

## Estructura y Función de los Dominios de Fijación al Almidón

Benjamín García Ramírez, Paola Aguilera Ruiz, Ricardo Castro Hernández y  
Romina Rodríguez Sanoja\*

*Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones  
Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510  
E-mail: romina@biomedicas.unam.mx*

### RESUMEN

Los polisacáridos insolubles como el almidón pueden ser hidrolizados por un importante número de enzimas, que usualmente comprenden un dominio catalítico y uno o varios módulos no catalíticos que permiten la interacción de la enzima en solución con el sustrato insoluble. Estos módulos son dominios funcionales conocidos como módulos de unión al carbohidrato (CBM) o específicamente como dominios de fijación al almidón (DFA). Los DFA han sido clasificados hasta el momento en nueve familias por la similitud en sus secuencias, la familia CBM20 fue la primera en identificarse y es por mucho la mejor caracterizada. El dominio de fijación al almidón promueve la unión al sustrato, incrementando la concentración del polisacárido en la proximidad del sitio catalítico, además se ha reportado que en algunos casos el DFA desestabiliza la superficie del almidón favoreciendo la hidrólisis. La estructura de estos dominios en barril beta distorsionado, es muy conservada, a pesar de lo cual, se pueden encontrar dos diferentes formas de interactuar con el sustrato, a través de uno o dos sitios de unión. En esta revisión se resumen las principales características funcionales y estructurales de los dominios de fijación al almidón.

**Palabras clave:** *dominios de fijación al almidón, módulos de unión a carbohidrato, amilasas, almidón*

### ABSTRACT

Insoluble polysaccharides such as starch can be hydrolyzed by several enzymes usually constituted by a catalytic module, linked to one or more non-catalytic modules that allow the interaction of the enzyme in solution with the insoluble substrate. These modules are functional domains named as carbohydrate binding modules or specifically starch binding domains. Until now, these starch-binding modules are classified into nine families on the basis of their amino acid sequence similarities; CBM20 is the earliest-assigned and best characterized family. Such binding domains promote attachment to the substrate and increase its concentration at the active site of the enzyme. In some cases, it has been reported a disruptive function on the surface of the starch granule that forward the hydrolysis. Structures of starch-binding domains, distorted beta-barrel is highly conserved, nevertheless, there are two different ways to interact with the substrate, though

one or two binding sites. This review summarizes the main structural and functional features of starch binding domains.

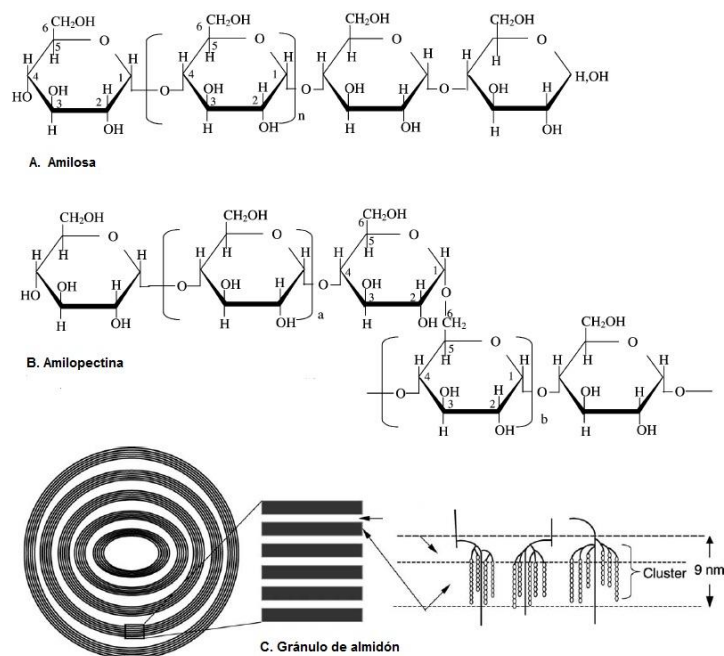
**Key words:** starch-binding domain, carbohydrate-binding modules, amylases, starch

## INTRODUCCIÓN

El almidón es probablemente el polisacárido más ampliamente utilizado por el hombre; su empleo se ha visto favorecido por su abundancia en la naturaleza ya que gran variedad de organismos, sobre todo vegetales, lo emplean como reserva de energía química. El ser humano aprovecha esta abundancia como fuente de energía en los alimentos y como materia prima en industrias como la alimentaria, farmacéutica, textil, papel, pegamentos, endulzantes y etanol, entre muchas otras.

El almidón es un polímero de glucosa que se encuentra en forma de pequeños gránulos densos, cuyo tamaño y morfología varía

dependiendo de su origen. Este polímero está constituido por amilosa, un polisacárido de glucosa unida por enlaces  $\alpha(1,4)$  que forman una estructura lineal y por la amilopectina, que tiene una estructura ramificada con las cadenas de glucosas unidas por enlaces  $\alpha(1,4)$  y ramificaciones en  $\alpha(1,6)$ . La longitud de estos polisacáridos varía en función de su origen, ya que pueden estar formados por cadenas de algunos cientos de glucosas o por extensas cadenas de varios miles (BeMiller & Whistler, 2009). En el gránulo de almidón la amilopectina y la amilosa se organizan en capas alternas semicristalinas y amorfas que forman anillos radiales de crecimiento (Fig. 1).



**Fig. 1.** A. Estructura de la amilosa, polímero de glucosa unida por enlaces  $\alpha(1-4)$ . B. Estructura de la amilopectina, cadenas de glucosas unidas con enlaces  $\alpha(1-4)$  y ramificaciones con enlaces  $\alpha(1-6)$ . C. Estructura interna del gránulo de almidón (Modificado de Tester *et al.*, 2004).

## AMILASAS Y DOMINIOS DE UNIÓN AL ALMIDÓN

Las enzimas capaces de hidrolizar el almidón incluyen una gran variedad de actividades ( $\alpha$ -amilasas,  $\beta$ -amilasas, glucoamilasas, ciclodextrin-transferasas, maltodextrin-glucoanotransferasas, etc.), las más importantes, se encuentran agrupadas en la superfamilia de las  $\alpha$ -amilasas o el Clan GH-H; de acuerdo a la clasificación actualmente aceptada que refleja el principio general que indica que la evolución conserva mejor la estructura proteica, que la secuencia aminoácida. El clan GH-H comprende a las familias GH-13 (glucósidohidrolasas, glucotransferasas e isomerasas), GH-70 (glucansacarasas) y GH-77 (glucoanotransferasas) (Cantarel *et al.*, 2009).

Todas las enzimas del clan GH-H poseen un dominio catalítico con la misma estructura tridimensional, un barril  $(\beta/\alpha)_8$ . Algunas de estas enzimas poseen además, dominios auxiliares no catalíticos conocidos en general como módulos de unión a carbohidratos (CBM por sus siglas en inglés) y en particular como dominios de fijación al almidón (DFA). Estos módulos permiten la unión del almidón insoluble con la enzima en solución, incrementando la concentración efectiva de la enzima en la superficie del polisacárido, lo que permite la actividad enzimática (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005). También se ha observado en algunos casos la desestabilización de las moléculas de amilosa al inducir cambios conformacionales en su estructura helicoidal (Southall *et al.*, 1999; Giardina *et al.*, 2001).

Los módulos de unión a carbohidratos, se definen como una secuencia de aminoácidos contenida dentro de una enzima o proteína con actividad sobre azúcares o capaz de interactuar con ellos, que tiene un plegamiento discreto y actividad de unión a carbohidratos. Estos módulos tienen como función principal incrementar la eficiencia catalítica de las enzimas con los sustratos solubles y/o insolubles (Cantarel *et al.*, 2009).

Los DFA se unen sobre los gránulos de almidón por adsorción directa, no covalente, gracias a las interacciones que son capaces de establecer los residuos de aminoácidos sobre este tipo de superficies. Las principales interacciones que establecen estos módulos son puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Se ha visto que la delección de este dominio reduce e incluso nulifica la actividad de las enzimas sobre sustratos insolubles (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000). De forma contraria la inserción de este dominio ha aumentado la actividad de algunas enzimas (Juge *et al.*, 2002).

No se conoce con exactitud la razón por la que el DFA está presente en algunas de las enzimas amilolíticas y ausente en otras. Janecek & Sevcik (1999), analizaron 42 DFA procedentes de las familias GH13, GH14 y GH15 de las glucósidohidrolasas. Ellos demostraron que las secuencias de los dominios de fijación de las enzimas amilolíticas tienen más relación con su origen filogenético (fúngico o bacteriano) que con su origen funcional, concluyendo que las tres familias amilolíticas (13, 14, 15) reflejan más la evolución de las especies que la evolución de las amilasas individualmente.

## CLASIFICACIÓN

Los módulos de unión a carbohidratos inicialmente clasificados, correspondían a dominios de unión a celulosa (CBD por sus siglas en inglés: Cellulose-Binding Domain), debido a que los primeros módulos que se descubrieron se unían solo a celulosa. Sin embargo, conforme se descubrieron más módulos con la capacidad de unir diferentes carbohidratos, fue necesario hacer una reclasificación. Se les asignó entonces como nombre general CBM (por sus siglas en inglés, Carbohydrate-Binding Module) con el número de familia; éste número se da por orden de descubrimiento, es decir, cada que aparece una nueva familia se incrementa el número (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005). Esta base de datos se actualiza diariamente, actualmente (julio 2012) existen reportes de 25869 módulos agrupados en 64 familias y 109 módulos que aun no se han clasificado (<http://www.cazy.org>).

La clasificación de los CBM se realizó inicialmente de acuerdo a la similitud en su estructura primaria. Actualmente la clasificación en familias permite la identificación por secuencia de nuevas familias, en algunos casos predice la especificidad de unión del dominio, ayuda a identificar dominios funcionales, a predecir plegamiento y permite establecer relaciones evolutivas (Cantarel *et al.*, 2009).

Los módulos que tienen la capacidad de unirse al almidón se encuentran distribuidos

tanto en bacteria, archaea como en eukarya. Han sido clasificados dentro de las familias CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34, CBM41, CBM45, CBM48 y CBM53. Estos módulos pueden encontrarse de forma individual o formando tándems con miembros de la misma familia o de diferentes familias. Se han demostrado que la presencia de varios módulos, puede incrementar las constantes de unión, creando un efecto de avididad (Fig. 2) (Guillén *et al.*, 2007; Boraston *et al.*, 2006).

La base de datos cazy (Carbohydrate Active enZYmes- <http://www.cazy.org>) reporta todas las secuencias de DFA conocidas (la mayoría putativas), predice la capacidad de unión de los DFA a diferentes sustratos y muestra el número de ocasiones que esta capacidad ha sido demostrada. Los sustratos diferentes al almidón a los que se pueden unir los DFA en su mayoría son productos de degradación del mismo, o bien con estructuras muy semejantes. Por ejemplo, además del almidón, algunos módulos como los de la familia CBM41 se unen a  $\alpha$ -glucanos como amilosa, amilopectina, pululano y fragmentos derivados de estos polisacáridos. Otros módulos como CBM20 y CBM26 se unen a  $\beta$ -ciclodextrina. Cabe resaltar que la familia CBM48 se une a glucógeno, molécula muy semejante a la amilopectina pero con mayor grado de ramificación, lo que sugiere que los miembros de esta familia pueden unir al almidón.

# Artículos

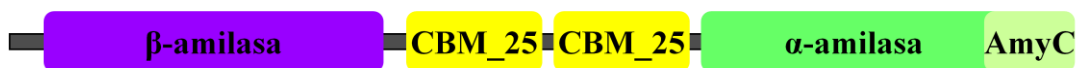
Glucoamilasa de *Aspergillus niger* X00712gb



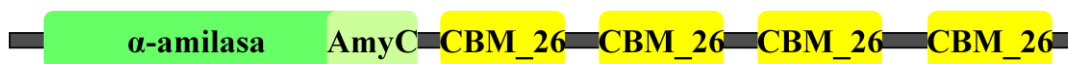
Glucoamilasa de *Rhizopus oryzae* D00049gb



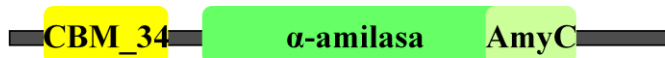
$\alpha$ , $\beta$ -amilasa de *Paenibacillus polymyxa* P21543gb



$\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus manihotivorans* AF126051gb



$\alpha$ -amilasa de *Thermoactinomyces vulgaris* D13177gb



Pululanasa de *Thermotoga maritima* AE001821gb



**Fig. 2.** Diferentes arquitecturas de las enzimas amilolíticas. En la figura se representan 6 de las 9 familias de dominios de fijación al almidón (CBM20, CBM21, CBM25, CBM26, CBM34 y CBM41) Los DFA se identifican en amarillo. Los dominios catalíticos de glucoamilasas en rojo, de  $\beta$ -amilasas en morado, de  $\alpha$ -amilasas en verde y de pululanasa en café. Cada enzima está identificada con su número de acceso al GenBank (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005).

## **TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS**

Para el estudio de la estructura de los CBMs se han utilizado diferentes técnicas. La cristalización de proteínas y su subsecuente análisis por difracción de rayos X es una de las técnicas más frecuentemente empleada para la resolución de estructuras tridimensionales (Sun, 2004). También, existen técnicas que permiten el análisis de biomoléculas en solución, a pH fisiológico o en condiciones que prácticamente igualan su ambiente natural. Ejemplos de estas técnicas son la resonancia magnética nuclear (RMN) y la calorimetría por titulación isotérmica (ITC) (Rico, 2010; Jelesarov, 1999).

En la cristalografía de rayos X se miden principalmente los espacios entre los átomos y la intensidad de la difracción del haz de luz. Un haz de rayos X presenta una longitud de onda entre 0.01 y 5nm lo cual permite que al irradiar una muestra, los electrones de los átomos que la conforman difracten los rayos, que posteriormente pueden captarse en una película fotográfica. Cuando tenemos una muestra en su forma cristalina podemos pensar que en realidad tenemos repeticiones periódicas de un arreglo molecular. Los espacios en los que no ocurre difracción nos dan información acerca del patrón que sigue el arreglo cristalino, la intensidad de las difracciones dan más información acerca de la estructura del cristal. A través de un análisis computacional se puede deducir la posición de los electrones y, posteriormente,

la posición de los átomos a los que pertenecen. Su realización depende de que pueda obtenerse un cristal de la muestra a analizar, lo cual es prácticamente el paso limitante en esta técnica. Los análisis realizados desde 1960 a proteínas como la mioglobina o al DNA fundamentaron esta técnica y remarcaron su funcionalidad e importancia para la resolución de estructuras tridimensionales (Sun, 2004).

Muchos de los estudios sobre la interacción ligando-proteína han sido llevados a cabo utilizando Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La técnica utiliza las propiedades magnéticas que tienen los núcleos atómicos. Cuando se hace incidir un campo magnético fuerte ciertos núcleos presentan resonancia a frecuencias características, las variaciones en esta frecuencia resonante aportan la información acerca de la estructura molecular donde el átomo se encuentra. Dicho de otra forma, los núcleos atómicos poseen un espín, una propiedad de las partículas que componen a los átomos. Al momento de introducir un campo magnético a átomos con espín nuclear, el núcleo se comporta como un pequeño imán y tiende a orientarse, preferentemente, a favor del campo magnético. Si se aplica energía que obligue a los núcleos a invertir el sentido de su orientación con respecto al campo magnético, se dice que el sistema está en resonancia. A este fenómeno de excitación de los espines nucleares se le conoce como

resonancia magnética nuclear (Del Río, 2003; Jacobsen, 2007).

## **ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS DOMINIOS DE FIJACIÓN AL ALMIDÓN**

Una característica compartida por los CBM es la conformación en barril beta distorsionado (beta sándwich), con un número variable de láminas beta (Abe *et al.*, 2004). El tipo de unión es también una característica conservada en los miembros de las familias de proteínas que unen almidón y depende, principalmente, de la interacción hidrofóbica de residuos aromáticos (particularmente tirosinas y triptófanos) con los anillos piranosa del almidón (Boraston *et al.*, 2004). Algunas familias de CBMs se distinguen por la presencia de dos sitios de unión funcionales, que participan en la interacción con el almidón y permiten que se altere la estructura de los gránulos de almidón. Los DFA de algunas familias como la CBM20 y CBM34 presentan estos dos sitios de unión, mientras que el resto de las familias conocidas solo tienen uno (Abe *et al.*, 2004).

La familia más estudiada, por haber sido la primera en ser descubierta es la CBM20. A través de estudios por cristalografía de Rayos X y RMN con el DFA de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el de la CGTasa de *Bacillus circulans* (ambos CBM20) se pudo determinar la estructura de beta sándwich mencionada, formada por dos placas de láminas paralelas y antiparalelas,

que incluyen los dos sitios de unión a carbohidratos con los aminoácidos aromáticos conservados (Sorimachi *et al.*, 1997; Knegtel *et al.*, 1995). Los estudios de RMN realizados sobre el DFA de la glucoamilasa de *A. niger* confirmaron la existencia de dos sitios de unión en este DFA; los principales contactos están dados por dos tirosinas, la Tyr556 que forma un pivote fijo y la Tyr 527 que se desplaza formando un arco, llevando consigo una hebra del almidón, este desplazamiento modifica la geometría paralela del almidón y se sugiere que puede ayudar a desestabilizar la estructura (Sorimachi *et al.*, 1996). Notablemente, antes de conocer la estructura del CBM20, la presencia de dos sitios de unión ya se había deducido en estudios de calorimetría de titulación isotérmica (Sigurskjold *et al.*, 1994).

Utilizando como modelo de la familia CBM21 al CBM de la glucoamilasa de *Rhizopus oryzae* se ha observado que tanto el plegamiento como sus sitios de unión al carbohidrato son muy semejantes al de los miembros de la familia CBM20. De hecho, las similitudes estructurales y funcionales entre los miembros de las familias CBM20 y CBM21 apuntan a un origen común y a su eventual clasificación como una sola familia (Machovic *et al.*, 2005).

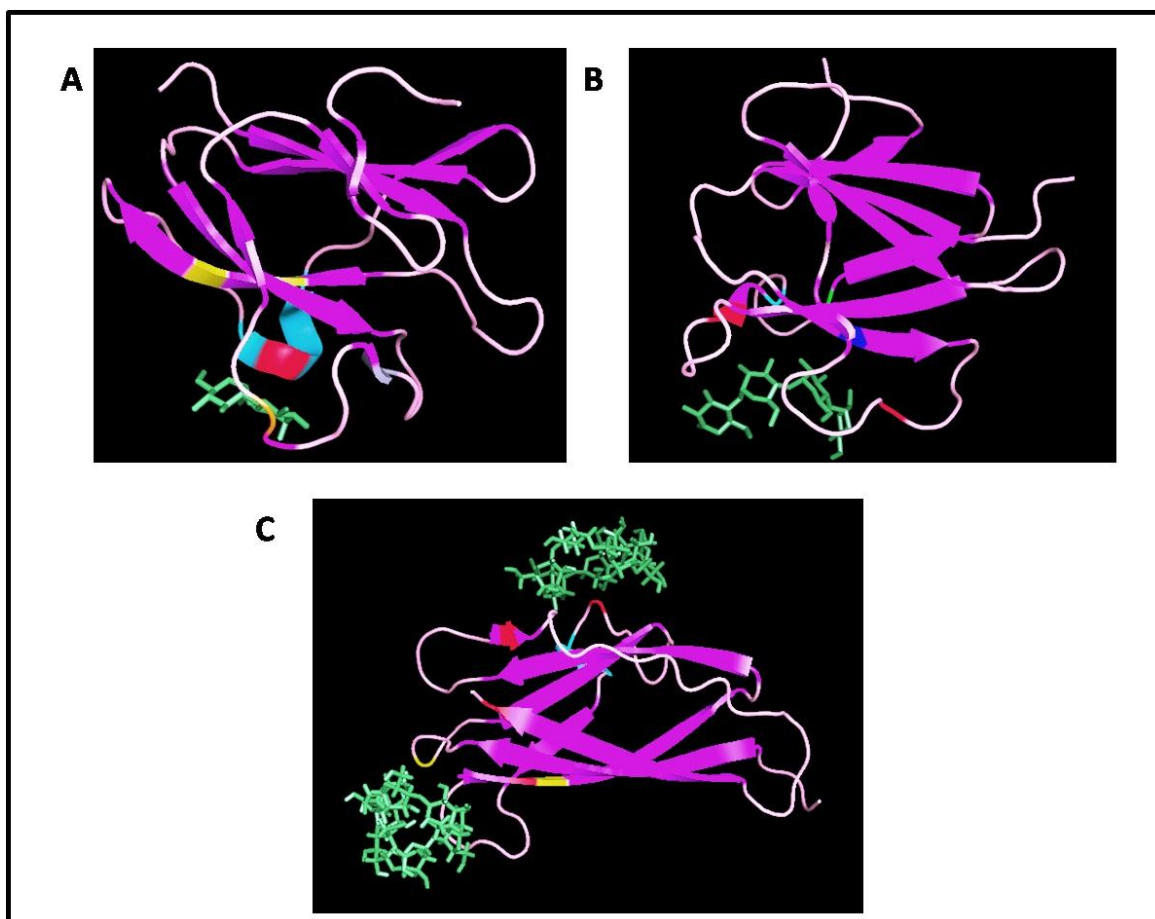
Por su parte, los CBM25 y CBM26 están estrechamente relacionados. Sus DFA tienden a presentarse en tándem, principalmente en CBM26 y comparten una estructura plegada de beta sándwich con 10

# Artículos

(CBM25) ó 9 (CBM26) láminas beta. La amilasa formadora de maltohexaosa de *Bacillus halodurans* (C-125) contiene dos DFA, uno de la familia 25 y otro de la familia 26. Se observó que ambos CBMs solo requieren de una cadena del  $\alpha$ -glucano en la hélice de amilosa para unirse fuertemente. Ninguno de estos CBM es capaz de

discriminar regiones cristalinas y no cristalinas del almidón, por lo cual la enzima sería capaz de unirse a cualquier región del gránulo de almidón maximizando su potencial de hidrólisis (Boraston *et al.*, 2006). Algunos ejemplos de las estructuras de los DFA se muestran en la figura 3.

La familia CBM34 se ha estudiado



**Fig. 3.** Estructura tridimensional del DFA, se observa la característica estructura compartida de barril beta. **A.** CBM26, **B.** CBM25, ambos de la amilasa de *Bacillus halodurans* (PDB 2C3H y 2C3W, respectivamente) obtenida por difracción de Rayos X (Boraston, *et al.*, 2006) **C.** DFA de CBM20 de la glucoamilasa de *A. niger* (PDB 1AC0), obtenida por NMR (Sorimachi, *et al.*, 1996). Los DFA se presentan interaccionando con sus correspondientes carbohidratos (en verde). Se marcan los aminoácidos esenciales para el o los sitios de unión a carbohidratos: W-rojo; T-amarillo; E-naranja; H-azul.



principalmente a través de la  $\alpha$ -amilasa de *Thermoactinomyces vulgaris*. Se determinó una estructura tridimensional muy similar a la de los CBMs mencionados (20, 21, 25 y 26), pero formado por 9 láminas beta (Kamitori *et al.*, 2002). La familia CBM41 está formada principalmente por pululanases bacterianas y su miembro mejor conocido es el DFA de la pululanasa de *Klebsiella pneumoniae*, el cual comparte el plegamiento en beta sándwich antiparalelo, con 8 láminas beta (Lammerts *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha observado en las pululanases de *K. pneumoniae* y de *Thermotoga maritima*, ambas con CBM41, que las láminas beta 2 y 3 se desplazan permitiendo la interacción de los residuos aromáticos con glucosas enlazadas en  $\alpha$ ,1-6. Muy probablemente este desplazamiento es una adaptación de los DFA encontrados en pululanases (Lammerts *et al.*, 2007).

Los DFA de la familia CBM45 se encuentran usualmente en tándem en un pequeño número de enzimas relacionadas al metabolismo del almidón, principalmente de organismos fotosintéticos. Los datos encontrados muestran que se unen con muy poca afinidad, dos órdenes de magnitud menos que los DFA de amilasas microbianas. Estos DFA de baja afinidad son encontrados básicamente en plástidos, por lo que se tiene la hipótesis de que la unión reversible al almidón a través de interacciones muy débiles facilita una regulación dinámica de las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del almidón en plantas (Glaring *et al.*, 2011).

## **FUNCIÓN DEL DFA EN LA CATÁLISIS**

Como ya se ha mencionado, la función de los CBM es aumentar la capacidad hidrolítica de la enzima incrementando la concentración de la misma en la superficie del polisacárido, al anclar la proteína y aproximar el modulo catalítico al sustrato. Se ha observado la dependencia de las enzimas a sus CBMs, pues al removerlos se provoca una reducción y, en algunos casos, la abolición total de la capacidad de unión a sustratos insolubles. Esto representa una pérdida parcial o completa de la actividad catalítica, aunque la actividad sobre los sustratos solubles no es afectada (Rodriguez-Sanoja *et al.*, 2000).

Se ha reportado que es posible que los CBM aumenten la hidrólisis de alguna forma no catalítica, lo cual ha sido causa de controversia. Existen reportes acerca de algunas celulasas de *Cellulomonas spp* cuyo CBM puede desestabilizar las microfibras de celulosa incrementando entonces la actividad del módulo catalítico. Sin embargo, también existen reportes sobre otras celulasas como las de *Pseudomonas spp*, en las que la desestabilización no ha sido observada. En el caso de los DFA la controversia es similar, por ejemplo, el DFA (CBM20) de la glucoamilasa de *A. niger* posee dos sitios de unión al almidón, se ha propuesto que el primer sitio es rígido y compacto y apila dos unidades de glucosa, mientras que el segundo es más extendido y flexible, este sitio se balancea en un arco llevando una hebra de amilosa con él. Este movimiento provoca que las fibras de amilosa se orienten de manera casi perpendicular, lo que facilita la hidrólisis del almidón; cabe aclarar que en

la superficie del gránulo de almidón las fibras se orientan de manera natural en forma paralela (Sorimachi *et al.*, 1997; Williamson *et al.*, 1997). Este hecho puede ser explicado justamente porque este DFA posee dos sitios de unión que se ligarían a dos hélices paralelas del amilosa, sin embargo no se puede generalizar el mecanismo ya que en muchos DFA solo se ha reportado un sitio de unión.

## APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

La utilización del almidón para la producción de azúcares como producto final o como sustrato de fermentación es un proceso ampliamente conocido. El proceso tradicional requiere una gran cantidad de energía para la gelatinización del almidón, lo que resulta en altos costos de producción. Por ejemplo, en el proceso convencional de procesamiento de almidón de manioca a etanol, el almidón es cocinado a 90°C o más con  $\alpha$ -amilasa. El almidón licuado es sacarificado con una glucoamilasa hasta glucosa, que es posteriormente fermentada por *Saccharomyces cerevisiae*. En la compañía Guangxi COFCO Bio-energy Co. Ltd. en Beihai, China, la harina de manioca es licuada a 105°C con la  $\alpha$ -amilasa en spray. El licor sin sacarificación es convertido en etanol haciendo actuar de manera simultánea a una glucoamilasa y a *S. cerevisiae*. Se considera que la rentabilidad del proceso se incrementaría de manera importante si se pudiera eliminar el paso de cocción (Li *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2010).

Es mucho más complicado para las enzimas amilolíticas digerir almidón crudo

que gelatinizado por el tamaño de las partículas, su insolubilidad y estructura policristalina. La búsqueda de enzimas capaces de hidrolizar el almidón crudo ha sido realizada desde hace más de 20 años, sin embargo se continúa con objetivos de hidrólisis más específicos y por supuesto con la idea de disminuir los insumos de energía y aumentar la eficiencia del sistema (Lin *et al.*, 2011). Una aplicación inmediata de los SBD es su fusión a enzimas (glucoamilasas y  $\alpha$ -amilasas) actualmente utilizadas en la industria, pero que requieren para su óptima actividad la previa gelatinización del almidón. El anclaje al almidón que el SBD permite, facilitaría la hidrólisis del almidón insoluble, evitando la necesidad de cocción y disminuyendo el gasto de energía.

Los CBM también han sido utilizados exitosamente como etiquetas de afinidad para la purificación de proteína recombinante, existen reportes sobre su uso en microarreglos proteicos y de anticuerpos que permiten imprimir las proteínas de prueba sin un paso de purificación previo. Por otro lado también se ha propuesto su uso como acarreadores de proteínas terapéuticas, antígenos y epítopes utilizando al gránulo de almidón como vehículo para la administración vía mucosas de fármacos y vacunas (Rodríguez Sanoja *et al.*, 2012).

Debido al constante descubrimiento de moléculas de unión a carbohidratos y particularmente de DFA, la lista de familias conocidas aumenta. Los estudios más recientes apuntan al diseño de DFA con

secuencias modificadas, buscando obtener estructuras que den mayor afinidad y mejor selectividad para aplicaciones específicas en la industria y la investigación. Estudios posteriores que determinen, por medio de difracción de Rayos X o RMN, las estructuras tridimensionales de las familias faltantes abrirán la puerta al entendimiento y optimización de las interacciones de unión a carbohidratos en procesos biotecnológicos.

## REFERENCIAS

- Abe A, Tonzuka T, Sakano Y & Kamitori S (2004) Complex structures of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase 1 with malto-oligosaccharides demonstrate the role of domain N acting as a starch-binding domain. *J. Mol. Biol.* 335:811-822.
- BeMiller JN & Whistler RL (2009) Starch. Food science and technology. International series. 3<sup>rd</sup> ed, Elsevier, USA.
- Boraston AB, Healey M, Klassen J, Ficko-Blean E, Lammerts van Bueren A & Law V (2006) A structural and functional analysis of alpha-glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition. *J. Biol. Chem.* 281:587-598.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V & Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucl. Ac. Res.* 37:D233-238.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CONACyT proyecto 131149, por el apoyo que otorga para el desarrollo del trabajo experimental relacionado a esta revisión. García R. B. y Aguilera R. P. reciben becas de CONACyT para el desarrollo de su tesis.

- Carbohydrate Active Enzymes database at (<http://www.cazy.org/>)
- Del Río PJF (2003) Determinación de la estructura de proteínas por resonancia magnética nuclear; Mensaje Bioquímico, Vol. XXVII, Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.
- Giardina T, Gunning AP, Juge N, Faulds CB, Furniss CSM, Svensson B, Morris VJ & Williamson G (2001) Both binding sites of the starch-binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase are essential for inducing a conformational change in amylase. *J. Mol. Biol.* 313:1149-1159.
- Glaring M, Baumann M, Abou Hachem M, Nakai H, Nakai N, Santelia D, Sigurskjold B, Zeeman SC, Blennow A & Svensson B (2011) Starch-binding domains in the CBM45 family - low-affinity domains from glucan, water dikinase and alpha-amylase involved in plastidial starch metabolism. *FEBS J.* 278:1175-1185.
- Guillén D, Santiago M, Linares L, Pérez R, Morlon J, Sánchez S & Rodríguez-Sanoja R (2007) Alpha-amylase starch binding domains: Cooperative effects of binding

- to starch granules of multiple Tandemly arranged domains, *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3833-3837.
- Jacobsen NE (2007) NMR Spectroscopy explained. Simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology. John Wiley & Sons, Inc.
- Janeček S & Ševčík J (1999) The evolution of starch-binding domain. *FEBS Lett.* 456:119-125.
- Jelesarov I & Bosshard HR (1999) Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetic of biomolecular recognition. *J. Mol. Recogn.* 12:3-18.
- Juge N, Le Gal-Coëffet MF, Furniss CSM, Gunning P, Kramhøft B, Morris VJ, Svensson B & Williamson G (2002) The starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Biologia*, 57: 239-245.
- Kamitori S, Abe A, Ohtaki A, Kaji A, Tonzuka T & Sakano Y (2002) Crystal structures and structural comparison of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase 1 (TVAI) at 1.6 Å resolution and alpha-amylase 2 (TVAIL) at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 318:443-453.
- Knegtel RM, Strokopytov B, Penninga D, Faber OG, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkhuizen L & Dijkstra BW (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.
- Lammerts van Bueren A, Finn R, Ausió J & Boraston AB (2004) Alpha-glucan recognition by a new family of carbohydrate-binding modules found primarily in bacterial pathogens. *Biochem.* 43:15633-15642.
- Lammerts van Bueren A & Boraston AB (2007) The structural basis of  $\alpha$ -glucan recognition by a family 41 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritime*. *J. Mol. Biol.* 365:555-560.
- Li SZ, Chan-Halbrendt C (2009) Ethanol production in (the) People's Republic of China: potential and technologies. *Appl. Energy* 86:162-169.
- Lin HJ, Xian L, Zhang QJ, Luo XM, Xu QS, Yang Q, Duan CJ, Liu JL, Tang JL, Feng JX (2011) Production of raw cassava starch-degrading enzyme by *Penicillium* and its use in conversion of raw cassava flour to ethanol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38:733-742.
- Machovic M, Svensson B, MacGregor EA & Janecek S (2005) A new clan of CBM families based on bioinformatics of starch-binding domains from families CBM20 and CBM21. *FEBS J.* 272:5497-5513.
- Qiu H, Huang J, Yang J, Rozelle S, Yuhua Zhang, Yahui Zhang & Yanli Zhang (2010) Bioethanol development in China and the potential impacts on its agricultural economy. *Appl. Energy* 87:76-83
- Rico M (2010) Protein structure, dynamics and function by NMR. *Chem. Comm.* 48:1-10.

# Artículos

- Rodríguez-Sanoja R, Morlon-Guyot J, Jore J, Pintado J, Juge N & Guyot JP (2000) Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3350–3356.
- Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N & Sánchez S (2005) Microbial starch-binding domain. *Curr. Op. Microbiol.* 8:260-267.
- Rodríguez-Sanoja R, Guillen D & Sánchez S (2012) Patente en trámite: Dominio de fijación al almidón derivado y su uso en la inmovilización de proteínas recombinantes sobre almidón para purificación, estabilización y acarreador de antígenos y proteínas terapéuticas para inmunización en mucosas”. Solicitud de patente Mx/a/2012/005765.
- Sigurskjold BW, Svensson B, Williamson G & Driguez H (1994) Thermodynamics of ligand binding to the starch-binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *FEBS J.* 225:133-141.
- Sorimachi K, Jacks AJ, Le Gal-Coeffet MF, Williamson G, Archer DB & Williamson MP (1996) Solution structure of the granular starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 259: 970–987.
- Sorimachi K, Le Gal-Coeffet MF, Williamson G, Archer DB, Williamson MP (1997) Solution structure of the granular starch-binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to  $\beta$ -cyclodextrin. *Structure* 5:647-661.
- Southall S, Simpson P, Gilbert H, Williamson G & Williamson M (1999) The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Lett.* 447:58-60.
- Sun SF (2004) Physical Chemistry of Macromolecules. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Tester R, Karkalas J & Qi X (2004) Starch composition, fine structure and architecture; *J. Cer. Sci.* 39:151-165.
- Williamson MP, Le Gal-Coeffet MF, Sorimachi K, Furniss CS, Archer DB, Williamson G (1997) Function of conserved tryptophans in the *Aspergillus niger* glucoamylase 1 starch-binding domain. *Biochem.* 36:7535-7539.