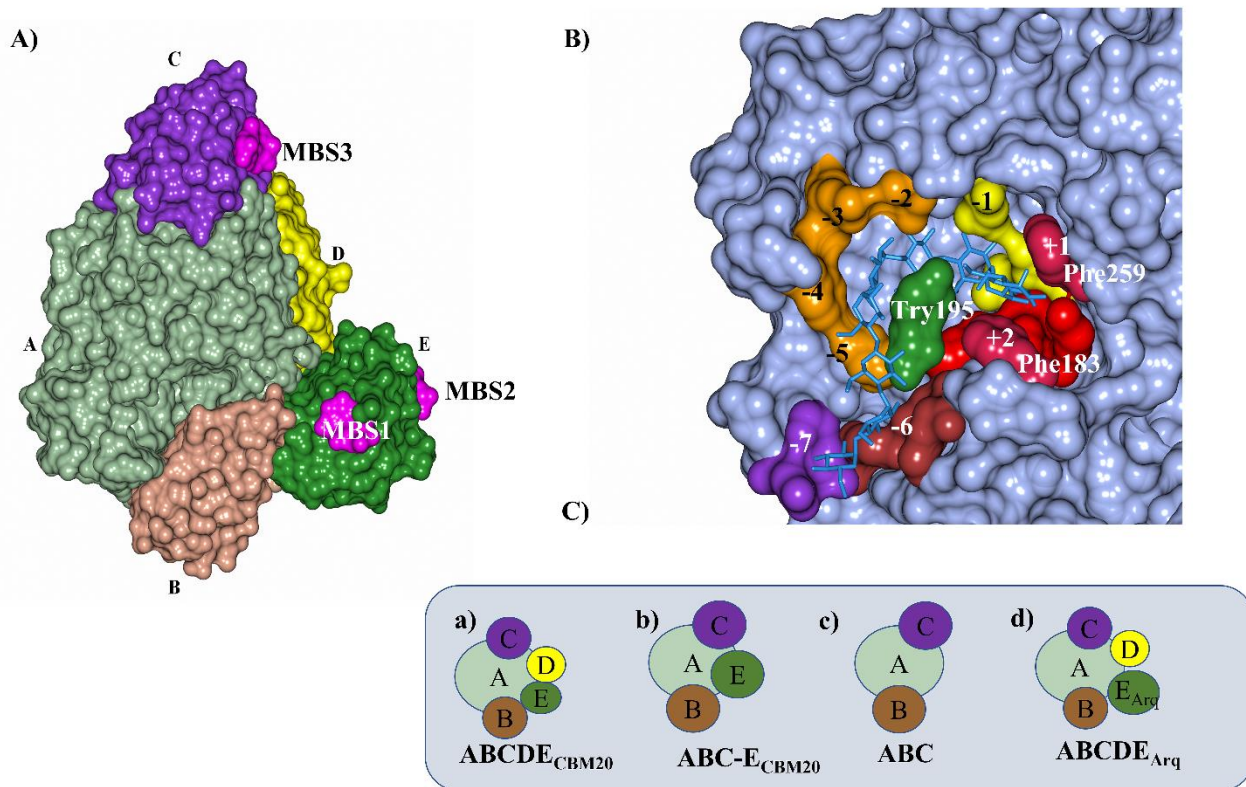


Figura 4. Detalles estructurales de las CGTasas. **A.** Estructura cristalográfica de la CGTasa de *B. circulans* 251 (Código PDB 1CDG) con 5 dominios estructurales A (verde marino), B (café), C (morado), D (amarillo) y E (verde forest); el color magenta corresponden a moléculas de maltosa unidos a los sitios de unión a maltosa (MBS1-MBS3); **B.** Sustrato maltonosa (azul) unido a los nueve subsitios (-7 al +2) del sitio activo de la CGTasa de *B. circulans* 251, se observa el residuo aromático central Try195 (color verde), y los 2 sitios que conforman la pinza hidrofóbica Phe259 y Phe183 (color rojo carmesí) determinantes en la actividad de ciclación (Código PDB 1CXK; adaptada de Leemhuis *et al.* (2010) por Victor-Carballo); **C.** Esquema representativo sobre la diversidad estructural de las CGTasas. **a)** Arquitectura típica de 5 dominios de CGTasas; **b)** CGTasas de 4 dominios que carecen del dominio estructural D; **c)** CGTasa con una arquitectura global de 3 dominios encontrada en Thermoanaerobacterales; **d)** CGTasas de arqueas de 5 dominios, en el que el dominio C-terminal denominado EArq posee una estructura y función desconocidos. (Adaptada de Centeno-Leija *et al.* 2022 por Victor-Carballo).

que las 19 CGTasas poseen una arquitectura excepcional de solo tres dominios ABC (Figura 4C) y se agrupan en un nuevo clado monofilético dentro de las CGTasas, revelando que estas enzimas representan a un grupo inédito de CGTasas extremófilas con una estructura mínima funcional sin precedente (Centeno-Leija *et al.* 2022).

Adicionalmente, el equipo de trabajo realizó un análisis de genómica comparativa de la vecindad génica de los genes que codifican para estas nuevas CGTasas en las genomas de Thermoanaerobacterales. Con este análisis, fue posible elucidar el papel de estas nuevas CGTasas termoacidófilas en el metabolismo de los géneros *Caldanaerobacter subterraneus*

ssp., *Thermoanaerobacter spp.* y *Thermoanaerobacterium spp.*, en el que la formación de CDs, constituye el primer paso de una ruta muy inusual denominada Metabolismo de Carbohidratos *via* CDs (MC-CD). De acuerdo con el análisis, la ruta puede ser resumida en cuatro pasos: (i) síntesis, (ii) transporte, (iii) degradación y (iv) asimilación metabólica de CDs (Figura 5). Inicialmente, las CGTasas extracelulares segregadas por el microorganismo, transforman al almidón en CDs, oligosacáridos lineales y azúcares fermentables que sirven a la célula ya sea como sustrato, o como moléculas funcionales para sobrevivir en ambientes extremófilos. La etapa de transporte consiste en la internalización de las CDs

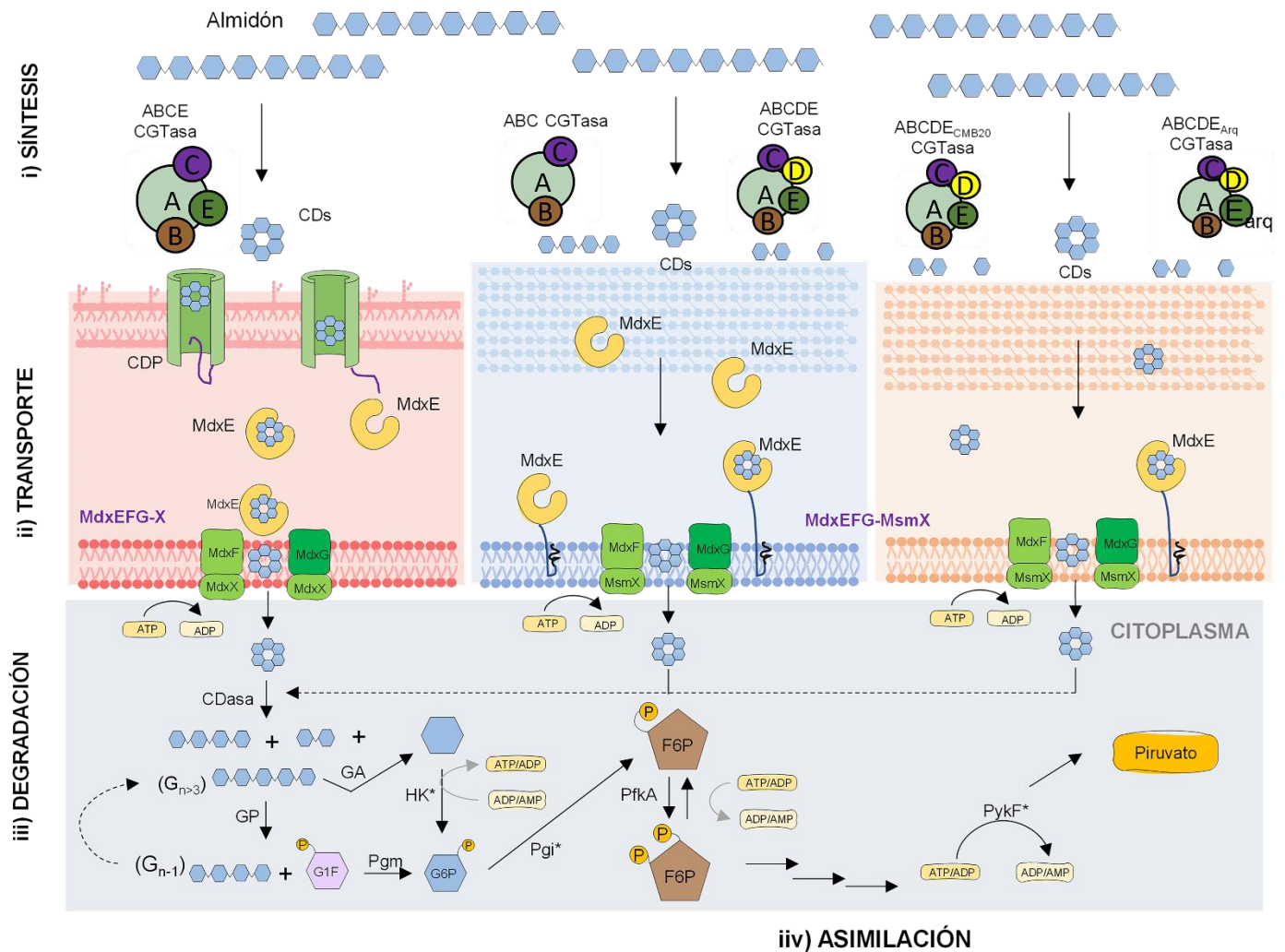


Figura. 5 Ruta MC-CD para bacterias G- (rojo), G+ (azul) y arqueas (naranja). (i) Síntesis, primer paso de la ruta se observan a las CGTasas representadas en sus diferentes distribuciones multidominio. (ii) Transporte, la internalización de las dextrinas al periplasma mediante un ciclo/dextrin-porina CDP en G⁻, o un mecanismo desconocido en G⁺. Los ciclo/dextrinas son posteriormente transportadas al citoplasma por el transportador ABC MdxEFG-(X/MsmX). (iii) Degradación de las dextrinas por acción de la ciclodextrinasa CDasa, glucofosforilasa GP y glucoamilasa GA. (iv) Asimilación metabólica: que incluye a las enzimas: fosfoglucomutasa Pgm, hexoquinasa HK, 6-fosfofructoquinasa PfkA, Piruvato quinasa PykF. (Adaptado de Centeno-Leija *et al.* 2022 por Romero-Jiménez).

hacia el periplasma mediada por una porina en bacterias G⁻ o mediante un mecanismo desconocido en bacterias G⁺ (Figura 5). Las CDs alojadas en el periplasma son captadas por una proteína de unión a carbohidratos (MdxE) que las “entrega” a un sistema de transporte de cuatro componentes llamado MdxFG-Msm² (transporte ABC tipo I), que se encuentra incrustado en la membrana celular interna y que gracias al suministro energético de ATP, forma un canal transmembranal que permite la translocación

de las CDs al citoplasma (Figura 5) (Thomas y Tampé 2020; Centeno-Leija *et al.* 2022). Una vez en el citoplasma, inicia la tercera y cuarta etapa, donde las CDs son degradadas por enzimas ciclodextrinasas y glucoamilasas para dar lugar a azúcares simples, que serán eventualmente incorporados a rutas de glucólisis para ser asimilados como nutrientes (Figura 5) (Oslowski *et al.*, 2011, Centeno-Leija *et al.* 2022). Este análisis, reveló por primera vez la ruta MC-CD en bacterias hipertermófilas, lo que contri-

buye al entendimiento de los mecanismos que rigen la supervivencia de bacterias presentes en ambientes extremófilos.

El análisis anterior, deja claro que aún queda mucho por descubrir en el mundo de las enzimas que transforman almidón y que la minería de (meta)-genomas de ambientes extremófilos, resulta una plataforma idónea para rastrearlas. Lo anterior no solo es útil para ampliar el conocimiento sobre la fisiología de microorganismos presentes en microbiomas inexplorados, sino que además permite obtener biocatalizadores atractivos para la industria, y abre la oportunidad de conocer más sobre su estructura y mecanismos funcionales.

Referencias

- Bardi L., Mattei A., Steffan S. y Marzona M. 2000.** Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme and Microbial technology* 27(9): 709–713. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00275-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00275-1)
- Centeno-Leija S., Espinosa-Barrera L., Velazquez-Cruz B., Cárdenas-Conejo Y., Virgen-Ortíz R., Valencia-Cruz G., Saenz R.A., Marín-Tovar Y., Gómez-Manzo S., Hernández-Ochoa B., Rocha-Ramírez L.M., Zatarain-Palacios R., Osuna-Castro J.A., López-Munguía A. y Serrano-Posada H. 2022.** Mining for novel cyclomaltodextrin glucanotransferases unravels the carbohydrate metabolism pathway via cyclodextrins in Thermoanaerobacterales. *Scientific Reports* 12(1): 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04569-x>
- Duchene D. y Bochot A. 2016.** Thirty years with cyclodextrins. *International journal of pharmaceuticals* 514(1): 58-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.030>
- Hashimoto Y., Yamamoto T., Fujiwara S., Takagi M. y Imanaka T. 2001.** Extracellular synthesis, specific recognition, and intracellular degradation of cyclomaltodextrins by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain B1001. *Journal of Bacteriology* 183(17): 5050–5057. <https://doi.org/10.1128/JB.183.17.5050-5057.2001>
- Janeček Š., Svensson B., y MacGregor E.A. 2003.** Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the α -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. *European Journal of Biochemistry* 270(4): 635–645. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03404.x>
- Jansook P., Ogawa N. y Loftsson T. 2018.** Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics* 535(1–2): 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.018>
- Kelly R.M., Dijkhuizen L. y Leemhuis H. 2009.** The evolution of cyclodextrin glucanotransferase product specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84(1): 119–133. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1988-6>
- Lee S.J., Lee Y.J., Park G.S., Kim B.C., Lee S.J., Shin J.H. y Lee D.W. 2013.** Draft genome sequence of an anaerobic and extremophilic bacterium, *Caldanaerobacter yonseiensis*, isolated from a geothermal hot stream. *Genome announcements* 1(6): e00923-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00923-13>
- Leemhuis H., Kelly R.M. y Dijkhuizen L. 2010.** Engineering of cyclodextrin glucanotransferases and the impact for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(4): 823–835. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2221-3>
- Lloyd J.R. y Kossmann J. 2019.** Starch trek: the search for yield. *Frontiers in Plant Science*, (9): 1930. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01930>
- Osowski D.M., Jung J.H., Seo D.H., Park C.S. y Holden J.F. 2011.** Production of hydrogen from α -1, 4-and β -1, 4-linked saccharides by marine hyperthermophilic Archaea. *Applied and environmental microbiology* 77(10): 3169–3173. <https://doi.org/10.1128/AEM.01366-10>
- Paul J.S., Gupta N., Beliya E., Tiwari S. y Jadhav S.K. 2021.** Aspects and recent trends in microbial α -amylase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 193(8): 2649–2698. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03546-4>
- Penninga D., van der Veen B.A., Knegt R.M., van Hijum S.A., Rozeboom H.J., Kalk K.H. y Dijkhuizen L. 1996.** The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from

- Bacillus circulans* strain 251. *Journal of Biological Chemistry* 271(51): 32777–32784. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.32777>
- Pérez S. y Bertoft E. 2010.** The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch-Stärke* 62(8): 389–420. <https://doi.org/10.1002/star.201000013>
- Rashid N., Cornista J., Ezaki S., Fukui T., Atomi H. y Imanaka T. 2002.** Characterization of an archaeal cyclodextrin glucanotransferase with a novel C-terminal domain. *Journal of Bacteriology*, 184(3): 777–784. <https://doi.org/10.1128/JB.184.3.777-784.2002>
- Sant'Anna F.H., Lebedinsky A.V., Sokolova T.G., Robb F.T. y Gonzalez J.M. 2015.** Analysis of three genomes within the thermophilic bacterial species *Caldanaerobacter subterraneus* with a focus on carbon monoxide dehydrogenase evolution and hydrolase diversity. *BMC genomics* 16(1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1955-9>
- Shishido T.K., Jokela J., Kolehmainen C.T., Fewer D.P., Wahlsten M., Wang H., Rouhiainen L., Rizzi E., Bellis G., Permi P. y Sivonen K. 2015.** Antifungal activity improved by coproduction of cyclodextrins and anabaenolysins in Cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(44): 13669–13674. <https://doi.org/10.1073/pnas.151043211>
- Thomas C. y Tampé R. 2020.** Structural and mechanistic principles of ABC transporters. *Annual review of biochemistry* 89: 605–636. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-105201>
- Uitdehaag J., Mosi R., Kalk K.H., van der Veen B.A., Dijkhuizen L., Withers S.G. y Dijkstra B.W. 1999a.** X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nature structural biology* 6(5): 432–436. <https://doi.org/10.1038/8235>
- Uitdehaag J.C.M., Kalk K.H., van der Veen B.A., Dijkhuizen L. y Dijkstra B.W. 1999b.** The cyclization mechanism of cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) as revealed by a γ -cyclodextrin-CGTase complex at 1.8-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* 274(49): 34868–34876. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34868>

Desde el Herbario CICY, 14: 218–225 (13-octubre-2022), es una publicación semanal editada por el Herbario CICY del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., con oficinas en Calle 43 x 32 y 34 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México. Tel. 52 (999) 942-8330 Ext. 110, www.cicy.mx/Sitios/Desde_Herbario/, webmas@cicy.mx. Editores responsables: Rodrigo Duno de Stefano, Diego Angulo y Lilia Lorena Can Itzá. Reserva de Derechos al Título Exclusivo No. 04-2016-041413195700-203, otorgado por el Instituto Nacional del Derecho de Autor, ISSN: 2395-8790. Responsable de la publicación: José Fernely Aguilar Cruz, Calle 43 x 32 y 34 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México. Fecha de última modificación: 13 de octubre de 2022. Las opiniones expuestas por los autores no necesariamente expresan la postura del editor de la publicación. De la misma manera, la responsabilidad sobre la veracidad y la precisión de los contenidos, le corresponde totalmente a los autores de los ensayos.