



00591  
18

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
Programa de Maestría y Doctorado en  
Ciencias Bioquímicas

Estudio de la inulosacarasa de la cepa CW28 de  
*Leuconostoc citreum* y del gen que la codifica

**TESIS**

que para obtener el título de:

**Doctora en Ciencias**

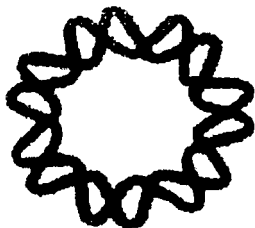
Presenta:

**Vanesa Olivares Illana**

Tutores:

Dra. Clarita Olvera Carranza

Dr. Agustín López-Munguía



Cuernavaca, Morelos.

Febrero 2003

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Vanessa Olivares

Illana

FECHA: 3 Febrero 2003

FIRMA: [Firma]

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Tecnología Enzimática del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía y la Dra. Clarita Olvera.

B

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de donativo 25281-B.

Durante la realización de los estudios de doctorado se contó con una beca para estudios de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de registro 118116, un complemento de beca de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP, UNAM, México) y dos apoyos del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP, UNAM, México) con claves 103339 y 203344.

El programa SEP-CONACyT-ANUIES-ECOS Francia a través del Acuerdo México-Francia relativo a la formación y capacitación para la investigación científica y tecnológica con el proyecto M01-A04, apoyó la estancia de investigación de tres meses realizada en el Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas (INSA) en Toulouse Francia.

Con mucho amor a mis papas,  
por todo.

A Martín.

D

Agradezco

A la Dra. Clarita Olvera Carranza y al Dr. Agustín López Munguía por su apoyo y enseñanzas durante mis estudios de doctorado.

A los miembros de mi comité tutorial, a la Dra. Guadalupe Espin Ocampo, al Dr. Miguel Lara, al Dr. Enrique Merino, y a la Dr. Gloria Soberón. Por el interés mostrado en el proyecto, por sus críticas, sus consejos y sugerencias.

A los miembros del jurado de tesis, a la Dra. Gloria Soberón, a la Dra. Amelia Farrés, a la Dra. Martha Argüello, al Dr. Enrique Merino, al Dr. Sandino Estrada y al Dr. Rafael Vázquez por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, por las sugerencias que contribuyeron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Pierre Monsan y a la Dra. Magali Remaud-Simeon por el apoyo que me brindaron durante la estancia doctoral que realicé en su laboratorio en el Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas (INSA), en Toulouse Francia.

Al T.L. Fernando González por el extraordinario apoyo técnico que me brindó durante mi estancia en el laboratorio.

A la T.L. Aurelia Ocampo, gracias por la ayuda que siempre me brindó.

A Verónica Aldama por la ayuda administrativa con la que siempre conté.

E



A Agustín por vivir intensamente todas las experiencias, los experimentos fallidos (muchos), las sorpresas y las muchas alegrías que este proyecto nos dio. Por el interés y la preocupación en mi trabajo, por creer en mí, por los consejos, esos, los de la vida, por apapacharme cuando estaba triste, pero sobre todo por no permitirme desistir.

A Clarita por mostrarme que con tenacidad se puede lograr cualquier cosa.

A Martha por las coincidencias académicas, por la ASR y las PCRs inversas por compartir tu experiencia conmigo y hacer que mi camino fuera mucho más amable. Aquí aprovecho para agradecerle a Jérôme la televisión, el mundial y así hacer mi estancia en Francia más divertida. Gracias a los dos por su amistad.

Al Miguel Lara, por el interés mostrado por mi trabajo y por mi futuro, por los consejos, y la ayuda en mis experimentos, gracias.

A las (os) López, a los que se fueron Marianita, Gus, Laura, Nadia, José Luis, Fabinho, Martha y Lolita que se acaba de sumar a esta lista, y los que permanecen Fer, Chelo, Male, Edmundo, Xoch, Mary, Clarita, Sandra, Sandrita la de Altotonga, Gina, Alina, Marce, Doña U, Vero y Alex, Gracias por su amistad y su apoyo.

A mis amigos de la maestría Gaby, Lolita, Beto, Gerardo, Gabriel, Genaro, Adriana, Mauricio, y a los que conocí en el camino, en el Ibt, pero también fuera de aquí, a Nayeli, Vania, Ponchito Anguiano, Fabián, Chano, Josué, Isadora, Daniel Sánchez, Leandro Gabriel, Alma, Luis y Hector.

A mis compañeros del fut, gracias por hacer las tardes de martes divertidas.

A Gabriel Gasque por compartir no solo la casa, también la comida, la ropa, y lo mejor, una verdadera amistad.

F

A mis amigos de la casa común Beto, Lolita, Gaby, Marcus y Thomas con los que compartí mucho mas que una gran casa, gracias por tanta diversión, por la hora de la risa, los desayunos alemanes, las fiestas y por estar conmigo cuando mas falta me hacía saber que no estaba sola.

A mis amigos de la vida Nancy, Daniel, Elizabeth, Mauricin, Ruli, Chano, Julio manotas, y el oso, porque sé que siempre estarán conmigo a pesar de la distancia y el tiempo y esto va también para Moncha, Lin, Adriana, Elizabeth, Valentina, Anita, Karla, y Sara. Gracias por los viajes, las materias en la Universidad, las que pasamos juntas y las otras. Gracias.

A mi nueva familia que esta súper, Patricia, Yoame y Edgardo.

Y aquí regreso al principio ya que además de dedicar esta tesis a mis papas también quiero agradecerles el gran esfuerzo que hicieron no solo en educarme, también en entenderme y respetar la manera en la que decidí vivir, en estar conmigo y apoyarme aunque no siempre les fue fácil. Gracias por ayudarme a ser lo que ahora soy. Gracias porque son los mejores!. Gracias a mi hermanita Mariana por ser tan especial, a Mario, a Carmen y a Mario pequeño por darle sentido a la palabra familia.

A Martín, mi futuro, porque ahora se que puedo estar enamorada y sin embargo, ser feliz!

| <b>ÍNDICE</b>                                                              | <b>Página</b> |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>                                             | <b>I</b>      |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>                                              | <b>1</b>      |
| <b>RESUMEN .....</b>                                                       | <b>1</b>      |
| <b>SUMMARY.....</b>                                                        | <b>2</b>      |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>                                                  | <b>3</b>      |
| <b>1 ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO .....</b>                                       | <b>5</b>      |
| <b>1.1. Fructanas.....</b>                                                 | <b>5</b>      |
| 1.1.1 Levana.....                                                          | 5             |
| 1.1.2 Inulina y fructooligosacáridos.....                                  | 6             |
| <b>1.2 Fructosiltransferasas.....</b>                                      | <b>9</b>      |
| 1.2.1 Clasificación .....                                                  | 10            |
| 1.2.2 FTFs de plantas .....                                                | 11            |
| 1.2.3 FTFs de hongos .....                                                 | 13            |
| 1.2.4 FTFs bacterianas .....                                               | 15            |
| 1.2.4.1 Estructura primaria.....                                           | 15            |
| 1.2.4.2 Mecanismo de reacción.....                                         | 16            |
| <b>Dextranas.....</b>                                                      | <b>21</b>     |
| <b>1.3 Glucosiltransferasas .....</b>                                      | <b>23</b>     |
| 1.3.1 Clasificación de las enzimas.....                                    | 24            |
| 1.3.2 Estructura primaria .....                                            | 25            |
| 1.3.3 Mecanismo de reacción .....                                          | 28            |
| <b>1.5. Similitudes y diferencias entre FTFs y GTFs.....</b>               | <b>31</b>     |
| <b>OBJETIVOS.....</b>                                                      | <b>33</b>     |
| <b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                        | <b>34</b>     |
| <b>2.1. Cepas, condiciones de crecimiento y medios de cultivo .....</b>    | <b>34</b>     |
| <b>2.2. Producción de la inulosacarasa en <i>L. citreum</i> CW28 .....</b> | <b>35</b>     |

|                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.3. Síntesis de inulina .....</b>                                                                        | <b>35</b> |
| <b>2.4. Extracción de la inulosacarasa de <i>L. citreum</i> CW28 .....</b>                                   | <b>36</b> |
| <b>2.5. Determinación de la actividad enzimática .....</b>                                                   | <b>37</b> |
| <b>2.6. Electroforesis de proteínas.....</b>                                                                 | <b>37</b> |
| <b>2.7. Cuantificación de proteína. ....</b>                                                                 | <b>38</b> |
| <b>2.8. Determinación del pH y temperatura óptimos y constantes cinéticas. ....</b>                          | <b>38</b> |
| <b>2.9. Reacciones de aceptor .....</b>                                                                      | <b>39</b> |
| <b>2.10. Secuenciación de péptidos de la IS .....</b>                                                        | <b>39</b> |
| <b>2.11. Purificación de DNA genómico de <i>L. citreum</i>.....</b>                                          | <b>40</b> |
| <b>2.12. Purificación de DNA plasmídico .....</b>                                                            | <b>41</b> |
| <b>2.13. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....</b>                                                  | <b>42</b> |
| <b>2.14. PCR inversa .....</b>                                                                               | <b>44</b> |
| <b>2.15. Hibridación del DNA .....</b>                                                                       | <b>46</b> |
| <b>2.16. Secuenciación.....</b>                                                                              | <b>46</b> |
| <b>2.17. Transformación de <i>E. coli</i>.....</b>                                                           | <b>47</b> |
| <b>2.18. Expresión del gen <i>isI</i> y las versiones truncadas en el C-terminal en <i>E. coli</i>. ....</b> | <b>47</b> |
| <b>2.19. Análisis de las secuencias obtenidas .....</b>                                                      | <b>49</b> |
| <b>3. RESULTADOS .....</b>                                                                                   | <b>50</b> |
| <b>3.1. Caracterización bioquímica .....</b>                                                                 | <b>50</b> |
| 3.1.1. Identificación de la cepa CW28 como <i>L. citreum</i> .....                                           | 51        |
| 3.1.2. Producción de la inulosacarasa de la cepa CW28 de <i>L. citreum</i> .....                             | 52        |
| 3.1.3. Síntesis de inulina.....                                                                              | 53        |
| 3.1.4. Solubilización de la IS .....                                                                         | 55        |
| 3.1.5. Propiedades de la IS soluble y asociada a células.....                                                | 56        |
| <b>3.2. Caracterización molecular.....</b>                                                                   | <b>60</b> |
| 3.2.1. Librerías genómicas .....                                                                             | 60        |

|           |                                                                                          |            |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.2.    | Purificación de la proteína y secuenciación de dos péptidos.....                         | 61         |
| 3.2.3.    | Aislamiento del gen <i>isI</i> .....                                                     | 62         |
| 3.2.4.    | Localización del gen <i>isI</i> en el genoma de <i>L. citreum</i> .....                  | 64         |
| 3.2.5.    | Análisis de la secuencia nucleotídica .....                                              | 65         |
| 3.2.6.    | Análisis de la secuencia de aminoácidos .....                                            | 72         |
| 3.2.6.1.  | El péptido señal .....                                                                   | 73         |
| 3.2.6.2.  | Dominio catalítico.....                                                                  | 74         |
| 3.2.6.3.  | Dominio variable y Carboxilo terminal.....                                               | 77         |
| 3.2.7.    | Expresión heteróloga de la proteína .....                                                | 80         |
| 3.2.8.    | Expresión de dos versiones truncadas en el C-terminal de la IS en <i>E. coli</i> . ..... | 81         |
| 3.2.9.    | Caracterización de las proteínas heterólogas .....                                       | 82         |
| <b>4.</b> | <b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>                                                 | <b>85</b>  |
|           | <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>                                                                | <b>88</b>  |
|           | <b>ANEXO 1 .....</b>                                                                     | <b>103</b> |
|           | <b>ANEXO 2 .....</b>                                                                     | <b>128</b> |

J

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                      |                                                                                                                                                      |    |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.1</b>    | Representación de la estructura de la levana.....                                                                                                    | 5  |
| <b>Figura 1.2</b>    | Representación de la estructura de la inulina.....                                                                                                   | 7  |
| <b>Figura 1.3</b>    | Reacciones catalizadas por las fructosiltransferasas.....                                                                                            | 10 |
| <b>Figura 1.4</b>    | Modelo de biosíntesis de fructanas en plantas.....                                                                                                   | 13 |
| <b>Figura 1.5</b>    | Esquema del mecanismo Ping- Pong Bi-Bi propuesto para la LS.....                                                                                     | 18 |
| <b>Figura 1.6</b>    | Representación de las diferentes estructura de dextranas.....                                                                                        | 22 |
| <b>Figura 1.7</b>    | Reacciones catalizadas por la dextransacarasa.....                                                                                                   | 23 |
| <b>Figura 1.8</b>    | Representación esquemática de la estructura de las<br>glucosiltransferasas.....                                                                      | 26 |
| <b>Figura 1.9</b>    | Mecanismo de reacción propuesto por Robyt en 1974.....                                                                                               | 29 |
| <b>Figura 1.10</b>   | Modelo del sitio activo de la dextransacarasa.....                                                                                                   | 30 |
| <b>Figura 2.1</b>    | Estrategia utilizada en la PCR inversa.....                                                                                                          | 45 |
| <b>Figura 3.1</b>    | Análisis filogenético del rRNA 16s de la cepa CW28 de <i>L. citreum</i> .....                                                                        | 51 |
| <b>Figura 3.2</b>    | Curva de crecimiento típica de <i>L. citreum</i> CW28.....                                                                                           | 53 |
| <b>Figura 3.3</b>    | Espectros de <sup>13</sup> C-RMN de fructanas.....                                                                                                   | 54 |
| <b>Figura 3.4</b>    | Purificación de la IS de <i>L. citreum</i> por PAGE-SDS.....                                                                                         | 61 |
| <b>Figura 3.5</b>    | Estrategia usada para el aislamiento del gen <i>isl</i> .....                                                                                        | 63 |
| <b>Figura 3.6.</b>   | Análisis de Southern blot realizado con fragmentos<br>de DNA genómico de la cepa CW28 de <i>Leuconostoc citreum</i> .....                            | 64 |
| <b>Figura 3.7</b>    | Análisis de Southern blot con el DNA genómico de la<br>cepa CW28 de <i>Leuconostoc citreum</i> .....                                                 | 65 |
| <b>Figura 3.8</b>    | Estructura primaria de la IS de <i>L. citreum</i> CW28.....                                                                                          | 73 |
| <b>Figura 3.9</b>    | Organización del péptido señal de la IS de <i>L. citreum</i> CW28.....                                                                               | 74 |
| <b>Figura 3.10</b>   | Alineamientos de FTF bacterianas con el dominio<br>catalítico de la IS de <i>L. citreum</i> .....                                                    | 76 |
| <b>Figura 3.11a.</b> | Alineamiento entre el dominio variable de la ASR de<br><i>L. mesenteroides</i> B- 1355 y la región N-terminal de la IS de <i>L. citreum</i> CW28.... | 77 |
| <b>Figura 3.11b.</b> | Alineamiento entre el dominio de unión a                                                                                                             |    |

polímero de la AS de *L. mesenteroides* B- 1355 y la región  
C-terminal de la IS de *L. citreum* CW28.....78

**Figura 3.12** Elementos de repetición tipo A encontrados  
en la IS de *L. citreum* CW28.....79

**Figura 3.13** Set de siete nuevos elementos de repetición  
encontrados en la IS de *L. citreum* CW28.....80

**Figura 3.14** Electroforesis en gel de poliacrilamida  
en condiciones desnaturalizantes.....81

**Figura 3.15** Diagrama donde se representan las tres versiones de la IS.....82

**Figura 3.16** Zimograma de las enzimas EIS, EIS2, EIS3..... 83

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.1</b> Clasificación de las fructosiltransferasas.....                                                                                            | 11 |
| <b>Tabla 1.2</b> Clasificación de las glucosiltransferasas.....                                                                                             | 25 |
| <b>Tabla 1.3</b> Secuencias repetidas del dominio C-terminal de las<br>glucosiltransferasas.....                                                            | 26 |
| <b>Tabla 2.1</b> Composición del medio de cultivo para <i>L. citreum</i> CW28.....                                                                          | 34 |
| <b>Tabla 2.2</b> Pasos para la amplificación de los fragmentos de DNA.....                                                                                  | 42 |
| <b>Tabla 2.3</b> Oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de este estudio.....                                                                     | 43 |
| <b>Tabla 3.1</b> Desplazamientos químicos del espectro de <sup>13</sup> C-RMN de inulina,<br>levana y el polímero producido por <i>L. citreum</i> CW28..... | 55 |
| <b>Tabla 3.2</b> Comparación de las características mostradas de la IS<br>asociada a células y de la solubilizada con urea 8M.....                          | 56 |
| <b>Tabla 3.3</b> Comparación de las propiedades de las FTF producidas<br>por algunas bacterias.....                                                         | 59 |



## Resumen

En el presente trabajo se caracterizó la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28, una enzima asociada a la pared de la célula. Se estudió la enzima tanto en su forma insoluble asociada a la célula como solubilizada por medio de un tratamiento con urea. Esta fructosiltransferasa (FTF) tiene un peso molecular de 165 kDa, el más alto reportado para este tipo de enzimas. Cuando se encuentra asociada a células es altamente específica para la síntesis de polímero y, a diferencia de las FTFs comunes, con baja transferencia del residuo fructosilo a maltosa o lactosa cuando estos son adicionados al medio de reacción. El polímero sintetizado presenta una estructura que fue analizada por  $^{13}\text{C}$ -NMR evidenciando que se trata de inulina, un polímero de fructosa con enlaces  $\beta$  2-1.

El gen codificante de la inulosacarasa fue clonado, secuenciado y expresado heterológamente en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . La enzima recombinante cataliza la síntesis de inulina a partir de sacarosa como la enzima silvestre. Realizando análisis de secuencia, sorprendentemente se encontró que esta FTF posee tres dominios: el N-terminal que tiene homología con la región variable de la alternansacarasa (ASR) de la cepa NRRL B-1355 de *Leuconostoc mesenteroides*; el dominio catalítico, homólogo con las FTFs de varios microorganismos; y el dominio C-terminal que presenta también homología con el C-terminal de la ASR que en esta enzima se denomina dominio de unión a polímero (GBD). Dos diferentes formas truncadas en el C-terminal del gen *isl* fueron expresadas exitosamente en *E. coli* DH5 $\alpha$ , retuvieron la capacidad de sintetizar inulina, pero perdieron estabilidad térmica y aumentaron la relación hidrólisis/transferencia.

**Summary**

In the present work, we characterize the inulosucrase of *Leuconostoc citreum* CW28. We studied both, the cell-associated insoluble form and after solubilisation by urea treatment. This fructosyltransferase has a molecular mass around 165 kDa, the highest reported for this type of enzymes and, in its cell-associated form, is highly specific for polymer synthesis, with low fructose transferred to maltose and lactose added to the reaction medium. The synthesized polymer has an inulin-like structure with  $\beta$ 2-1 glycosidic linkages, as demonstrated by  $^{13}\text{C}$  NMR

The gene encoding for inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 was cloned, sequenced and expressed in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . The recombinant enzyme catalyzed inulin synthesis from sucrose as the wild type enzyme. From sequence comparison it was found that this FTF possesses three domains: the N-terminal, which has homology with the variable region of the alternansucrase (AS) of *Leuconostoc mesenteroides* 1355; the catalytic domain, homologous to the fructosyltransferases from various microorganisms; and the C-terminal domain, which presents homology with the C-terminal domain from AS that is called glucan binding domain (GBD) in AS. Two different C-terminal (GBD) truncated forms of the *isl* gene were successfully expressed in *E. coli*, retaining the ability to synthesize inulin, but losing thermal stability and specificity.

# INTRODUCCIÓN

## **Introducción**

Las glicosiltransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un residuo glicosilo de una molécula donadora hacia una aceptora. Entre estas enzimas se encuentran las glucosiltransferasas, también llamadas, glucansacarosas y las fructosiltransferasas. Las primeras transfieren un residuo de glucosa a partir de la sacarosa hacia un polímero en crecimiento llamado glucano, liberando fructosa al medio de reacción. Las fructosiltransferasas en cambio, transfieren un residuo fructosilo de la sacarosa hacia un polímero en crecimiento llamado fructana, por lo que en este caso la glucosa libre es la que se acumula en el medio de reacción. Estas enzimas son capaces también de transferir la fructosa de la rafinosa. La acumulación de la fructosa en el medio de reacción para el primer caso, o de la glucosa para el segundo, es lo que permite la medición de actividad, ya que estos dos azúcares a diferencia de la sacarosa son reductores, por lo que son fácilmente medibles. La energía requerida para la formación del enlace glicosilo es tomada de la ruptura del enlace de la sacarosa por lo que no requieren de cofactores o intermediarios fosforilados de alta energía.

Ambas enzimas son capaces de sintetizar oligosacáridos de diferentes grados de polimerización si además de sacarosa se adiciona a la mezcla de reacción otra molécula aceptora como maltosa o lactosa. A pesar de las similitudes que existen entre estas enzimas, sus secuencias y organización estructural son muy diferentes y se han propuesto mecanismos de acción diferentes para cada una. Las fructosiltransferasas son producidas por una serie de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas entre las que se cuentan *Bacillus subtilis*, que produce la FTF bacteriana mas estudiada, además de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Erwinia amylovora*, *Rahnella aquatilis* entre otras. Las glucosiltransferasas son producidas principalmente por *Leuconostoc mesenteroides* y diferentes especies del género *Streptococcus*. En el laboratorio de biocatálisis del Instituto de Biotecnología UNAM se han estudiado ampliamente las

glucosiltransferasas de *L. mesenteroides* y buscando nuevas cepas productoras de estas enzimas se realizó un "screening" de actividades glucansacarasas en 14 cepas de *Leuconostoc* aisladas del Pozol por la Dra. Carmen Wachter Rodarte de la Facultad de Química de la UNAM. En un estudio preliminar, encontramos en una de estas 14 cepas una actividad fructosiltransferasa, asociada a células. En este trabajo se reporta la caracterización bioquímica de la dicha enzima, la clasificación de la cepa productora como *Leuconostoc citreum* y la caracterización molecular que comprende el aislamiento del gen, la expresión heteróloga de la proteína en *Escherichia coli*, y el análisis de la secuencias nucleotídica y de aminoácidos.

Los resultados del presente trabajo se presentaron en el 4<sup>th</sup> Carbohydrate Bioengineering Meeting. Stockholm,. 10-13 de junio y en el Ninth Seminar on Inulin. Budapest, Hungría. Abril, 18-19 (2002), y dieron lugar hasta ahora a una publicación en Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology y otra que se encuentra sometida en el Journal of Bacteriology.

# ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

## 1 Estudio Bibliográfico

### 1.1. Fructanas

Fructanas (inulina o levana) son polímeros solubles de b-D-fructofuranosa las cuales son sintetizadas por algunos géneros bacterianos y por alrededor del 15% de las plantas superiores, en las que se almacenan en concentraciones elevadas como alternativa al almidón. En ambos reinos, la síntesis ocurre a partir de sacarosa como sustrato. Sin embargo, en plantas la síntesis de fructanas se realiza con la acción concertada de distintas fructosiltransferasas (Chambert y Petit-Glatron, 1991).

#### 1.1.1 Levana

Las levanas son homopolisacáridos de fructosa producidos tanto por plantas como por microorganismos, cuyo peso molecular varía dependiendo de la fuente de producción, aunque por lo general las levanas de plantas son menores a las obtenidas de microorganismos (Heyer y col, 1998).

La levana está constituida por moléculas de fructosa unidas mediante enlaces  $\beta$  2-6, con ramificaciones en  $\beta$  2-1 aproximadamente cada 9 o 10 residuos, como se muestra en la figura 1.1. Las levanas de origen microbiano llegan a tener más de diez mil residuos de fructosa en la cadena.

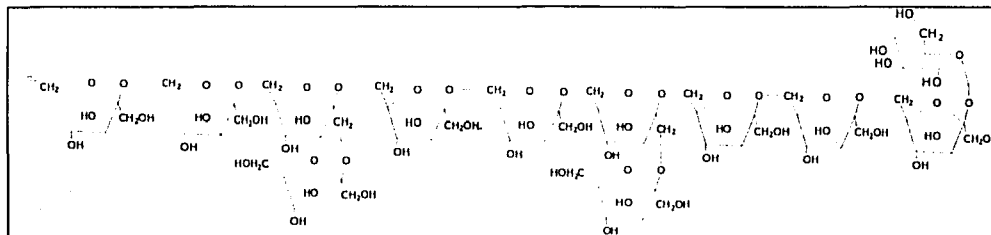


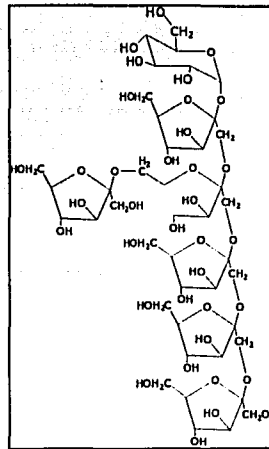
Figura 1.1 Representación de la estructura de la levana.

Las levanas tienen potencialmente las mismas aplicaciones que las dextranas las cuales serán descritas más adelante (Ohtsuka y col, 1992). Entre las aplicaciones más estudiadas están: sustituto de plasma sanguíneo, como vehículo de medicamentos, agente antitumoral. En el campo de la farmacología los biopolímeros en general son conocidos por carecer de efectos colaterales al ser administrados a humanos. Se consideran modificadores de la respuesta inmune ya que activan la liberación de células líticas y de citotoxinas inhibitoras del crecimiento celular (Franz, y col, 1988; Lifely, 1988). En 1993, Liepa y col. reportaron que la administración de levana a ratones estimula la leucopoesis, la producción de anticuerpos y promueve la actividad tumoricida de los fagocitos.

### *1.1.2 Inulina y fructooligosacáridos.*

La inulina es un polisacárido compuesto por unidades de fructosa unidas mediante enlaces  $\beta$  2-1 con ramificaciones en  $\beta$  2-6 (Roberfroid, 1999). El primer monómero de la cadena es una glucosa, debido a que la sacarosa es el primer aceptor para la elongación de la cadena (Heyer y col, 1998) (figura 1.2). La inulina de origen microbiano puede llegar a tener pesos moleculares de las de  $10^6$  g/mol (Ebisu y col, 1975).





**Figura 1.2** Representación de la estructura de la inulina

Los fructooligosacáridos (FOS) son cadenas de fructosa generalmente de un grado de polimerización menor a 10 unidades (Niness, 1999) y pueden ser obtenidos por extracción a partir de fuentes naturales como plantas, o por medio de la hidrólisis de inulina (Van Loo y col, 1995). Cuando los FOS son obtenidos de esta forma, también se les conoce como oligofructosa.

Los FOS pueden también ser obtenidos por síntesis enzimática utilizando fructosiltransferasas (Clevenger y col, 1988), o bien mediante la adición de aceptores diversos (Tanaka y col, 1981) como el caso que se ejemplifica en la figura 1.3.

Para comprender la importancia de la inulina y los FOS, es necesario definir los siguientes conceptos:

**Probiótico:** Es un microorganismo viable que puede ser adicionado en la dieta y que afecta benéficamente la salud del hospedero a través de sus efectos en el tracto intestinal.

**Prebiótico:** Es un ingrediente no-digerible que beneficia al hospedero estimulando selectivamente el crecimiento de una o un limitado número de bacterias (probióticos) en el colon (Scholz-Ahrens y col, 2001). La modificación de la composición de la microflora colónica debida a la presencia de prebióticos, permite que predominen unas pocas bacterias que promueven la salud, especial, pero no exclusivamente *lactobacilli* y *bifidobacterias* (Gibson y Roberfroid, 1995).

**Nutracéutico:** Es un componente natural o químico de los alimentos que beneficia al cuerpo humano previniendo o tratando una o más enfermedades. Nutrientes esenciales pueden ser considerados como nutracéuticos si proveen beneficios más allá de su role normal en el crecimiento o mantenimiento del organismo. Un ejemplo de esto son las propiedades antioxidantes de las vitaminas C y E (Wildman, 2001)

La inulina y los FOS son considerados como nutracéuticos y son empleados en alimentos funcionales, los cuales ofrecen una combinación única de propiedades nutricionales e importantes beneficios tecnológicos (Franck, 2002). Ambos son clasificados como fibra dietética debido a que son resistentes a las enzimas del tracto digestivo. Posteriormente son fermentados en el colon provocando una estimulación selectiva del crecimiento de bifidobacterias en la microflora colónica soportando su clasificación como prebióticos.

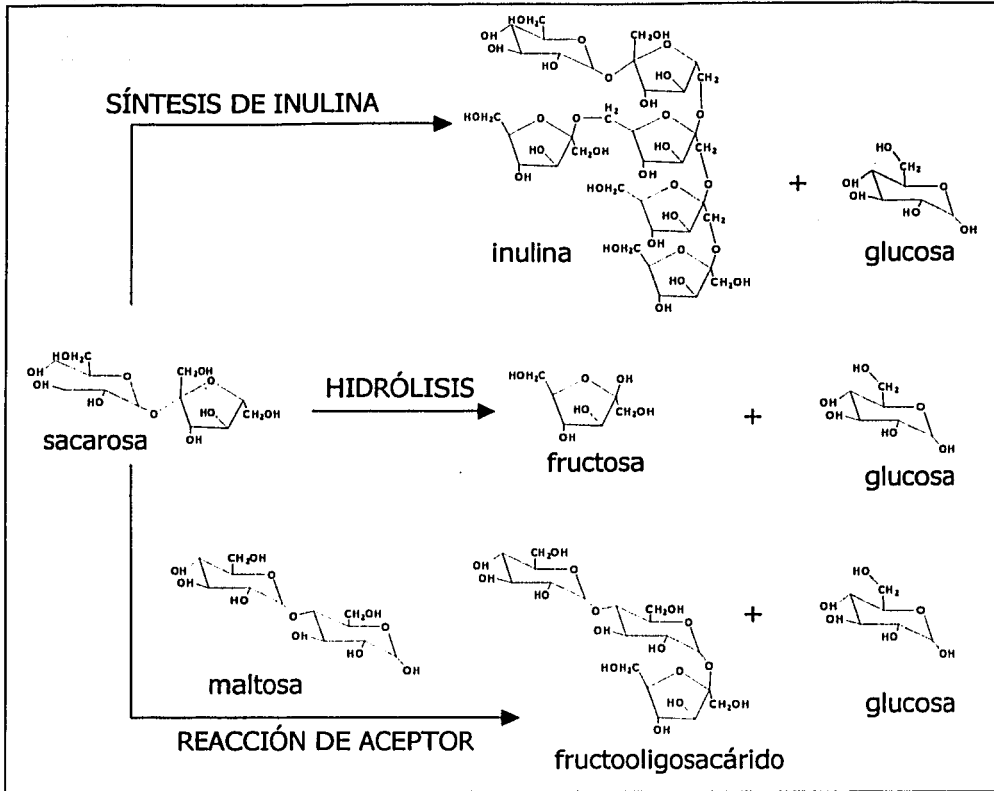
Se han realizado muchos estudios acerca de los efectos de las fructanas tipo inulina sobre la salud humana. Se ha encontrado que la inulina facilita la absorción de minerales particularmente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Roberfroid 2000), decrece los niveles de triglicéridos, fosfolípidos y lipoproteínas de baja densidad en suero debido a que disminuye la lipogénesis de novo en hígado, reduce la incidencia de tumores de mama inducidos en ratas, y decrecen la incidencia de metástasis. Existen algunas hipótesis sobre el mecanismo mediante el cual las fructanas tipo inulina actúan en

la inhibición de crecimiento de tumores cancerígenos. Como ya se mencionó activan el crecimiento de bacterias benéficas en el colon humano, los cambios en la composición de la microflora del colon están asociados con la reducción la incidencia de tumores (Reddy, 1999). Además, la inulina reduce la incidencia de aberrantes "*crypt foci*" en el colon de ratas previamente inyectadas con agentes carcinógenos. El crecimiento y proliferación de células tumorales depende de la biodisponibilidad de glucosa, la inulina decrece los niveles de glucosa en suero de ratas y humanos (Yamashita y col, 1994).

Por otro lado la inulina y los FOS son utilizados como sustitutos de azúcar, de grasas (solo inulina), como texturizante y estabilizante, además de que mejora la sensación al paladar de algunos productos lácteos fermentados, postres como gelatinas y helados, productos horneados como galletas y pasteles y formulas para bebes (Roberfroid, 2000).

## **1.2 Fructosiltransferasas**

Las FTFs, son enzimas que tienen la capacidad de transferir un residuo fructosilo de la sacarosa o la rafinosa hacia un polisacárido para aumentar su grado de polimerización (DP). Dependiendo de la fuente de la enzima y de las condiciones de la reacción, el polisacárido alcanza diferentes longitudes de cadena. El residuo fructosilo también puede ser transferido a una variedad de aceptores incluyendo al agua (hidrólisis de la sacarosa), a la sacarosa (síntesis de 1-kestosa) (Batista y col. 1999), o D-xylosa, D-arabinosa, L-arabinosa, maltosa, maltotriosa, celobiosa, melibiosa o lactosa (síntesis de fructooligosacáridos) (Ohtsuka y col, 1992). En la figura 1.3 se muestra un esquema general de las reacciones catalizadas por las FTFs. En la naturaleza estas enzimas son producidas por plantas, hongos y bacterias.



**Figura 1.3** Reacciones catalizadas por las fructosiltransferasas. Se ejemplifica con la inulosacarasa.

### 1.2.1 Clasificación

En general los polímeros producidos por las FTFs se denominan fructanas y en función del tipo de enzima que las sintetice adquieren diferentes estructuras. Los residuos fructosilo pueden estar unidos mediante enlaces  $\beta$  2-1 en la cadena principal presentando o no ramificaciones en  $\beta$  2-6. En este caso se les denomina inulinas y presentan diversos grados de polimerización, en función de la fuente de

la enzima como ya se mencionó. Las enzimas responsables de la síntesis de estos polímeros en bacterias y hongos son conocidas como inulosacarosas. En plantas a estas enzimas se los conoce con el nombre genérico de fructosiltransferasas.

La fructanas también pueden tener enlaces  $\beta$  2-6 en la cadena principal y en algunos casos ramificaciones en  $\beta$  2-1. A estos polisacáridos se les conocen como levanas y a las enzimas responsables de su síntesis como levansacarosas (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1** Clasificación de las fructosiltransferasas

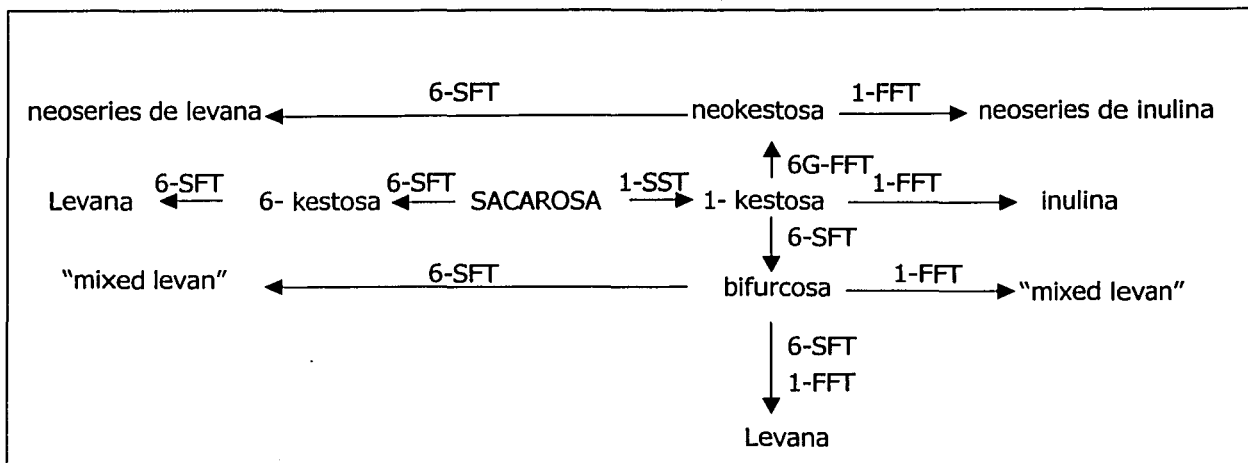
| <b>Fructosiltransferasa</b>     | <b>polímero</b> | <b>enlaces</b>                                         |
|---------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------|
| Inulosacarasa (IS)              | inulina         | enlaces $\beta$ 2-1 y<br>ramificaciones en $\beta$ 2-6 |
| Levansacarosas (LS)             | levana          | enlaces $\beta$ 2-6 y<br>ramificaciones en $\beta$ 2-1 |
| Fructosiltransferasa de plantas | FOS, fructanas  | enlaces $\beta$ 2-1 y $\beta$ 2-6                      |

### *1.2.2 FTFs de plantas*

Alrededor del 15% de todas las especies de plantas que producen flores guardan fructanas como reserva de carbohidratos, los que también pueden contribuir a la protección de la planta contra la desecación y el frío (Sprenger y col, 1995). Cereales como trigo, cebada y avena, así como vegetales como la achicoria, lechuga, cebolla, son solo algunos ejemplos de éstas (Vijn y Smeekens, 1999). Las fructanas de plantas son almacenadas en la vacuola donde también son producidas por al menos dos diferentes fructosiltransferasas. En un primer paso, la sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) cataliza la formación del trisacárido 1-kestosa a partir de dos moléculas de sacarosa liberando glucosa. Posteriormente la fructana:fructana 1-fructosiltransferasa (1-FFT) media la

transferencia reversible de los residuos fructosilo hacia la cadena de polímero en crecimiento (Edelman y Jefford, 1968). En general, los polisacáridos producidos por plantas son mucho más cortos que los producidos por fructosiltransferasas bacterianas, grados de polimerización de 30 a 50 residuos fructosilo son encontrados, aunque ocasionalmente pueden exceder a los 200 residuos. En las plantas superiores pueden distinguirse fructanas del tipo inulina, levana, neoserias de inulina y neoserias de levana, que son cadenas cortas de menos de 10 residuos de fructosa y también polímeros con ambos enlaces en la cadena principal conocidos como levana mezclada ("mixed levan") (Vijn y Smeekens 1999).

El modelo de biosíntesis de inulina propuesto por Vijn y Smeekens en 1999 se muestra en la figura 1.4, donde se observa que algunas otras enzimas están involucradas. Tal es el caso de la fructana:fructana 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT) que produce neokestosa que al ser elongada por la 1-FFT o la fructana:fructana 6-fructosiltransferasa (6-FFT), resulta en la producción de inulina o levana respectivamente. A partir de la sacarosa y la 1-kestosa, la sacarosa:fructana 6-fructosiltransferasa (6-SFT) produce bifucosa, la cual puede ser elongada también por la 1-FFT o la 6-FFT resultando en "levana mezclada". A partir de la sacarosa la enzima 6-SFT produce 6-kestosa, la cual puede ser elongada por acción de la misma 6-SFT para producir levana.



**Figura 1.4** Modelo de biosíntesis de fructanas en plantas. A partir de la sacarosa, fructanas con diferentes estructuras pueden ser producidas por la acción concertada de diferentes fructosiltransferasas. (Vijn y Smeekens, 1999).

Moléculas de inulina de diferentes tamaños pueden ocurrir simultáneamente en los tejidos. La degradación de las moléculas de fructana es catalizada por la fructan-exohidrolasa (Marx y col., 1997). La variación en la longitud de las cadenas de inulina se puede deber: a) al resultado de diferentes características enzimáticas de las 1-FFTs o b) como consecuencia de diferencias de las enzimas fructan-exohidrolasas que definen sets de inulinas especie-específicas por digestiones en el polímero. La composición de las fructanas puede variar dependiendo del grado de desarrollo de la planta, así como de las condiciones ambientales

### 1.2.3 FTFs de hongos

Algunas cepas fungales han sido identificadas como productoras de fructanas tanto de bajo como de alto peso molecular. Rehm y col. en 1998 reportaron la clonación y expresión heteróloga de la sacarosa-sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) de

*Aspergillus foetidus*, , productora del trisacárido 1-kestosa. Hirayama y col., en 1989 reportaron la producción de fructooligosacáridos por *Aspergillus niger*; en 1993, Olah y col. reportaron la síntesis de inulina de alto peso molecular en *Penicillium chrysogenum*; al igual que Kawai y col (1973) en conidia de *Aspergillus sydowi*. Sin embargo, muy poco se conoce sobre el significado fisiológico y la síntesis de fructanas en hongos, ya que si bien se ha demostrado la síntesis de inulina de alto peso molecular (mayor que  $2 \times 10^7$ ) utilizando extractos de conidia, cuando se han aislado y expresado heterológamente estos genes (el caso específico de la FTF de *A. sydowi*, Heyer y Wendenburg, 2001) no se ha logrado sintetizar inulina de alto grado de polimerización, sino exclusivamente fructooligosacáridos. Una posible explicación es que quizá un factor adicional presente en la conidia es necesario para la producción de inulina de alto peso molecular (Heyer y Wendenburg, 2001), lo que sugiere un mecanismo que involucre más de una enzima como en el caso de la síntesis de inulina en plantas.

Las FTFs de hongos han sido exitosamente expresadas en levadura ya que están altamente glicosiladas (Rehm y col., 1998). Cuando la FTF de *A. sydowi* fue expresada en plantas de papa se observó un fuerte fenotipo de retardamiento del crecimiento y necrosis de las hojas hasta la muerte en pocas semanas (Heyer y Wendenburg, 2001). Se sabe que las levansacarosas tienen una baja especificidad hacia aceptores, es decir, el residuo fructosilo proveniente de la sacarosa puede ser transferido a una amplia gama de compuestos hidroxilados. Una posible razón del daño en plantas transgénicas puede deberse a esta baja especificidad, la levansacarasa podría estar interviniendo en la glicosilación de proteínas o en algunos otros procesos celulares. Lo anterior sugiere que la FTF de *A. sydowi* produce también heterooligosacáridos tomando como aceptores a otros compuestos hidroxilados, como en el caso de las enzimas bacterianas.



#### **1.2.4 FTFs bacterianas**

Numerosos microorganismos productores de fructanas han sido descritos en la literatura. La mayoría pertenece a los géneros bacterianos: *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Acetobacter*, *Phytobacterium*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Azotobacter* y *Actinomyces* (Perlot y Monsan, 1984; Han y Clarke, 1990; Bergeron y Burne, 2001). El papel fisiológico que juegan las fructanas en algunos de estos microorganismos esta bien establecido. Tal es el caso de *Streptococcus* y *Actinomyces*, los cuales están implicados en la formación de la placa dentobacteriana, donde los polímeros tanto de fructosa como de glucosa participan en la adhesión de las bacterias a la superficie del diente (Heyer y col., 1998; Rozen y col., 2001; Bergenron y Burne, 2001). En el caso de *Pseudomonas* que es un patógeno de plantas, la levana tiene una función antes o durante el proceso de infección como factor de virulencia (Hettwer y col., 1998; Li y Ullrich, 2001). Para el caso de *Acetobacter* se ha sugerido que la presencia de expopolisacáridos como la levana puede ser una señal de reconocimiento en la interacción microorganismo-planta (James y col., 1994). En *Leuconostoc* se desconoce la función de los expopolisacáridos producidos (tanto dextranas como fructanas), aunque podrían estar implicados como en el caso de *Streptococcus*, en funciones de adhesión a su ambiente o servir como reserva de carbohidratos para lo cual requerirían de la producción de enzimas que los degraden.

##### **1.2.4.1 Estructura primaria**

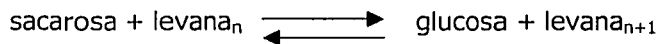
Son cerca de 19 las FTFs bacterianas secuenciadas a la fecha. Sus estructuras primarias muestran altas similitudes entre ellas. Aunque las enzimas provenientes de microorganismos Gram positivos son más similares entre ellas que las de Gram negativos (Pons y col., 2000).

Los pesos moleculares reportados para estas enzimas son del orden de los 50-80 kDa, con excepción de la enzima de *S. salivarius* que tiene un peso molecular de 140 kDa. Estructuralmente estas enzimas no presentan dominios, a diferencia de las glucosiltransferasas que se describirán más adelante.

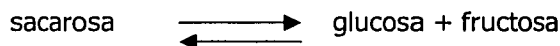
Se conoce muy poco sobre el sitio activo de estas enzimas, su estructura tridimensional fue determinada a 3.8 Å de resolución por lo que no es posible hacer estudios más finos sobre el sitio activo (Le Brun y Rapenbusch, 1980). Sin embargo, ya se han realizado análisis de predicción de estructura donde Pons y col. (2000) concluyen que las FTFs de diferentes orígenes comparten una estructura tipo β-propela, además estos mismo autores reportan la existencia de 8 cajas de identidad entre las FTFs bacterianas, entre ellas se destacan: la caja denominada "caja de sacarosa" y el motivo RDP que además se ha identificado también en las FTFs de plantas y hongos.

*1.2.4.2 Mecanismo de reacción*

La determinación del mecanismo de reacción de las FTFs bacterianas ha sido difícil entre otras causas debido a que en presencia de sacarosa son capaces de realizar varias reacciones al mismo tiempo. La enzima más estudiada es la levansacarasa de *B. subtilis* y puede transferir la fructosa hacia diferentes aceptores, con la liberación de glucosa (Canedo y col.,1999) mediante dos tipos de reacción, de transferencia o de polimerización:



o bien, la reacción de hidrólisis:



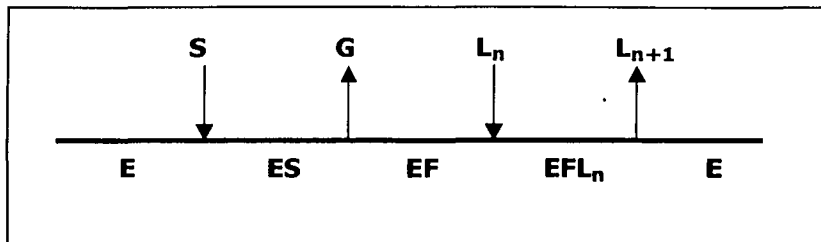
Se ha demostrado que la proporción de estas dos reacciones puede ser modulada en función de las condiciones y composición del medio de reacción. La temperatura es un factor importante ya que conforme aumenta, la reacción de hidrólisis se favorece sobre la transferencia. La presencia de solventes orgánicos afecta igualmente el balance de las dos reacciones ya que la enzima es capaz de catalizar hasta un 100% la reacción de polimerización en un medio de reacción con 60% de acetonitrilo (Chambert y Petit-Glatron, 1989). Estos mismos autores lograron inmovilizar la LS de *B. subtilis* en un gel de fosfato de calcio, lo cual incrementó la síntesis de levana hasta un 85% (Chambert y Petit-Glatron, 1993). Finalmente, mediante la adición de levana de diferentes grados de polimerización al medio de reacción se logró un aumento en la proporción de transferencia.

Diversos autores han demostrado que la enzima muestra tres tipos de especificidad:

- a) **del grupo transferido.** Rapoport y Dedonder (1963) utilizaron análogos de sacarosa y encontraron que la enzima además de transferir fructosa, es capaz de transferir L- sorbosil o D- xilosil.
- b) **del sustrato donador.** Se ha demostrado que sólo moléculas que tengan una fructosa unida a un grupo aldósilo, de manera análoga que en la sacarosa, pueden actuar como donadoras, tal como sucede con la rafinosa. Por otro lado la glucosa de la sacarosa puede ser sustituida por diferentes azúcares como D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa, etc.
- c) **del aceptor.** Numerosos compuestos que contengan grupos hidroxilos pueden actuar como aceptores del residuo de fructosa, tales como: metanol, glicerol, monosacáridos u oligosacáridos como la trehalosa, kestosa, etc. (Dedonder, 1966).

Una propuesta sobre el mecanismo cinético de estas enzimas fue planteada por Chambert y Dedonder a través de una serie de estudios entre 1972 y 1976.

Considerando las diferentes reacciones que realiza la enzima, estos autores adicionaron al medio de reacción levana para asegurar que la reacción de hidrólisis fuera completamente eliminada y con ello propusieron un modelo más sencillo. Bajo estas condiciones midieron la velocidad inicial de las diferentes reacciones. A partir de los datos obtenidos, concluyeron que el comportamiento cinético de la enzima se ajusta a un modelo básico de tipo Ping-Pong Bi-Bi, que se puede representar mediante la notación de Cleland como se muestra en la figura 1.5.



**Figura 1.5** Esquema del mecanismo Ping- Pong Bi-Bi propuesto para la LS, donde E es la enzima; S es la sacarosa; G es la glucosa; F, es la fructosa y  $L_n$  es la levana con  $n$  residuos de fructosa.

Como se observa, en el mecanismo se plantea la unión de la enzima a la sacarosa formando un intermediario enzima-sacarosa que, después de liberar a la glucosa, da origen al complejo enzima-fructosa. A partir de este último, la fructosa es transferida a la cadena de levana aumentando así en un residuo el tamaño del polímero. Nótese que el aceptor y el producto son prácticamente el mismo compuesto, solo que el producto un residuo fructosilo mas grande.

Por otro lado, el aislamiento y caracterización del complejo enzima-fructosa (EF) permitió a Chambert y col. (1976b) proponer un mecanismo molecular para la reacción de transfructosilación que realiza la enzima. Estos autores encontraron que el residuo de fructosa está covalentemente unido a la enzima, donde esta implicado un ácido aspártico de la proteína y el C2 de la fructosa. Lo anterior los

llevó a proponer que la LS actúa mediante el mecanismo aceptado para las enzimas que catalizan transglicosidaciones con retención de la configuración, es decir, es un mecanismo de dos pasos en el que se realiza una catálisis bifuncional, donde participan conjuntamente un grupo ácido y un grupo nucleófilo de la proteína. En el caso de la LS éste último es el  $\beta$ -carboxilato de un aspártico. En un primer paso, una vez formado el complejo enzima-sacarosa, el  $\beta$ -carboxilato ejerce un ataque nucleofílico sobre el C2 de la fructosa. En seguida, el grupo ácido transfiere un protón a la glucosa y así esta es liberada, dando lugar al complejo fructosil-enzima, donde la fructosa esta unida probablemente en configuración  $\alpha$ . Después de que la glucosa ha sido dissociada del complejo EF, el aceptor de la fructosa puede unirse. El grupo ácido de la enzima ya desprotonado, actúa sobre el aceptor removiendo un protón, quedando este último como un nucleófilo reactivo. Finalmente el aceptor en forma de oxianión, realiza un ataque sobre el enlace éster del complejo EF.

Existen algunas explicaciones para la formación del enlace covalente entre la enzima y la fructosa. La primera es desde el punto de vista de la estereoquímica, planteando que este enlace ayuda a la inversión intermedia de la configuración y así poder retenerla en el producto. Por otro lado, este intermediario provee probablemente una función catalítica, ya que el grupo carboxilo de aspártico actúa como mejor grupo atrayente que el agua (u otro aceptor) y mejor grupo liberador de la glucosa. Desde el punto de vista químico, se sabe que un grupo carboxilo desprotonado es mejor nucleófilo que el agua y que un enlace éster glicosídico es más reactivo que el glicosídico de la sacarosa.

Existen hasta ahora varias hipótesis para explicar el mecanismo de iniciación y crecimiento de cadenas de levana. El aceptor inicial de la síntesis de levana es una molécula de sacarosa, ya que han encontrado trazas de glucosa en las cadenas de polímero. Desde entonces se postuló que la misma enzima es la responsable de la síntesis tanto de la cadena principal como de las ramificaciones, a diferencia de los

complejos enzimáticos para la síntesis del polímero encontrados en plantas que ya se discutieron.

Rapoport (1966), propuso que el crecimiento de la cadena se realiza mediante la adición de un residuo de fructosa sobre el C6 de la última fructosa de la cadena en crecimiento.

Primeramente se había postulado la existencia de tres mecanismos de elongación del polímero:

- a) **crecimiento de una cadena.** En el cual los residuos de fructosa son agregados sucesivamente a la misma molécula de polímero, este es el mecanismo propuesto para la síntesis de dextranas que se discutirá más adelante.
- b) **crecimiento múltiple.** En el que los residuos de fructosa se van uniendo al azar a todas las moléculas de polímeroceptoras disponibles.
- c) **crecimiento multirepetitivo.** En el que varios residuos de fructosa se agregan a más de una molécula de polisacárido.

Chambert y col. (1974) concluyen que el mecanismo que sigue la enzima es el segundo. Esto lo logran mediante la determinación del peso molecular de los polímeros antes y después de la reacción, calculando un peso teórico aproximado basado en los modelos propuestos. Los resultados experimentales muestran que el aceptor y el producto son prácticamente del mismo tamaño, lo que los llevó a descartar el primer mecanismo y, aunque el tercero no se puede rechazar completamente, deducen que el que más se ajusta a sus datos es el de crecimiento múltiple.

A continuación se describirá otro tipo de polisacáridos, las dextranas y las enzimas que los producen, las glucosiltransferasas (GTFs). Esto con el fin de lograr una mejor comprensión sobre la inulosacarasa de *L. citreum* CW28, ya que a pesar de ser una FTF, muestra grandes similitudes con las GTFs.

## **Dextranas**

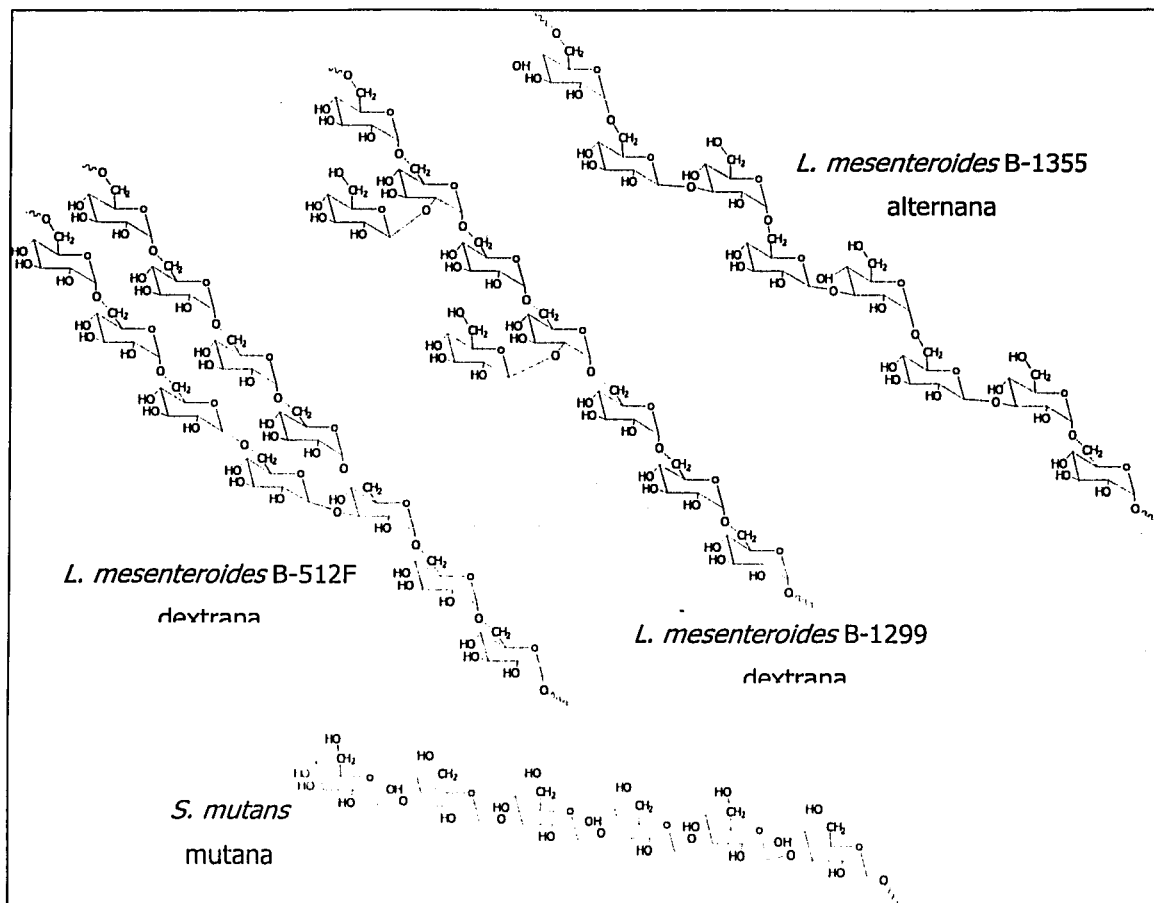
Dextrana es el nombre asignado a un grupo de polisacáridos bacterianos extracelulares compuestos casi exclusivamente por unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosas unidas principalmente por enlaces  $\alpha$  1-6 (Alsop 1983).

A pesar de que las dextranas representan un problema grave en la industria refinadora de azúcar debido a que provocan obstrucciones en filtros y tuberías, además de que inhiben la cristalización y disminuye los rendimientos durante la refinación del azúcar; se han desarrollado aplicaciones comerciales basadas en su inocuidad y su comportamiento reológico, en particular, como sustituto de plasma sanguíneo. Sin embargo, son pocas las aplicaciones comerciales de las dextranas debido a que su precio es más alto que el de la celulosa o el almidón y sus propiedades reológicas menos interesantes que las de xantanas o alginatos. Por esta razón, las dextranas sólo son usadas en productos de alto valor agregado como el Sephadex, preparaciones de dextrana-hemoglobina, dextrana-sulfato con características muy similares a la heparina, etc., o de alta especificidad de función como dextranas acopladas a sustancias biológicamente activas (Belder 1990).

Las dextranas son producidas por glucosiltransferasas de bacterias, y los géneros bacterianos en los que se han estudiado exhaustivamente las enzimas y sus polímeros son *Leuconostoc* y *Streptococcus*.

Los estudios para dilucidar la estructura de las dextranas datan de 1976 e inicialmente estaban basados en sus propiedades químicas (análisis por metilación,

oxidación por periodato) y físicas (solubilidad). Estos trabajos fueron complementados mediante análisis de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Alsop 1983), lo que puso en evidencia las grandes variaciones entre las estructuras de las dextranas sintetizadas por diferentes cepas. Cuando mas tarde los estudios de estructura se complementaron con los de enzimología se observó que una sola cepa es capaz de producir más de un tipo de dextrana con diferentes estructuras. En la figura 1.6 se muestran las principales estructuras de estos polímeros.



**Figura 1.6** Representación de las diferentes estructura de dextranas sintetizadas por glucosiltransferasas de diferentes cepas de *L. mesenteroides* y por *S. mutans*.



### 1.3 Glucosiltransferasas

Las glucosiltransferasas catalizan la conversión de sacarosa en glucanos de alto grado de polimerización conocidos como dextranas. Sin embargo, en presencia de carbohidratos de bajo peso molecular, las moléculas de glucosa son transferidas a estos azúcares para formar oligosacáridos, y también, como sus homólogas fructosiltransferasas, transfieren el residuo glucosilo al agua provocando la hidrólisis de la sacarosa como se muestra en la figura 1.7 (Koepsell y col 1953, Funane y col, 1998).

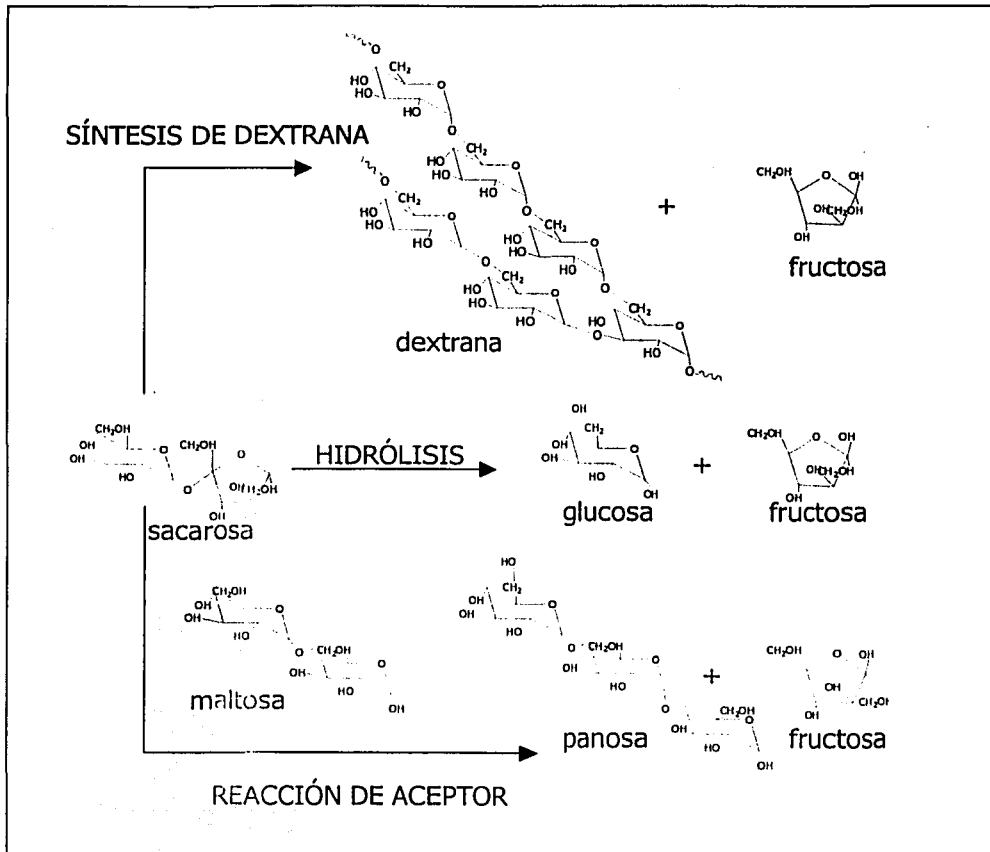


Figura 1.7 Reacciones catalizadas por la dextransacarasa.

**1.3.1 Clasificación de las enzimas**

Dependiendo de la estructura del polímero sintetizado y del microorganismo productor, estas enzimas se clasifican en:

**a) dextransacarasa.** Estas enzimas producen un polímero denominado dextrana, que presenta en su cadena principal un mínimo de 50% de enlaces sucesivos  $\alpha$  1-6 y ramificaciones en  $\alpha$  1-2 o  $\alpha$  1-3. El porcentaje y el largo de las ramificaciones varía dependiendo de la fuente de la enzima. Estas enzimas son producidas principalmente por *L. mesenteroides* y la más estudiada es la sintetizada por NRRL B-512F, aunque también son encontradas en *Streptococcus*.

**b) alternansacarasa.** El polímero sintetizado por esta enzima se denomina alternana y presenta en su cadena principal enlaces alternados  $\alpha$  1-6 y  $\alpha$  1-3 con ramificaciones en  $\alpha$  1-3. Existe evidencia de actividad alternansacarasa en tres cepas de *L. mesenteroides*, la NRRL B 1355, NRRL B 1501, NRRL B 1498 (Jeanes y col. 1954; Seymour y Knapp, 1980; Côté y Robyt, 1982).

**c) mutansacarasa.** Esta enzima sintetiza un polímero constituido mayoritariamente por enlaces  $\alpha$  1-3 consecutivos en su cadena principal, denominado mutano. Estas enzimas son producidas por *S. mutans* y por algunas cepas de *L. mesenteroides* como NRRL B-523 y NRRL B-1149 (Sidebotham, 1974; Mooser, 1992).

En la tabla 1.2 se muestra la clasificación de las dextransacarasas.



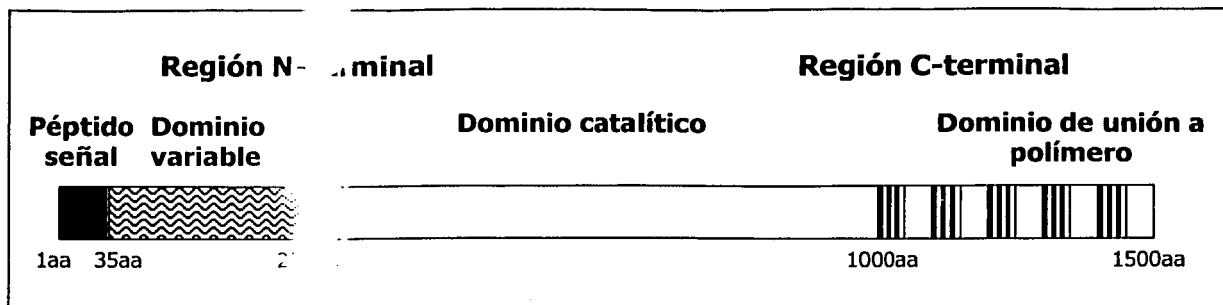
**Tabla 1.2** Clasificación de las glucosiltransferasas.

| microorganismo                   | Glucosiltransferasas |                     |           |                                                    |
|----------------------------------|----------------------|---------------------|-----------|----------------------------------------------------|
|                                  | productora           | (GTF)               | polímero  | enlaces                                            |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | LE-2F                | dextransacarasa     | dextrana  | enlaces $\alpha$ 1-6 y ramificaciones $\alpha$ 1-3 |
|                                  | LE-29                | dextransacarasa     | dextrana  | enlaces $\alpha$ 1-6 y ramificaciones $\alpha$ 1-2 |
|                                  | LE-35                | alternansacarasa    | alternana | enlaces $\alpha$ 1-3 y $\alpha$ 1-6                |
| <i>Streptococcus</i>             | mutans               | mutansacarasa       | mutana    | enlaces $\alpha$ 1-3 y ramificaciones $\alpha$ 1-6 |
|                                  | dover                | glucosiltransferasa | glucano   | enlaces $\alpha$ 1-6 y ramificaciones $\alpha$ 1-3 |

### 1.3.2 Estructura primaria

Las glucosiltransferasas de *L. mesenteroides* y de algunas especies de *Sptreptococcus* tienen en promedio 1500 aminoácidos y presentan pesos moleculares elevados de entre 150 y 200 kDa (Remaud-Simeon y col., 2000). A partir del análisis de la estructura primaria de estas enzimas se observa que como en la mayoría de las grandes proteínas, las glucosiltransferasas están organizadas en multidomínios (Figura 1.8). Cuatro regiones han sido identificadas: un péptido señal, un dominio variable en la región N-terminal, seguido de un dominio catalítico y en la región C-terminal un dominio denominado de unión al glucano (GBD) (Jacques et al., 1997).

TESIS CON  
FALLA DE COPIEN



**Figura 1.8** Representación esquemática de la estructura de las glucosiltransferasas.

**El péptido señal** tiene entre 35 y 39 aminoácidos. Todas las GTFs poseen péptido señal que está altamente conservado, presentando alrededor del 50% de identidad entre ellos. Una sola glucosiltransferasa descrita hasta la fecha no presenta péptido señal, la DSR-A de *L. mesenteroides* B-1299 (Monchois y col., 1996).

**El dominio variable** de aproximadamente 190 aminoácidos muestra, como su nombre lo indica, una alta variabilidad. Existen muy pocos estudios concernientes a su papel, aunque su alta variabilidad hace suponer que esta región no participa en la actividad enzimática (Abo y col., 1991). Esto lo confirma la existencia de la enzima DSR-A de *L. mesenteroides* B-1299 que es activa a pesar de que no presenta este dominio (Mochois y col., 1996). Además, la supresión de la región variable en la GTF-I de *Streptococcus downei* no implica la pérdida de la actividad enzimática (Monchois y col., 1999). Se ha propuesto que podría ser una "firma" específica para cada GTF debido precisamente a su alta variabilidad (Banas y col., 1994).

**El dominio catalítico** es altamente conservado y comprende alrededor de 900 aminoácidos (Banas, 1995). Este dominio contiene los aminoácidos implicados en la formación del intermediario glucosil-enzima, elemento central de las reacciones catalizadas por las glucosiltransferasas (Mooser y col., 1991). La relación estructural de esta región con las enzimas de la super familia de la  $\alpha$  amilasa

permitieron realizar estudios de predicción de estructura donde concluyen que las glucansacarosas tanto de *Leuconostoc* como de *Streptococcus* poseen un clásico dominio catalítico tipo barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (Devulapalle y col., 1997). Mac Gregor y col. (1996) concluyen que este dominio ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> presenta una permutación circular.

**El dominio de unión a glucano (GBD)** que tiene en promedio 500 aminoácidos, está compuesto por una serie de unidades de repetición que han sido designadas como A, B, C, D y N (Tabla 1.3) de acuerdo con su similitud en secuencia (Shiroza y Kuramitsu, 1995). El motivo A esta presente en todas las secuencias C-terminales de las glucosiltransferasas (Ferreti y col., 1987; Shiroza y col., 1987). Diferentes combinaciones de estas unidades de repetición se observan en las distintas enzimas. Estos motivos repetidos son comparables a los encontrados en las secuencias C-terminal de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* donde están involucrados en las interacciones con los oligosacáridos de receptores en células blanco (von Eichel-Streiber y col., 1992). A partir del análisis de secuencia de estas unidades de repetición, Giffard y Jacques (1994) propusieron que las unidades A, B, C y D presentan el motivo estructural YG, cuya estructura primaria es: NDGYFFxxxGH<sup>o</sup>x(G/N)xH<sup>o</sup>H<sup>o</sup>H<sup>o</sup>, donde x representa un amino ácido no conservado y H<sup>o</sup> es un amino ácido hidrofóbico.

**Tabla 1.3** Secuencias repetidas del dominio C-terminal de las glucosiltransferasas.

| Unidad de repetición | Secuencia consenso                               |
|----------------------|--------------------------------------------------|
| A                    | WYYFNxDGQAATGLQTIDGQTVFDDNGxQVKG                 |
| B                    | VNGKTYFFGSDGTAQTQANPKGQTFKDGSGVLRFYNLEGQYVSGSGWY |
| C                    | DGKIYFFDPDSGEVVKNRV                              |
| D                    | GGVKNADGTYSKY                                    |
| N                    | YFxAxQGxxxL                                      |

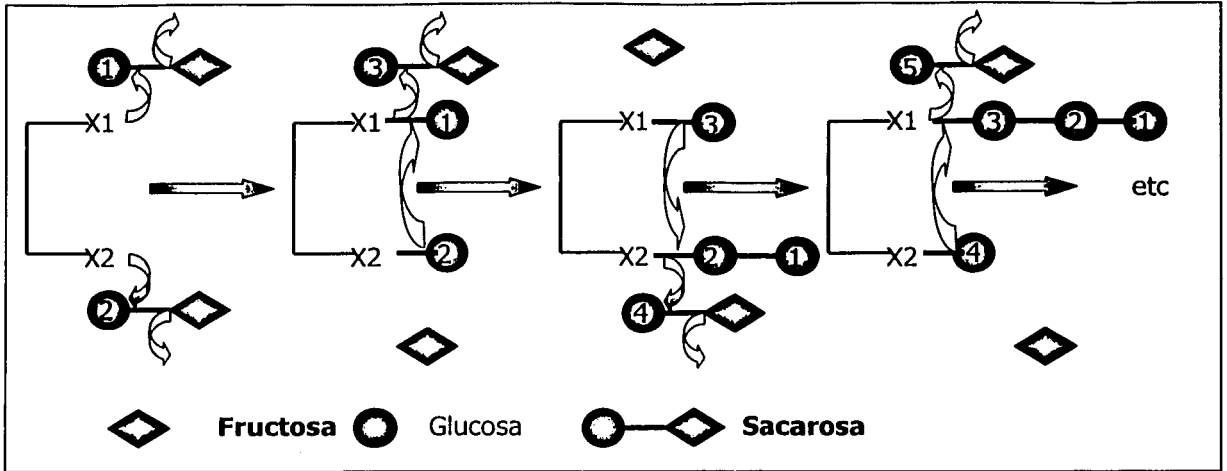
TESIS CON  
FALLA DE CUMPLIMIENTO

Este dominio en la GTF-I de *S. salivarius* ha sido estudiado a detalle. En estas enzimas el GBD está involucrado no solo en la unión de la proteína al glucano ya formado, sino que es requerido junto con el dominio catalítico para la polimerización de la glucosa, lo que se puso en evidencia al realizar deleciones secuenciales de aminoácidos del C- terminal en el GBD. Este proceso permitió observar primero la pérdida de síntesis de glucano, el incremento en la hidrólisis y en última instancia la pérdida de la actividad de hidrólisis de la sacarosa (Giffard y Jacques, 1994).

### *1.3.3 Mecanismo de reacción*

El mecanismo de reacción de las glucosiltransferasas es hasta la fecha sujeto de polémica. La hipótesis propuesta por Robyt y col. 1974 es la más difundida ya que explica diversos fenómenos que ocurren durante la reacción. Dicha propuesta supone un mecanismo en el que existen dos grupos nucleófilos (X1 y X2), grupos que atacarían a la sacarosa para producir un complejo con dos residuos glucosilo covalentemente unidos a los nucleófilos a través del C1. En pasos subsecuentes, el oxígeno del C6-OH de una de las moléculas de glucosa del complejo realizaría un ataque nucleofílico al C1 de la glucosa vecina para formar un enlace  $\alpha$  1-6. Esto ocasionaría la liberación de uno de los dos nucleófilos, lo que le permitiría atacar a una nueva molécula de sacarosa, para restaurar así el complejo entre la enzima y la glucosa. El grupo C6-OH de la nueva glucosa incorporada, atacaría al C1 del grupo isomaltosil, formando un enlace  $\alpha$  1-6 adicional y dando lugar a un trisacárido (Figura 1.9).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



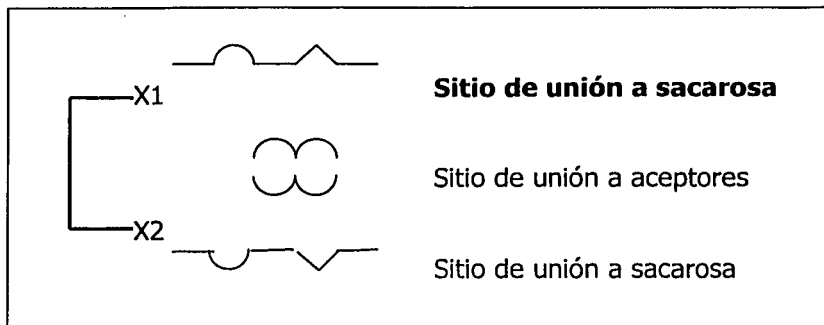
**Figura 1.9** Mecanismo de reacción propuesto por Robyt en 1974 para describir la síntesis de polímero.

Durante la síntesis, los dos grupos catalíticos formarían alternativamente complejos covalentes con la glucosa y con la dextrana. La cadena de dextrana crecería por la inserción de glucosa entre el grupo catalítico y el extremo reductor del polisacárido.

El proceso de crecimiento continúa hasta que la concentración de fructosa en el medio alcanza niveles tales que se hace posible la transferencia de cadenas de dextrana y/o del residuo glucosilo unido al sitio activo a la fructosa, deteniendo el crecimiento del polisacárido y liberándolo del sitio activo o formando leucrosa respectivamente.

En 1978, Robyt y Walseth proponen también un mecanismo para explicar las reacciones de aceptor. Para estas reacciones se postuló que un grupo hidroxilo del aceptor actúa como nucleófilo y desplaza tanto al grupo glucosilo como al grupo dextranosilo del sitio activo, formando con ellos un enlace  $\alpha$  1-6.

Tanriseven y Robyt en 1992, además de dilucidar el mecanismo de formación de dextrana, propusieron un modelo estructural para explicar los fenómenos observados con la dextransacarasa (DS). Su modelo contempla la presencia de dos sitios de unión a la sacarosa y otro de unión para aceptores, como se muestra en la figura 1.10. Esta conclusión fue derivada de observar que aceptores eficientes no inhiben competitivamente la unión de la sacarosa. De esta manera postuló la existencia de un sitio de unión para los aceptores separado del sitio de unión a la sacarosa.



**Figura 1.10** Modelo propuesto por Tanriseven y Robyt en 1992 para el sitio activo de la dextransacarasa de *L. mesenteroides* B-512.

De acuerdo con Tanriseven y Robyt, (1992), el sitio de unión a aceptores se encuentra entre los dos nucleófilos del sitio activo, de tal manera que la unión de un aceptor bloquea la inserción de una molécula de glucosa en la dextrana inhibiendo la síntesis del polisacárido y desviando las unidades de glucosa hacia la síntesis de productos de aceptor. Los aceptores pueden también reaccionar con los grupos dextranosilo unidos al sitio activo deteniendo así la síntesis del polisacárido.

TESIS CON  
FALLA DE OPINION



### **1.5. Similitudes y diferencias entre FTFs y GTFs**

Las FTFs bacterianas así como las GTFs son glicosiltransferasas que comparten características que las hacen muy parecidas. Sin embargo, al analizar detalladamente cada una de ellas encontramos también diferencias muy profundas que nos llevan a preguntarnos por qué estos dos tipos de enzimas tan distintas catalizan reacciones tan similares utilizando mecanismos diferentes.

Como se observa en las figuras 1.3 y 1.7 tanto las FTFs como las GTFs realizan reacciones similares además de utilizar el mismo sustrato. Producen un polímero transfiriendo uno de los monómeros de la sacarosa a la cadena de polisacárido en crecimiento y liberando el otro al medio de reacción; ambas son capaces también de transferir el monómero de sacarosa para el cual son específicas al agua y en presencia de otros azúcares como maltosa de utilizarlo como aceptor catalizando la síntesis de oligosacáridos.

Las FTFs bacterianas han sido ampliamente estudiadas y muchos son los microorganismos productores (Tabla 3.3). Sin embargo, solo en algunos géneros se ha observado la presencia de las dos enzimas. *Leuconostoc* es un género que se caracteriza por la producción de GTFs, sin embargo existen reportes de presencia de FTFs en este género aunque en muy bajas proporciones en comparación con las GTFs (Miller y col, 1986). Por esta razón han sido muy poco estudiadas hasta la fecha. *Streptococcus* es otro género bacteriano en el cual se han descrito ambas actividades (Jacques, 1995). Además se han reportado tanto inulosacarasas como levansacarasas (Heyer y col, 1998). En *Lactobacillus reuteri* cepa 121 se observó la producción de expopolisacáridos tipo fructanas y dextranas (van Geel-Schutten y col., 1999; Sacha A. col, 2001), y se han descrito ya los genes que codifican para GTFs y FTFs de este microorganismo (Kralj y col., 2002, van Hijum y col., 2002). En conclusión, ambas enzimas se encuentran en los

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mismos microorganismos produciendo polímeros similares, pero guardando cada una características muy diferentes. Sin embargo, mientras que un amplio número de géneros producen FTFs, aquellos que producen GTFs producen ambas enzimas.

En cuanto a la estructura, y a pesar de que no se ha cristalizado ninguna de las dos, existen estudios sobre predicción de la estructura donde se concluye que el dominio catalítico de las GTFs es un barril  $(\beta/\alpha)_8$ , mientras que el de las FTFs es una  $\beta$ -propela. Esta es una diferencia profunda entre las dos que evidencia un origen diferente, aunque resulta curioso el hecho de que las dos coincidan en un solo microorganismo. En este mismo sentido es interesante haber encontrado una enzima que comparte características tanto estructurales como funcionales de ambos tipos de actividades.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# OBJETIVOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

•Caracterizar a la inulosacarasa de la cepa CW28 de *Leuconostoc citreum* y el gen que la codifica para ubicarla en el contexto de las glicosiltransferasas

### **Objetivos particulares**

- Estudiar a la inulosacarasa asociada a células y en solución.
- Aislar el gen que codifica para la inulosacarasa de la cepa CW28 de *L. citreum*.
- Secuenciar el gen de esta enzima.
- Analizar la secuencia obtenida
- Expresar la proteína en *E. coli*.

TESIS CON  
FALLA DE CUBIEN

# MATERIALES y MÉTODOS

TESIS CON  
FALLA DE COCEN

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cepas, condiciones de crecimiento y medios de cultivo

La cepa de *L. citreum* CW28 fue obtenida de la colección de cepas aisladas del pozol por la Dra. Carmen Wachter Rodarte de la Facultad de Química, UNAM. Las condiciones de crecimiento de *Leuconostoc* son: 30°C y 200 rpm en el medio de cultivo cuya composición se muestra en la tabla 2.1, con 20 g/l de sacarosa como fuente de carbono la que se sustituyó por glucosa para prevenir la síntesis de polímero cuando las células se utilizaron para extracción de DNA. El pH del medio es ajustado a 6.9 al inicio de la fermentación.

**Tabla 2.1** Composición del medio de cultivo para *L. citreum* CW28.

| Componente                           | Concentración (g/l) |
|--------------------------------------|---------------------|
| sacarosa/glucosa                     | 20                  |
| Extracto de levadura                 | 20                  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 20                  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.2                 |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.05                |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.01                |
| MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.01                |
| NaCl                                 | 0.01                |

TESIS COM  
FALLA DE ... EN

La cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  fue utilizada como huésped para las clonaciones realizadas en este estudio. El genotipo de esta cepa es:  $\Delta(mcr A)183$ ,  $\Delta(mcr CB-hsd SMR-mrr)173$ , *end A1*, *sup E44*, *thi-1*, *rec A1*, *gyr A96*, *rel A1*, *lac*, [F' *pro AB*, *lacI*<sup>q</sup> $\Delta$ M15,Tn10(*tet*<sup>r</sup>)]. La cepa creció a 37°C y 250 rpm en medio Luria-Bertani (LB)

(Ausubel y col. 2001). El medio se adicionó con 200 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml kanamicina cuando así se requirió para mantener los plásmidos, 1.5 % de agar fue adicionado al medio para la preparación de placas.

## **2.2. Producción de la inulosacarasa en *L. citreum* CW28**

Se realizaron fermentaciones en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo estéril a 30 °C y 200 rpm para producción del inóculo a partir de células almacenadas en glicerol. Posteriormente se inoculó una fermentación de 500 ml en un matraz Fernbach (2.8 L) a 30 °C y 200 rpm. Durante la fermentación se realizó un seguimiento del crecimiento celular midiendo la densidad óptica del cultivo a 650 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Al final de la fermentación se recuperaron las células por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con buffer de fosfato de potasio pH 6.5 y se resuspendieron en el mismo buffer. La concentración de insolubles se determinó por peso seco tomando una alícuota de 5 ml.

## **2.3. Síntesis de inulina**

El polímero se sintetizó en un volumen de reacción de 100 ml a una concentración de sacarosa de 100 g/l a 30 °C y pH 6.5 con una actividad enzimática de 1 U/ml utilizando células completas.

Al término de la reacción el polímero se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Beckman J2-HS. El polímero se resuspendió en el mismo volumen y se repitió el procedimiento, esta vez el polímero se resuspendió en 5 ml de agua y se dializó contra agua destilada durante 24 horas, posteriormente se liofilizó. El análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se realizó en el Instituto de Química de la UNAM.

TESIS CON  
FALLA DE CUBIERTA

## 2.4. Extracción de la inulosacarasa de *L. citreum* CW28

Para extraer la inulosacarasa de la células de *L. citreum* se probaron tres estrategias que a continuación se detallan:

- a) **Sonicación de las células de *L. citreum*.** Una vez que las células fueron cultivadas en un volumen de 500 ml y lavadas en buffer de fosfato de potasio, se resuspendieron en 5 ml del mismo buffer. Las células se sonicaron manteniéndolas en frío en un sonicador Bradson Sonifier 250 con 4 pulsos de 10 segundo cada uno e intervalos de 3 minutos. Posteriormente se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante (SN). La determinación de actividad se realizó tanto en restos celulares como en el SN.
- b) **Tratamiento con lisozima.** Una vez que las células fueron cultivadas en un volumen de 500 ml y lavadas en buffer de fosfato de potasio, se resuspendieron en 10 ml del mismo buffer y se adicionó lisozima a una concentración de 2 mg/ml durante 8 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron y se recuperó el SN. La determinación de actividad se realizó tanto en restos celulares como en el SN.
- c) **Tratamiento con urea 8M.** Una vez que las células fueron cultivadas en un volumen de 500 ml, lavadas en buffer de fosfato de potasio, y resuspendidas en 12.5 ml de una solución 8 M de urea, se incubaron a 25 °C durante 1 hora (Hamada y col., 1989). Posteriormente se centrifugaron a 15000 rpm 10 minutos a 4 °C y se recuperó el SN que se dializó contra buffer de fosfatos 10 mM pH 6.5 a 4 °C durante 24 horas. La determinación de actividad se realizó tanto en restos celulares como en el SN dializado.

TESIS CON  
FALLA DE CUBIERTA



## **2.5. Determinación de la actividad enzimática**

La determinación de la actividad inulosacarasa se realizó cuantificando los azúcares reductores liberados durante la reacción en presencia de 100 g/l de sacarosa a 30 °C en buffer de fosfato de potasio pH 6.5. El poder reductor se determinó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) reportado por Summer y Howell, en 1935.

La reacción enzimática se realizó utilizando las células completas, la enzima solubilizada por medio del tratamiento con urea 8 M, o los extractos enzimáticos obtenidos a partir de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

## **2.6. Electroforesis de proteínas**

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Se utilizó una cámara Mighty small II, con geles de 1mm de espesor. Un gel concentrador al 4 % precede al gel de separación al 6%. Las muestras a analizar se incubaron durante 5 minutos a 95 °C en presencia de una solución de desnaturalización que contiene Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 % y azul de bromofenol 0.05 %. La migración se efectuó a amperaje constante de entre 30 y 50 mA. Después de la migración el gel puede seguir alguno de los dos tratamientos siguientes:

- a) **Coloración de proteínas con azul de Coomassie.** El gel se incubó en una solución de ácido acético (10% v/v), metanol (30% v/v) y azul de Coomassie (0.2% v/v). Posteriormente se realizaron lavados del gel en una solución de ácido acético (10% v/v), metanol (30% v/v) para quitar el exceso de colorante.
- b) **Coloración con reactivo de Schiff.** El gel se lavó tres veces 30 minutos en buffer de fosfatos pH 6.5 con tween 80 (1% v/v) a

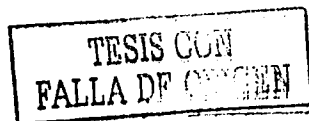
temperatura ambiente. En seguida se incubó en la misma solución adicionada con sacarosa o rafinosa (100 g/l) toda la noche a temperatura ambiente. La aparición de bandas blancas corresponde a la síntesis de polímero producido por la enzima. El polímero se fijó incubando el gel 30 minutos en una solución de etanol 75% v/v, después se incubó durante 1 hora en una solución de ácido periódico 0.7% p/v y ácido acético 5% v/v. Posteriormente se realizaron tres lavados de 20 minutos cada uno con una solución de metabisulfito de sodio 0.2% p/v y ácido acético 5% v/v. Al final, el gel se puso en contacto con el reactivo de Schiff hasta la aparición del color. El exceso de colorante se eliminó por un lavado en una solución metabisulfito de sodio 0.5% p/v y ácido acético 5% v/v.

## **2.7. Cuantificación de proteína.**

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando el kit Bio-Rad (Hércules, CA) y albúmina sérica bovina (fracción V, SIGMA), como estándar.

## **2.8. Determinación del pH y temperatura óptimos y constantes cinéticas.**

Se realizó una serie de reacciones enzimáticas a diferentes valores de pH y a temperatura de 30°C, utilizando buffers de acetatos y de fosfatos 50mM. Se realizaron también ensayos a diferentes temperaturas utilizando buffer de fosfatos 50mM y pH 6.5. En ambos casos se utilizó una concentración de sacarosa de 100g/l y una actividad enzimática de 1U/ml. Los ensayos se realizaron por duplicado y se monitorearon siguiendo la liberación de azúcares reductores por el método DNS.



Para conocer la estabilidad de la enzima, ésta se incubó a diferentes temperaturas por un tiempo que va desde los 30 a los 150 minutos. Cada 30 minutos se determinó la actividad enzimática a 30 °C y pH 6.5 con una concentración de sustrato de 100 g/l.

Para la determinación de las constantes cinéticas se realizaron reacciones a diferentes concentraciones de sustrato, midiendo las velocidades iniciales de reacción.

## **2.9. Reacciones de aceptor**

La síntesis de los oligosacáridos se realizó a una temperatura de 30°C y pH de 6.5 conteniendo 100 g/l de sacarosa empleando maltosa o lactosa como aceptor en una relación sacarosa/aceptor de 2. La reacción se mantuvo hasta el consumo total de la sacarosa. Posteriormente se separaron las células por centrifugación, los productos de la reacción fueron analizados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando una columna de sílica aminada para análisis de carbohidratos NOVA-PACK Waters-Millipore, bajo las siguientes condiciones: fase móvil: acetonitrilo:agua 80:20, flujo: 1 ml/min, detector de índice de refracción (IR 410) a 35°C.

## **2.10. Secuenciación de péptidos de la IS**

- a) **El amino terminal.** La inulosacarasa de *L. citreum* fue purificada por SDS-PAGE; y transferida a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Ausubel y col., 2001). Posteriormente se tiñó con solución S Ponceau (0.5% Ponceau S y 1% ácido acético) y la banda correspondiente a la inulosacarasa fue cortada y sujeta a un análisis de secuenciación en la Universidad de Harvard.

- b) **Péptidos internos.** La inulosacarasa de *L. citreum* fue purificada por SDS-PAGE; una parte fue teñida con azul de Coomassie y la otra tratada para ver actividad *in situ*. La banda correspondiente a la IS fue cortada del gel teñido con azul de Coomassie y se sometió a una digestión por endoproteasas. Los péptidos obtenidos fueron separados por HPLC, el análisis de secuenciación se realizó en el laboratorio de micro-secuenciación de proteínas del Instituto Pasteur.

### **2.11. Purificación de DNA genómico de *L. citreum***

La extracción del DNA genómico de *L. citreum* CW28 se realizó a partir de un cultivo de 50 ml que creció durante toda la noche en el medio descrito en la tabla 2.1 usando glucosa como fuente de carbono. Las células se colectaron por centrifugación 10 minutos a 5000 rpm y se resuspendieron en 10 ml de buffer TE 50/20 para lavarlas. Se centrifugaron y resuspendieron en 4.5 ml del mismo buffer adicionado con 50  $\mu$ l de RNAsa (10mg/ml), se mezcló bien y se agregaron 500  $\mu$ l de lisozima (10mg/ml en TE), se incubó 30 minutos a 37°C. Posteriormente se adicionaron 50  $\mu$ l de Proteínasa K (20mg/ml de agua), se incubó 15 minutos a 37°C y se adicionaron 500  $\mu$ l SDS (10%) y se volvió a incubar a la misma temperatura por 30 minutos más. Se agregó NaCl (5 M) 1 ml, se agitó por inversión y se incubó 5 minutos a 65°C, finalmente se adicionó bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB)/NaCl 800  $\mu$ l, se mezcló muy bien por inversión y se incubó por 10 minutos a 65°C. Posteriormente se extrajo con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), agitando por inversión. Se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm. Se extrajo dos veces más con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:24:1), se extrajo una vez más sólo con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) para remover los restos de fenol. Se precipitó adicionando 0.6 volúmenes de isopropanol e incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por

15 minutos a 12000 rpm. Se lavó la pastilla tres veces con 1 ml de etanol al 70% sin vortexear, la pastilla finalmente se resuspendió en 30-70  $\mu$ l de TE o EB.

El CTAB se preparó disolviendo 4.1 g de NaCl en 80 ml de agua. Lentamente se agregaron 10 g de CTAB con calentamiento y agitación. Cuando se disolvió se ajustó el volumen a 100 ml con agua miliQ. El buffer TE se preparó adicionando 8 ml de TRIS 1 M pH 8.0 y 2 ml de EDTA 0.25 M aforando a 100 ml con agua miliQ.

## **2.12. Purificación de DNA plasmídico**

El DNA plasmídico de *L. citreum* se extrajo a partir de un cultivo de 5 ml que creció durante toda la noche en el medio descrito en la tabla 2.1 usando glucosa como fuente de carbono. Las células se colectaron por centrifugación 10 minutos a 5000 rpm y se resuspendieron en 1 ml de buffer SET (sacarosa 20%, 50 mM de Tris-HCl pH 7.6 y 50 mM de EDTA) para lavar. Se centrifugaron y resuspendieron en 150  $\mu$ l ml del mismo buffer adicionado lizozima a una concentración de 1mg/ml. Se incubaron por 1 hora a 37°C. Posteriormente se adicionaron 5  $\mu$ l de RNAsa (10 mg/ml) agitando y 350  $\mu$ l de SDS (2 %)/NaOH (0.4 M) 50:50, se mezcló e incubó en un baño de hielo por 10 minutos. Se agregaron 250  $\mu$ l de 3 M de acetato de sodio pH 4.8 y se mezcló antes de incubar en hielo por 30 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 4 °C y el SN se transfirió a un tubo limpio, para precipitar se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló muy bien por inversión y se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm. La pastilla se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en 30  $\mu$ l de buffer TE o agua.

El DNA de plásmido de *E. coli* se extrajo con el Kit de QIAGEN siguiendo las indicaciones del proveedor a partir de cultivos de 5 ml crecidos en medio LB adicionados con el antibiótico requerido para cada plásmido.

### 2.13. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para obtener las amplificaciones de los fragmentos de PCR durante el aislamiento del gen y para la preparación de las sondas se utilizó la enzima Deep Vent DNA polymerase (New England BioLabs). Las amplificaciones realizadas que fueron clonadas en los vectores TOPO fueron amplificadas con Elongase Enzyme Mix (Invitrogen) que deja una A necesaria para la reacción de topoisomerización

De manera general, las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 20  $\mu$ l con 100  $\mu$ M de dNTP's, 20 pM de oligonucleótidos y 1.5 mM de  $Mg^{2+}$  en el caso de las reacciones realizadas con la enzima Elongase, para el caso de las realizadas con Deep Vent se utilizó una concentración de 2 mM de  $Mg^{2+}$ , 1X del buffer indicado por el proveedor de la enzima y agua hasta el volumen deseado. Las reacciones se realizaron en un Termociclador RoboCycler Gradient 96 Stratagene.

Los ciclos de amplificación del DNA fueron diferentes de acuerdo con la enzima que se utilizó, las  $T_m$  de los oligonucleótidos adecuados en cada caso y el tamaño de los fragmentos a amplificar (tabla 2.2).

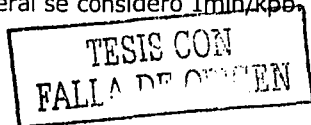
**Tabla 2.2** Pasos para la amplificación de los fragmentos de DNA.

| No de ciclos | Etapa             | Tiempo                | Temperatura           |
|--------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1            | desnaturalización | 30 s                  | 94°C                  |
|              | desnaturalización | 15 s                  | 94°C                  |
| 30-35        | alineamiento      | 1 min                 | variable <sup>a</sup> |
|              | extensión         | variable <sup>b</sup> | 68 ó 72               |
| 1            | extensión final   | 7 min                 | 68 ó 72               |

a: La temperatura de alineamiento depende de la  $T_m$  de los oligos utilizados. Las  $T_m$  de alineamiento variaron entre los 58 y los 68°C.

b: Los tiempos de extensión variaron según el tamaño del fragmento a amplificar.

En general se consideró 1min/kpb.



Para analizar los productos obtenidos en las PCRs, se corrieron 5  $\mu$ l de cada uno en geles de agarosa al 0.8%. Los oligonucleótidos utilizados en el presente estudio fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de Oligonucleotidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM y se listan en la tabla 2.3.

**Tabla 2.3** Oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de este estudio. Donde **K**= G o T; **R**= A o G; **M**= A o C y **Y**= C o T.

| Oligo                                                                                         | Secuencia (5' a 3')                | Longitud |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------|
| <b>Para el aislamiento del gen <i>isl</i></b>                                                 |                                    |          |
| 28IS                                                                                          | GATGKTGGGATAGYTGGGCKTTRCAAGAT      | 30mero   |
| 29IS                                                                                          | ATCRACAAAYTGMGCMCCMGCTTCACCATATGG  | 33amero  |
| 539IS                                                                                         | CCATATGGTGAAGCGGGGGCGCAGTTTGTTCGAT | 33amero  |
| 868IS                                                                                         | CCCTTAAGCTTGCAAAGCACGCTTATCAATCCA  | 33amero  |
| 128rIS                                                                                        | ATCTTGTAAACGCCCAACTATCCCACACATC    | 30mero   |
| 42rIS                                                                                         | GCAAGTGGTCTTTGCTTTAATGGGAGC        | 27amero  |
| 963IS                                                                                         | CCATCCCCTTCAAATAAAATATGATCA        | 27amero  |
| <b>Para la clonación del gen <i>isl</i> y las versiones truncadas en el vector pCR 4-TOPO</b> |                                    |          |
| 11PIS                                                                                         | GCTATGGCGTCATGCAGGAACCACTTTATC     | 30mero   |
| 385IS                                                                                         | CTAATTTAAATCGCGTGAAAAGCTAATGGC     | 30mero   |
| 384IS                                                                                         | CCTAAGAGTGATCATCATCTCCCCAAACCC     | 30mero   |
| <b>Para la clonación del gen <i>isl</i> y las versiones truncadas en el vector pBAD/TOPO</b>  |                                    |          |
| ISdirecto                                                                                     | AAGCAACAAGAAAGCATGGCTCGAAAAAAC     | 31amero  |
| ISreverso                                                                                     | CCCTTAAGCTTGCAAAGCACGCTAATGAATCCA  | 33amero  |
| E2reverso                                                                                     | AGCATTTAAATCGCGTGAAAAGCTAATGGC     | 30mero   |
| E3reverso                                                                                     | CTATAGAGTGATCATCATCTCCCCAAACCC     | 30mero   |

Los oligonucleótidos degenerados 28IS y 29IS se diseñaron en base a los dos péptidos secuenciados a partir de la proteína purificada, tomando en cuenta el uso preferencial de codones de *L. citreum* y buscando que en las posiciones de los extremos de los oligonucleótidos no hubiera degeneraciones.

#### **2.14. PCR inversa**

La diferencia entre una PCR clásica y una PCR inversa reside principalmente en los oligonucleótidos y el templado. Los oligonucleótidos empleados son divergentes con respecto a la secuencia de DNA que se va a amplificar. Por otro lado el templado consiste en fragmentos circularizados de DNA genómico de *L. citreum* CW28. La reacción da como resultado la síntesis de un fragmento linearizado (Argüello-Morales, 2000b). En la figura 2.1 se ejemplifica la estrategia de PCR inversa utilizada en este estudio. Primero se realizó un mapa de restricción del fragmento ya conocido del gen *isl*, posteriormente se digirió el DNA genómico de *L. citreum* con las enzimas que lo cortan cerca del 5' del fragmento conocido, con estas digestiones se corrió un gel de electroforesis que posteriormente se transfirió para realizar un Southern blot.

Con la enzima *HindIII* se esperaba, según el mapa de restricción, un fragmento de 150pb, otro de 1480pb y uno de tamaño desconocido que sería el de interés. Una vez hecho lo anterior se realizó una ligación sobre esa misma digestión a fin de que se circularizaran los fragmentos, y utilizando oligonucleótidos específicos a la región conocida del gen se realizó la PCR con la que obtuvimos el fragmento esperado que posteriormente se mandó secuenciar (Medigenomix GmbH, Lochhamer).

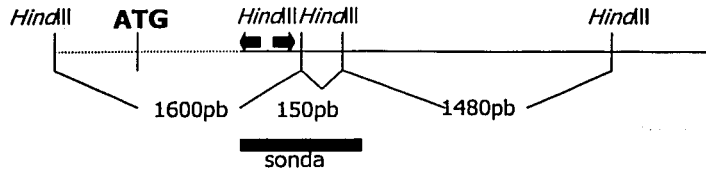
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Gen *isl***

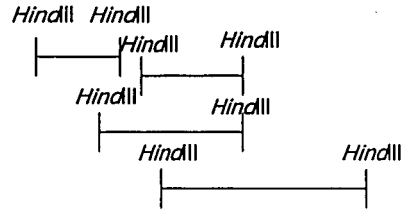
Región a amplificar con  
la PCR inversa

Secuencia conocida

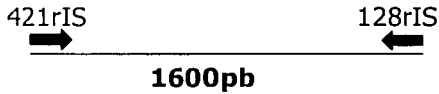
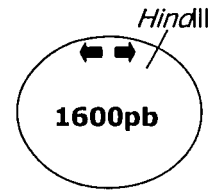


DNA genómico de *L. citreum*.

**Digestión total con *Hind*III**



**Ligación de los fragmentos *Hind*III**



**PCR inversa**

**Figura 2.1.** Estrategia utilizada en la PCR inversa para obtener el 5' del gen *isl* de *L. citreum* así como la región promotora del mismo.

TESIS CON  
FALLA DE CUBIEN

### **2.15. Hibridación del DNA**

Cuando se realizaron experimentos de hibridación en membranas de nylon Hybond-N para los experimentos tipo Southern se utilizó la siguiente solución de hibridación:

|          |            |
|----------|------------|
| SSC      | 5X         |
| Denhardt | 5X         |
| SDS      | 0.5% (p/v) |

Las membranas se prehibridaron durante 1 hora a 65°C. Posteriormente se incubaron toda la noche a 65°C después de añadir la sonda correspondiente marcada radioactivamente. A la mañana siguiente las sondas se lavaron con una solución de SDS 0.1% y SSC 2X.

La sonda utilizada se marcó radioactivamente utilizando el Kit para marcage de sondas Random Prime Labelling System Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech, UK.)

La detección de las señales de hibridación se realizó exponiendo las membranas (sin permitir su deshidratación) a una placa de detección "Phosphor screen" (Molecular Dynamics) para su análisis en un aparato PhosphorImager (Molecular Dynamics).

### **2.16. Secuenciación**

Las secuencias obtenidas en este trabajo se realizaron en un secuenciador automático Applied Biosystem 3100 en la Unidad de Secuenciación Automática de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos, México) o en Medigenomix GmbH (Lochhamer, Alemania).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **2.17. Transformación de *E. coli***

La cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  fue transformada por electroporación en un aparato Micropulser Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en las siguientes condiciones: 2.5 kV, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ .

De 2 a 5  $\mu$ l de ligación se pusieron en contacto con 100  $\mu$ l de las células electrocompetentes en una cubeta de 0.2 mm, después de la electroporación la cubeta fue puesta en hielo y se le agregó 1 ml de medio SOC, las células se transfirieron a un tubo eppendorf y fueron incubadas por 1 hora a 37°C y 250 rpm para que se recuperaran. Posteriormente se plaquearon en cajas de LB con el antibiótico adecuado.

### **2.18. Expresión del gen *isl* y las versiones truncadas en el C-terminal en *E. coli*.**

Para la expresión del gen *isl* se diseñaron los oligonucleótidos 11PIS localizado en el nucleótido 56 y el 868IS localizado al final del gen (Tabla 2.3). Con estos oligonucleótidos se amplificó un fragmento de 5007 pb en cual se clonó en el vector pCR 4-TOPO (Invitrogen, Calsbad, CA), resultando el plásmido recombinante pCRIS . La construcción del plásmido fue confirmada por análisis de secuencia de una sola hebra de DNA del inserto.

Para las deleciones del carboxilo terminal de la proteína se diseñaron los oligonucleótidos 385IS y 384IS (Tabla 2.3), con el primero y el 11pIS se amplificó un fragmento de 3333 pb. Este fragmento carece de la región de alta identidad con la alternansacarasa y fue clonado en el vector pCR 4-TOPO, el plásmido resultante se denominó pCRIS2. Con los oligonucleótidos 384IS y 11pIS se amplificó un fragmento de 2731 pb, en este caso se eliminó, además de la región

de alta identidad con la ASR, un fragmento extra de 602 pb que es una región con muy baja identidad con la ASR y que denominamos "región de transición". Este producto fue clonado en el vector pCR 4-TOPO resultando el plásmido pCRIS3 y los tres plásmidos obtenidos fueron transformados por electroporación en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Las tres cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contienen los plásmidos pCRIS, pCRIS2 y pCRIS3 se crecieron durante toda la noche en 50 ml de medio líquido LB conteniendo 50  $\mu$ g/ml de kanamicina. Las células cultivadas fueron separadas por centrifugación 10 minutos a 4°C y 5000 rpm. La pastilla se lavó con buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 y se resuspendió en el mismo buffer, las células se rompieron por sonicación manteniéndolas en frío en un sonicador Bradson Sonifier 250 con 4 pulsos de 10 segundos cada uno e intervalos de 3 minutos. Posteriormente se centrifugaron y se recuperó el SN. La determinación de actividad se realizó en el SN.

Posteriormente se diseñaron los oligonucleótidos ISdirecto, ISreverso, E2reverso y E3reverso con los que se amplificaron las dos versiones truncadas del gen y el gen completo, pero sin la región promotora. Estos fragmentos se clonaron en el vector pBAD/TOPO el cual es un vector de expresión que tiene un promotor inducido por arabinosa y deja colas de histidina para facilitar la purificación de la proteína. Los plásmidos resultantes se denominaron pBIS, en el caso del gen completo; pBE2, para el fragmento con la delección de la región de alta identidad con la AS y pBE3 para el fragmento con esa delección mas la región de transición. *E. coli* DH5 $\alpha$  fue transformada con estos plásmidos y las células fueron crecidas en medio líquido LB con 200  $\mu$ g/ml de ampicilina y 0.02 % de arabinosa como inductor. Posteriormente se trataron por sonicación para la determinación de actividad enzimática como ya se describió

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **2.19. Análisis de las secuencias obtenidas**

Los alineamientos entre secuencias de aminoácidos se realizaron con el programa Clustal W. Las comparaciones de las secuencias tanto nucleotídicas como de aminoácidos con las bases de datos se realizaron utilizando las distintas versiones Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

El uso preferencial de codones de *L. citreum* se obtuvo en la base de datos Codon Usage Database del Kazuka DNA Research Institute, Chiba, Japón ([www.Kazusa.or.jp/codon/](http://www.Kazusa.or.jp/codon/)).

La región promotora putativa fue predicha por el programa Neural Network Promoter Prediction, ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)).

El péptido señal fue predicho por el programa diseñado por Nielsen y col. en 1997

El dominio conservado de la familia 68 de las glicosilhidrolasas fue identificado en la inulosacarasa de *L. citreum* utilizando la base de datos pfam 7.8. (<http://pfam.wustl.edu/>)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# RESULTADOS y DISCUSIÓN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

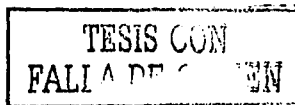
49-A

### **3. RESULTADOS**

Como antecedente a este trabajo se realizó un "screening" de actividades glucosiltransferasas de una colección de 14 cepas identificadas como *Leuconostoc mesenteroides* (Olivares-Illana, 1998). Estas cepas fueron aisladas del "pozol" por el grupo de la Dr. Carmen Wacher Rodarte en la Facultad de Química (Wacher-Rodarte, 1995). Sorprendentemente en una de ellas, denominada CW28 se encontró actividad fructosiltransferasa asociada a células, es decir unida en la parte exterior de la pared celular. *Leuconostoc* es un género en el que se han estudiado extensivamente glucosiltransferasas y sus productos de reacción, las dextranas. Existen reportes de actividades fructosiltransferasa en este género, sin embargo, no han sido estudiadas debido a que se encuentran en cantidades muy bajas con respecto a las GTF y se consideraban como actividades contaminantes de éstas Miller y col, 1986). La cepa CW28 únicamente produce una actividad FTF asociada a células, específicamente inulosacarasa.

En la primera parte de este trabajo se presenta la caracterización de la IS de la cepa CW28 identificada posteriormente mediante secuenciación del RNA ribosomal como *Leuconostoc citreum*.

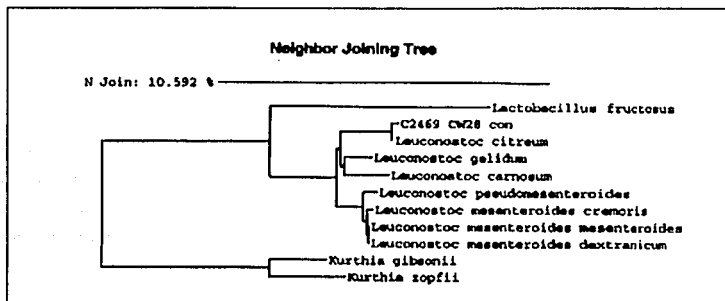
En la segunda parte de este trabajo se detallan las características del gen *isl* de *L. citreum* así como de la estructura primaria de la proteína. La secuencia obtenida en este trabajo se depositó en la base de datos GenBank con el número de acceso AY191311.



### 3.1. Caracterización bioquímica.

#### 3.1.1. Identificación de la cepa CW28 como *L. citreum*.

En trabajos anteriores la cepa CW28 fue caracterizada bioquímicamente por pruebas Api 50 CH, siendo identificada como *L. mesenteroides* con un 96% de probabilidad (Olivares-Illana, 1998). Sin embargo, durante la realización del presente estudio, se observaron algunas características que la diferencian de otras cepas trabajadas en el laboratorio e identificadas como *L. mesenteroides*, como su color amarillo. Se decidió entonces realizar un análisis de secuencia de rRNA 16S. En la figura 3.1 se muestran los resultados obtenidos del análisis filogenético de la cepa CW28, de donde se desprende que existe una mayor cercanía con *L. citreum*, la cual produce un pigmento amarillo (Farrow y col. 1989) que coincide con el fenotipo encontrado para esta cepa. Es interesante mencionar que cepas reportadas con anterioridad como *L. mesenteroides* han sido reclasificadas como *L. citreum* entre las que se encuentran cepas de la colección NRRL como la B-742, la B-1501 y la B-1355, las dos últimas reportadas como productoras de alternansacarosas. *L. citreum* fue descrito por primera vez por Farrow y col. en 1989, casi al mismo tiempo Schillinger y col. (1989), reportaron por primera vez a *Leuconostoc amelibiosum* y no es sino hasta 1992, donde Takahashi y col. concluyen que *L. amelibiosum* es sinónimo de *L. citreum*, y propusieron que el nombre de *Leuconostoc citreum* debe ser retenido.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 3.1 Análisis filogenético del rRNA 16s de la cepa CW28 de *Leuconostoc*.

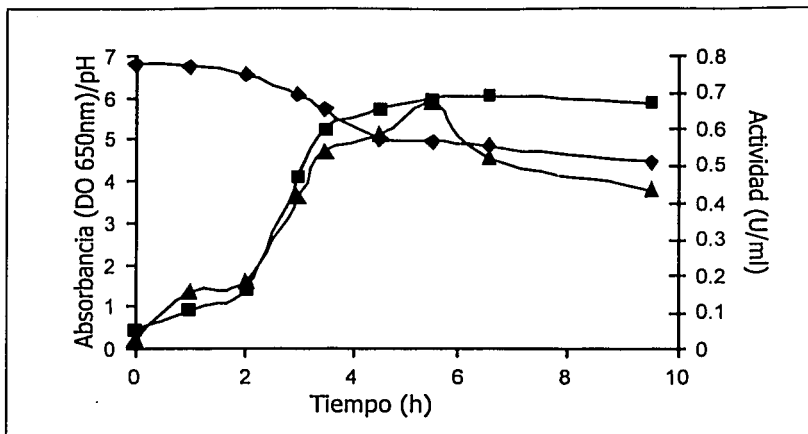


**3.1.2. Producción de la inulosacarasa de la cepa CW28 de *L. citreum***

En el medio de cultivo descrito en la sección de materiales y métodos se creció la cepa de *L. citreum* CW28. En la figura 3.2 se muestra una curva típica de crecimiento, donde también se observa que la actividad IS esta asociada al crecimiento celular mostrando un valor máximo 0.7 U/ml alrededor de las 5 horas de fermentación. Al final de la fermentación la actividad decae resultado de una acidificación del medio de cultivo debida a la producción de ácidos orgánicos, principalmente de ácido láctico. Es importante mencionar que la IS esta asociada a las células y que no se encontró actividad en el sobrenadante de la fermentación.

Cuando al medio de cultivo se le agrega como fuente de carbono glucosa en lugar de sacarosa, la actividad IS no se detecta por el método utilizado (DNS). Se ha reportado que las FTF de microorganismos Gram negativos son constitutivas, mientras que las de Gram positivos son por lo general inducidas por la sacarosa (su sustrato). Una excepción es la FTF de *Actinomyces naeslundii* reportada por Bergeron y col (2000).

TESIS CON  
FALLA DE CONTEN



**Figura 3.2** Curva de crecimiento típica de *L. citreum* CW28. Producción de IS y cambio en el pH del medio de cultivo.

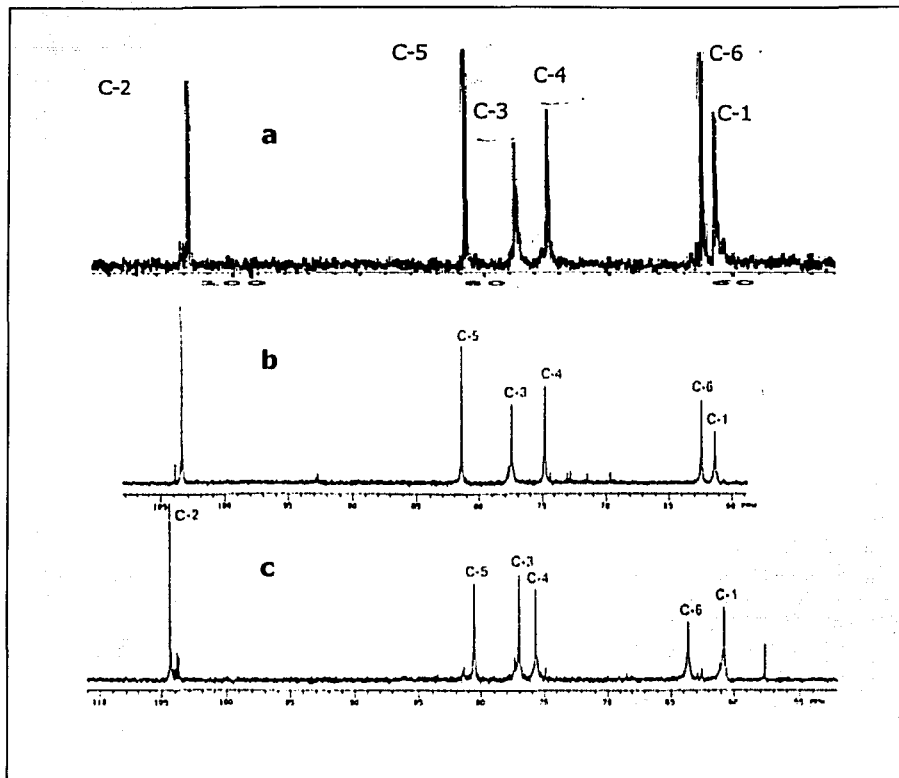
### 3.1.3. Síntesis de inulina

El polímero producido por la IS asociada a las células fue analizado por Resonancia Magnética Nuclear ( $^{13}\text{C}$ -RMN). El espectro corresponde a un polímero de fructosa con enlaces  $\beta$  2-1 y ramificaciones en  $\beta$  2-6, que es la estructura usualmente encontrada en la inulina (figura 3.3).

Seis principales picos de resonancia en 103.6, 81.8, 77.5, 74.9, 62.7 y 61.4 ppm fueron encontrados, los cuales son similares a los reportados por Shimamura y col. en 1987 para la inulina (tabla 3.1). En el polímero de la cepa CW28, el carbono anomérico C2 y los carbonos primarios C1 y C6 son muy cercanos a los presentados por la inulina, al igual que los carbonos del anillo C3 y C5, solo el C4 se acerca más al mostrado por la levana (tabla 3.1). Este resultado genera evidencia de que el polímero producido por la cepa CW28 es inulina. Sin embargo, para confirmar este resultado el polímero fue digerido con inulinasa una enzima comercial de Fluka producida por *Aspergillus niger*, que hidroliza específicamente los enlaces  $\beta$  2-1 presentes en la inulina usando como control levana, la cual no

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

fue digerida, por lo que podemos concluir que, el polímero producido por *L. citreum* CW28 es inulina.



**Figura 3.3** Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN de fructanas. a) polímero producido por la cepa CW28 de *L. citreum*, b) inulina Shimamura 1987 c) levana Shimamura 1987.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 3.1** Desplazamientos químicos del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de inulina, levana y el polímero producido por *L. citreum* CW28.

| átomo de carbono | Desplazamientos químicos (ppm)    |                     |                      |
|------------------|-----------------------------------|---------------------|----------------------|
|                  | Inulina <i>L. citreum</i><br>CW28 | Levana <sup>a</sup> | Inulina <sup>a</sup> |
| C-1              | 61.4                              | 60.7                | 60.9                 |
| C-2              | 103.6                             | 104.2               | 103.3                |
| C-3              | 77.5                              | 76.3                | 77.0                 |
| C-4              | 74.9                              | 75.2                | 74.3                 |
| C-5              | 81.8                              | 80.3                | 81.1                 |
| C-6              | 62.7                              | 63.4                | 62.2                 |

<sup>a</sup> Shimamura,1987.

#### 3.1.4. Solubilización de la IS

Para extraer la inulosacarasa de las células de *L. citreum* CW28 y solubilizarla se probaron varios protocolos como son: la sonicación de las células, tratamientos con lisozima y tratamientos con urea. En el primer caso se pierde por completo la actividad IS, ya que posterior al tratamiento no se detectó la actividad IS ni en sobrenadante ni en los restos celulares, esto se podría deber a la liberación de las proteasas de *L. citreum* que entonces podrían actuar sobre la enzima. En el segundo caso, después del tratamiento con lisozima, no se detectó tampoco actividad ni en el sobrenadante ni en restos celulares, lo que probablemente se deba a que al romper las células y liberar el contenido citoplasmático las proteasas presentes se liberen actuando sobre la enzima. Para verificar lo anterior se realizó una medición de actividad proteolítica en el sobrenadante de este tratamiento utilizando el reactivo Hide Powder Azure obteniéndose 187  $U_{\text{tripsina}}/\text{ml}$ . Una  $U_{\text{tripsina}}$  equivale al cambio de absorbancia producida por 1ng de tripsina en 16 horas a

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

37°C y pH 8. El tercer protocolo consistió en un tratamiento con urea 8 M (Hamada y col. 1989), que resultó exitoso, ya que a pesar de obtener el mayor porcentaje de actividad en los restos celulares (60%) y que el 30% se pierde, probablemente debido a que parte de la enzima no se renaturaliza, el 10% de la actividad fue recuperada en sobrenadante y fue suficiente para realizar las determinaciones posteriores.

**3.1.5. Propiedades de la IS soluble y asociada a células**

Una vez que se obtuvo la enzima en solución se investigaron las condiciones óptimas de reacción para las dos formas de la enzima. En la tabla 3.2 se muestra una comparación de las características de la IS de *L. citreum* unida a células y solubilizada por medio del tratamiento con urea 8M.

**Tabla 3.2** Comparación de las características mostradas de la IS asociada a células y de la solubilizada con urea 8M.

| Características       | Asociada a células | En solución |
|-----------------------|--------------------|-------------|
| PH                    | 6.5                | 6.5         |
| T óptima (°C)         | 45                 | 35          |
| K <sub>map</sub> (Mm) | 66                 | 38          |
| Reacciones de aceptor | No                 | Sí          |
| Producción de inulina | Sí                 | Sí          |

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

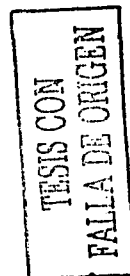
El valor de pH óptimo resultó ser de 6.5 tanto para la enzima en solución como para la asociada a células. La temperatura óptima para la enzima asociada a células fue 10°C mayor que la óptima encontrada para enzima la libre. Es probable que este resultado se deba a que la enzima en solución resultó menos estable que la enzima asociada a células. La K<sub>map</sub> de la enzima libre es 38 mM, mientras que para la enzima asociada a células, la K<sub>map</sub> resultó de 66 mM, diferencia

probablemente debida a resistencias difusionales que controlan la reacción ya que al estar unida a las células, el polímero producido se concentre al rededor de la célula-enzima lo que dificulta el acceso de la sacarosa al sitio activo.

Una propiedad común para las FTFs es la capacidad de transferir el residuo fructosilo a ciertas moléculas aceptoras, como lo reporta Ohtsuka y col., 1992. Se encontró que la IS de *L. citreum* al estar en solución tiene una muy baja eficiencia para transferir el residuo fructosilo hacia la maltosa y la lactosa. Sin embargo, al estar asociada a células es incapaz de realizar esta transferencia ya que, la fructosa de la sacarosa es transferida hacia el polímero aunque en el medio de reacción se encuentren presentes otras moléculas que podrían actuar como aceptoras. Esto puede tener su origen en impedimentos estéricos en la enzima asociada a células, debido entre otras causas a la posibilidad de que existan sitios potenciales de reconocimiento a aceptores que puedan volverse accesibles solo cuando la IS es solubilizada. Sin embargo, en ambos casos la enzima es capaz de producir inulina.

Si bien las FTFs bacterianas tienen características similares, al realizar una comparación entre éstas y la FTF de *L. citreum* encontramos diferencias significativas (Tabla 3.3). Un ejemplo de ello se refiere a la localización de la enzima: las FTFs son extracelulares con excepción de las producidas por *Streptococcus* las cuales sólo son extracelulares en presencia de sacarosa. En cuanto al peso molecular, el reportado para estas enzimas se encuentra en el rango de los 40-80 kDa con excepción de la FTF de *S. salivarius* que presenta un peso molecular de 140 kDa. Sin embargo, la FTF de *L. citreum* tiene un peso molecular de 165 kDa calculado por SDS-PAGE, el mas grande reportado a la fecha para estas enzimas.

Otra diferencia sobresaliente es la capacidad de síntesis de oligofructósidos (FOS) en reacciones de aceptor: como ya se mencionó, la FTF de *L. citreum* es incapaz



de producir FOS a menos que la enzima sea solubilizada, mientras que se trata de una propiedad común de las FTFs.

Observando estas diferencias surgieron algunas preguntas como ¿Cuáles son las diferencias estructurales que dan lugar al tamaño tan grande de la IS de *L. citreum*?, ¿Por qué esta enzima no es capaz de producir FOS en reacciones de aceptor? ¿A que se debe que algunas FTFs produzcan levana y otras inulina?. Para tratar de responder a estas preguntas se requiere profundizar en el estudio de la relación estructura/función, por lo que se decidió aislar el gen que codifica para esta enzima y realizar un análisis comparativo con las secuencias FTFs reportadas.

TESIS CON  
FALLA DE CUBIEN

Tabla 3.3 Comparación de las propiedades de las FTF producidas por algunas bacterias.

| Organismo                       | enzima | Localización              | Masa molecular | pH     | T óptima | K <sub>map</sub> | Producción   | Reacciones de aceptor | Referencias      |
|---------------------------------|--------|---------------------------|----------------|--------|----------|------------------|--------------|-----------------------|------------------|
|                                 |        | celular                   | (kDa)          | óptimo | (°C)     | (mM)             |              |                       |                  |
| <i>B. subtilis</i>              | LS     | extracelular              | 50             | 6.5    | 45       | 18               | inducida     | sí                    | Chambert, 1999   |
| <i>B. circulans</i>             | LS     | extracelular              | 52             | 6.5    | 40       | 20               | -            | sí                    | Perez, 1996      |
| <i>B. thobacter</i>             | LS     | extracelular              | 58, 65         | 5.0    | -        | 11.8±1.4         | constitutiva | sí                    | Arrieta, 1999    |
| <i>B. thotropicus</i>           |        |                           |                |        |          |                  |              |                       | Betancourt, 1999 |
| <i>B. thnella aquatilis</i>     | LS     | extracelular              | 64             | 6.0    | 55-60    | 50               | -            | -                     | Ohtsuka, 1992    |
| <i>B. thomonas mobilis</i>      | LS     | extracelular              | 47             | 5.0    | 50       | 122              | -            | -                     | Kyono, 1995      |
| <i>B. thvinia herbicola</i>     | LS     | extracelular              | -              | -      | -        | -                | constitutiva | -                     | Cote, 1988       |
| <i>B. thudomonas. syringae</i>  | LS     |                           |                |        |          |                  |              |                       | Hettwer, 1995;   |
| <i>B. thphaseolicola</i>        |        | extracelular              | 45             | 6.2    | 18       | 160              | constitutiva | -                     | Hettwer, 1998    |
| <i>B. thobacillus reuteri</i>   | IS     | extracelular <sup>a</sup> | 87             | -      | -        | -                | constitutiva | -                     | van Hijum, 2000  |
| <i>B. thnutans</i>              | IS     | extracelular              | 74, 80, 87, 90 | -      | -        | 12±1             | constitutiva | -                     | Jacques, 1999    |
|                                 |        |                           |                |        |          |                  |              |                       | Shimamura, 1999  |
|                                 |        |                           |                |        |          |                  |              |                       | Sato, 1986       |
| <i>B. thalivarius</i>           | LS     | extracelular <sup>a</sup> | 140            | -      | -        | -                | constitutiva | -                     | Jacques, 1993    |
| <i>B. thLeuconostoc citreum</i> | IS     | asociada a                | 165            | 6.5    | 45       | 66               | inducida     | no                    | Olivares-Illar   |
| <b>CW28</b>                     |        | <b>células</b>            |                |        |          |                  |              |                       | <b>2002</b>      |

<sup>a</sup> Extracelular en presencia de sacarosa.

- No reportado

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### 3.2. Caracterización molecular.

#### 3.2.1. Librerías genómicas

Para la obtención de la secuencia nucleotídica de la inulosacarasa de *L. citreum* (*is*), se siguieron varias estrategias. La primera de ellas fue la construcción de librerías genómicas de *L. citreum*. Al realizar las digestiones parciales del DNA genómico con *Sau*BAI que reconoce el sitio de restricción GATC se observó que si bien la enzima digiere el DNA de *L. mesenteroides* B-512, no es capaz de digerir el DNA de *L. citreum*. Se realizaron digestiones con diferentes enzimas, encontrándose que ninguna de las que reconocen el sitio GATC fue capaz de digerir el DNA de *L. citreum*, lo que indica la presencia de una posible modificación del DNA de la cepa CW28 de *L. citreum* en este sitio. Es sabido que en una gran variedad de microorganismos tanto procariotes como eucariotes, el DNA está modificado por metilaciones. En procariotes estas metilaciones están identificadas como elementos de sistemas de modificación/restricción y su función es la de proteger al DNA del hospedero de digestión por sus mismas enzimas de restricción. Las modificaciones más conocidas son: metilación tipo Dam en la A de la secuencia GATC; metilación tipo Dcm en la segunda C de las secuencias CCAGG y CCTGG. *Sau*BAI es capaz de digerir aún en secuencias metiladas Dam, por lo que la modificación que impide la digestión por esta enzima no es de este tipo. Aunque el trabajo no continuó en esta dirección, sería interesante conocer el tipo de modificación presente en el DNA de *L. citreum*.

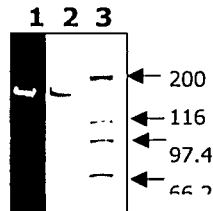
Durante la realización de las librerías genómicas, las cuales se realizaron utilizando el cósmido pCP13 en *E. coli* DH5 $\alpha$ , el DNA de *L. citreum* CW28 se digirió con la enzima de restricción *Eco*RI y se recuperaron los fragmentos de 9 a 23 kpb a partir de geles de agarosa. No se obtuvieron resultados favorables, esto se debió quizás al método de selección que se utilizó el cual consistió en crecer las librerías en LB adicionado con sacarosa para ver la síntesis de polímero, y un fenotipo de colonias

mucoides, pero no se encontró por este método ninguna clona positiva. El gen codificante para la enzima es muy grande, aproximadamente 4500 pb, para observar actividad por este método de selección se requería que el gen estuviera completo y además era necesario clonarlo con su propia región promotora lo que implicaba un grado de dificultad mayor. Posteriormente en el laboratorio se realizaron experimentos con la dextransacaras de la cepa B-512 de *L. mesenteroides*, utilizando este mismo método de "screening" comprobándose entonces que el fenotipo de colonias mucoides esperadas por la producción de polímero por la presencia de sacarosa en el medio no es claro por lo que se descartó esta estrategia.

**3.2.2. Purificación de la proteína y secuenciación de dos péptidos.**

Con el fin de aislar el gen a través del diseño de oligonucleótidos basados en regiones conocidas de la proteína, se purificó la IS mediante electroforesis en gel de acrilamida. Una parte de este gel se tiñó con azul de coomassie y la otra se trató con tween 80 y sacarosa 5% para observar actividad *in situ* y así asegurarnos que la enzima teñida con Coomassie era la misma que presentaba la actividad productora de polímero (figura 3.4).

Esta banda de proteína se cortó y se mandaron secuenciar dos péptidos a partir de fragmentos obtenidos por hidrólisis con una endoproteasa.



**Figura 3.4** Purificación de la IS de *L. citreum* por PAGE-SDS. Carril 1. Células completas donde se observa una banda de producción de polímero. Carril 2. Células completas teñidas con azul de coomassie. Carril 3. Marcadores de peso molecular.

Los péptidos secuenciados fueron comparados con la base de datos BLASTp, el primero de 13aa (MDVWDSWALQDKS), mostró identidad con el inicio de diferentes genes de levansacarasa mientras que el segundo, de 15 aa (TAPYGEAGAQFVDYV) es idéntico con el carboxilo terminal de la alternansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 (Argüello-Morales, 2000b).

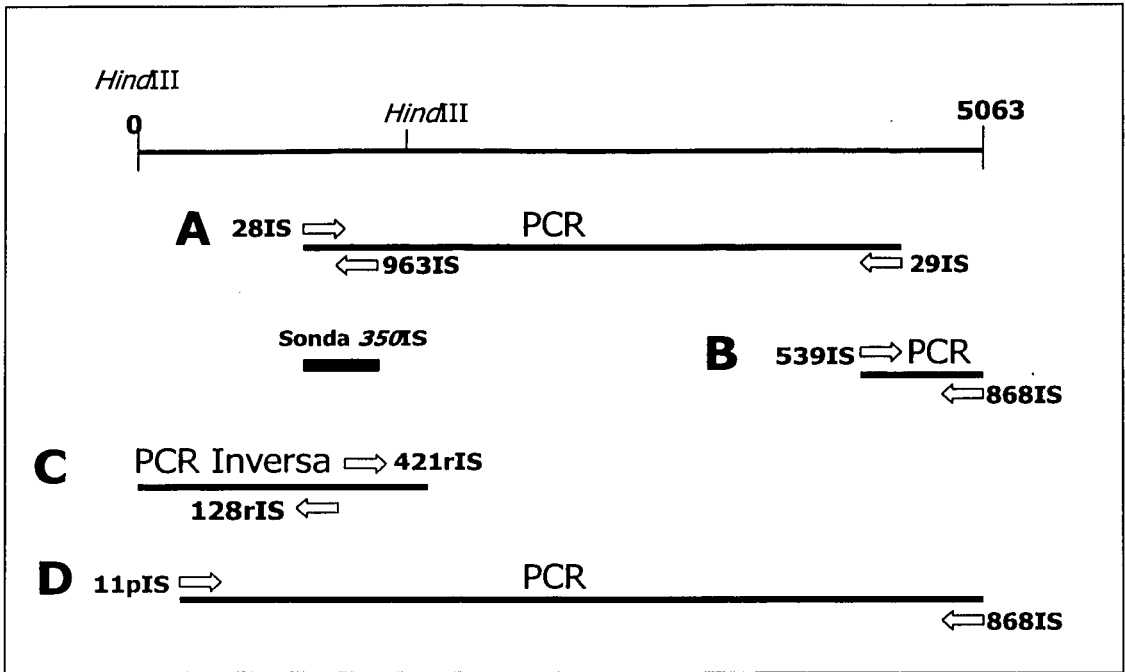
### **3.2.3. Aislamiento del gen *isl***

A partir de la secuencia de estos péptidos se diseñaron dos oligonucleótidos degenerados tomando en cuenta el uso de codones de *L. citreum*: el 28IS y 29IS respectivamente (Tabla 2.3) con los que se amplificó una banda de aproximadamente 3000 pb (Figura 3.5A).

Al obtener la secuencia nucleotídica de este fragmento se encontró que la región C-terminal es 80% idéntica al gen de la ASR en la región del carboxilo terminal del gen codificante para esta enzima. Debido a esta gran similitud se decidió diseñar los oligonucleótidos 868IS a partir del final del gen de la alternansacarasa y el 539IS (Tabla 2.3), con los que se amplificó un fragmento de 450 pb (Figura 3.5B) donde se encuentra el extremo 3' del gen *isl*. Al mismo tiempo se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos 28IS y 868IS con los que se amplificó un fragmento de aproximadamente 3445 pb. Lo anterior se realizó para comprobar que efectivamente este fragmento de 445 pb corresponde al gen de la IS. Es importante hacer notar que en el oligonucleótido 868IS se introdujo el codón de término de acuerdo a la secuencia de la ASR, asumiendo, de acuerdo a la alta identidad que en esta región presenta la IS con la ASR, que corresponde al codón de término en la IS.

Para obtener la secuencia 5' de este gen se decidió realizar una PCR inversa, por lo que se diseñó la sonda 350IS (Figura 3.5) utilizando los oligonucleótidos 28IS y

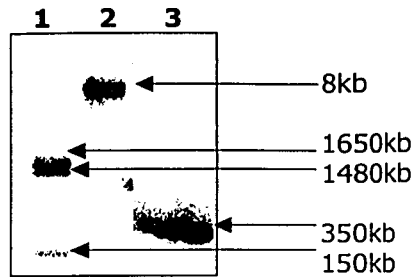
963IS (Tabla 2.3), se digirió el DNA genómico de *L. citreum* con las enzimas *Hind*III y *Eco*RV, que de acuerdo a un mapa de restricción realizado al fragmento ya conocido lo cortan.



**Figura 3.5** Estrategia usada para el aislamiento del gen *is/a* a partir del DNA genómico de *L. citreum*

Como se observa en la figura 3.6. En el caso de la digestión total con *Eco*RV, una banda de 8 kpb hibridizó con la sonda utilizada, para *Hind*III se esperaba un fragmento de 150 pb otro de 1480 pb y uno mas de tamaño desconocido que sería el de interés. El tamaño de este fragmento resultó de 1600 pb aproximadamente, en el que se ubica la secuencia faltante para completar el gen y muy probablemente la región reguladora del mismo. Se decidió utilizar la digestión total *Hind*III ya que el tamaño del fragmento deseado es menor y por lo tanto mas fácil de manejar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



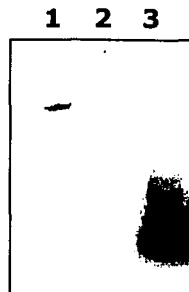
**Figura 3.6.** Análisis de Southern blott realizado con fragmentos de DNA genómico de la cepa CW28 de *Leuconostoc citreum* digerido con: 1) *Hind*III; 2) *Eco*RV. La hibridación se realizó utilizando la sonda 350IS mostrada en el carril 3.

Se realizó una ligación de los fragmentos obtenidos a partir de la digestión total *Hind*III y ésta se usó como templado para la reacción de PCR inversa con los oligos 128rIS y 42rIS (Tabla 3.3.). La reacción amplificó un fragmento del tamaño esperado (1600 pb) como se observa en la figura 3.5C. Posteriormente se diseñó el oligonucleótido 11pIS (Tabla 3.3) y junto con el 868IS se amplificó un producto de PCR de 5007 pb que incluye el gen completo y su región promotora (Figura 3.5D). Este fragmento se clonó en el vector pCR-4TÓPO dando origen al plásmido pCRIS. A partir del pCRIS se secuenció una hebra del fragmento de 5063 pb.

#### 3.2.4. Localización del gen *isl* en el genoma de *L. citreum*

Con el fin de determinar si el gen de la IS se encuentra localizado en plásmidos o en cromosoma, se purificó DNA genómico de *L. citreum* y por otro lado se realizó un aislamiento de plásmidos confirmando que la cepa CW28 posee DNA extracromosomal. Para ubicar el gen *isl* dentro del genoma de *L. citreum* se realizó el análisis de Southern blot mostrado en la figura 3.7 donde se observa que la sonda 350IS no hibrida con los plásmidos, lo que sugiere que el gen *isl* se encuentra en el cromosoma, aunque no se puede descartar la posible existencia de megaplásmidos en esta bacteria y la presencia del gen *isl* en estos cuerpos extracromosomales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 3.7** Análisis de Southern blot en el que se muestra que la sonda hibrida con el DNA genómico de la cepa CW28 de *Leuconostoc citreum*. 1) DNA genómico; 2) DNA plasmídico; 3) sonda 350IS.

### 3.2.5. Análisis de la secuencia nucleotídica

La secuencia nucleotídica del gen *isl* contiene 37.25% de G+C lo que es consistente con el valor reportado por Kim y col (2000) para el género *Leuconostoc*. El análisis de la secuencia muestra un marco abierto de lectura de 4473 pb, comenzando en el nucleótido 591. Se encontró una secuencia consenso del sitio de unión a ribosoma (RBS) AGGGAG 8 pb arriba del codon de inicio ATG. Esta secuencia de unión a ribosoma se encontró también a la misma distancia del ATG en la alternansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-1355.

Según lo predicho por el programa *Neural Network Promoter Prediction*, una región promotora putativa puede ser identificada 34 pb arriba del codon de inicio, con las secuencia -10 TATAGT y -35 TTGTAAC las cuales están a 19 nucleótidos de distancia entre ellas. La secuencia del gen *isl* así como de la proteína se presentan a continuación:

TESIS CON  
FALLA DE CISEEN



TGATGAATTAGCAAAAAGATTTCGA AAGTAGCAACAAGTGATGAATTAGCAA 1050  
 D E L A K D S K V A T S D E L A

AAGATTTCGAAAAGTAGCAACAAGTGATGAATTAGCAAAAAGATTTCGAAAAGTA 1100  
 K D S K V A T S D E L A K D S K V

GCAACAAGTGATGAATTGGCAAAAAGATTTCGAAGGCACCGACAAATGATGT 1150  
 A T S D E L A K D S K A P T N D V

ATCAGTGAGAGCGGAGAAAAAATCTTCATTAATTGACTCACCCAGAGTTAA 1200  
 S V R A E K K S S L I D S P E L

ACGTCAAAATGTCGGAAAATGACTAGTGTGCCAAATCTTATATCTGACGAA 1250  
 N V K M S E M T S V P N L I S D E

AATCTTAAAAATTTAGTCAATTCCTAATGAACATAAACCAGGATTATCAA 1300  
 N S K N L V N S N E L I N G L S K

AAGATCTTTAGAAAATAGCTCATCAAGCTGGAATAGATGTTTCTAGGTTAA 1350  
 R S L E I A H Q A G I D V S R L

ATGACATACAAAAAGCAGCTTTAAATAAAAATAAATAGTCAATGAAGAT 1400  
 N D I Q K A A L N K I K L V N E D

GGGAATAAGTATGTACTAGATAATACAGGTTCTGATTACACTAAAAATAC 1450  
 G N K Y V L D N T G S D Y T K N T

CATTATTGATAAAAAATAATCCTGATGATACAACATAAACAACACACATTA 1500  
 I I D K N N P D D T T K T T H I

CATTTGCCAATTTAGATGATGCTATTAAGCTAGCGCAA AAACCAGACCCA 1550  
 T F A N L D D A I K L A O K P D P

AAA ACTACTATTCTGTATTCAATGCTTCTCAAATTAACAATTTGCCTGC 1600  
 K T T I P V F N A S O I N N L P A

ATCGATATTTAAAAGATGCACAAACTAACAAAAGTTGAAAAGATGGATGTTT 1650  
 S I F K D A Q T N K V E K M D V

GGGATAGTTGGGCGTTACAGGATTCAAAAGACAGGTGAAGTATACAATTAT 1700  
 W D S W A L D D S K T G E V Y N Y

CATGGAAAAGCAAGTGGTCTTTGCTTTAATGGGAGCACCTTTAGTACAAGG 1750  
 H G K Q V V F A L M G A P L V O G

TGATACTCACATA TATATGTTATATAATAATTATAATAATGCAAAAGCTTG 1800  
 D T H I Y M L Y N N Y N N A K L

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



ACGGATGGGTTAATGCTGGTCCTGTGTTTGGTTATAAATGCAAAACCCGAG 1850  
 D G W V N A G P V F G Y N A K P E

AGTCAAGAATGGTCAGGATCAGCAGTCGTTAACAGTGATGACAGTATACA 1900  
 S O E W S G S A V V N S D D S I O

ATTATTTTATACTAGGGTAGCAGATGATTGGAAGCAAGCTTTGGCCACTG 1950  
 L F Y T R V A D D W K O A L A T

TCAACATAAAAATCACTAACTCTGAAAATTCACITGGAATTCAAAGTTTG 2000  
 V N I K I T N S E N S L G I O S L

CAA AATGATCATA TTTTATTTGAAGGGGATGGTTATTTTATTCTCGAAA 2050  
 O N D H I L F E G D G Y F Y S R K

AGATCAGTTAAAGCCTCAAGCCGATATGTTTACATTAAGGGATCCAAAAT 2100  
 D O L K P O A D M F T L R D P K

TAA TAGAACTTGATGATGGTGAGAGATATCTTACGTTTGAAGCAAATACT 2150  
 L I E L D D G E R Y L T F E A N T

GGAATATATGATGAAGCAAGTGACCAACAAACTGTCAATTTAAATAATTA 2200  
 G I Y D E A S D O O T V N L N N Y

CGGTGGTGGATTAACGTATGATGTAGCCAGAATGTTGGGAGTTGTAAATA 2250  
 G G G L T Y D V A R M L G V V N

ATTCAAACAGAGCGCTATACTCATCAACAGCGAATGGTGCGATTGGATTA 2300  
 N S N R A L Y S S T A N G A I G L

CTAAAGTTAAAGGGAGATTATTTAATCCGATTTTAGACAGGCTATATAA 2350  
 L K L K G D Y F N P I L D R L Y K

ACCGTTAATCACAGCAGTAGGGGTTACTGATGAGATTGAACGTGCAAATA 2400  
 P L I T A V G V T D E I E R A N

TTGTGCCATTTAATGGTAAATACTATTTGTTTACTGACTCTCGTTTTAAT 2450  
 I V P F N G K Y Y L F T D S R F N

AGAAGTGCAGCTGATAATTCTCCAATGAGCATGGCTCCTGATGGAGCTAT 2500  
 R S A A D N S P M S M A P D G A M

GATGATGGGATTTGTCTCAGATTCITTTATTTGGAGATTATAAGCCATTAA 2550  
 M M G F V S D S L F G D Y K P L

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

ATGGGAATGGCATTGTTTTGGTGACCAATAATTCATTTACGTCAAGAA CA 2600  
 N G N G I V L V T N N S F T S R T

AACACCTATTCATGGTATACTGTTCTCTGTAAAAGGACGTC CAGATTGAT 2650  
 N T Y S W Y T V P V K G R P D L M

GTTAGTAACTTCATATATGACAAATAGAGGTTTTAGCGTCAGGAACAGACC 2700  
 L V T S Y M T N R G L A S G T D

AATACTCAACGTTTGCTCCGTCATTTCTACTGAAAATTGATGGCGACCAG 2750  
 O Y S T F A P S F L L K I D G D O

ACCCATGTA CTTAACACAGTTACTGAGCAAGGC GATTGGTTTGGGGAGA 2800  
 T H V L N T V T E O G D W V W G D

**384IS**

TGATGATCACTCTATAGTTGAGTTATTAGCATTGAATACTGAGGATGCTT 2850  
 D D H S I V E L L A L N T E D A

ATTTAACTAATAATCAAAAAGAATATCAACTATTCTCCAGACTGGAGTAAT 2900  
 Y L T N N O K N I N Y S P D W S N

ATTGATGGATATGGCTATCCTATCGTAACAAATATTAAGATGTTGATTT 2950  
 I D G Y G Y P I V T N I K D V D L

GACGTTTTATATTAGTGGTATATTGTCCCCCGATAGTCTGTTTTAAAAACG 3000  
 T F Y I S G I L S P D S L F K N

CCCCTGGTAGACATCAAGGAGCTCGAATTATTGGTTCAACGTCTCAATAT 3050  
 A P G R H O G A R I I G S T S O Y

AATACTGAAAAAGTCTCAGCTATCAAAGAATATACAGATGATTTAAACAC 3100  
 N T E K V S A I K E Y T D D L N T

TATATGGTATTTAGTTAACCTAGCAGGAAACAATTTTTGGATTAAAGGTT 3150  
 I W Y L V N L A G N N F W I K G

CGTCATTAGTTACAGTACCCATGACAGATTCTACTTTTAGAAAATGCCTAC 3200  
 S S L V T V P M T D S T F R N A Y

ATTGTTAAGGATAGCGACATGTATCTAGATGCTCCTCAAGGGGAAACTAA 3250  
 I V K D S D M Y L D A P O G E T N

TGCTAAATACTACCAGTCTTCAAATAGTTATAATGATGCTTATGTAATTG 3300  
 A K Y Y O S S N S

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

TTGGTGGAGAATATAAAGATGCACATGGTATAACTTGGAAATTTGATAAAA 3350  
 V G G E Y K D A H G I T W N L I K

TTGAATGACAAAATATTATGGATTAATAAAAATTCACCTT ← 38515  
 L N D K I L W I N K N S L A I S F

TTCACGCGATTTAAATGCTAAAGCTTTTGTAATGCAACGAGTCGAAATG 3450  
 S R D L N A K A F V N A T S R N

ATGGGTTGTTTTAAATGCCCTTACCGACAAGTCGGGTCTGAGTTAGTC 3500  
 D G L F L N A P Y R Q V G S E L V

GGATTTACAAAAAATATAATGGACAAATAGTAGCTATCGATAAACAGTT 3550  
 G F T K K Y N G O I V A I D K O F

TTTTGATGATAAAGGAATTATTTGGAGTCAAGTGATAATAGACGGTCAAA 3600  
 F D D K G I I W S Q V I I D G O

AATTTTGGGTAGATAAATCGAGGACTAAATCAAGTTCAAACACAAGATGTG 3650  
 K F W V D N R G L N Q V O T O D V

AACAAAAA GTTGTATGTGAATAGTGCAAGTCAATCAGATGGCTTATTTCT 3700  
 N K K L Y V N S A S Q S D G L F L

AAATGCACCATATCGTGGGATAAATGCAAAACTGGTAGCAATGGCCAAAA 3750  
 N A P Y R G I N A K L V A M A K

CCTATAATGGTAGATATGTTAATGTCCTCAAACAAGGAAAAGACGCATAC 3800  
 T Y N G R Y V N V L K O G K D A Y

AATGTTAATTGGAGCCTTATAGAATTGGATGGTCAGTCCTGTGGATTGA 3850  
 N V N W S L I E L D G Q S L W I D

TAGTCAGGCATTGAATACCAATTTACACATGACATGAATCAA AAAGTCT 3900  
 S O A L N T N F T H D M N O K V

TTGTCAATACAAC TAGTAATCTTGATGGGTTATTCTTAAATGCGCCATAC 3950  
 F V N T T S N L D G L F L N A P Y

CGTCAACCAGGTTATAAGTTAGCCGGTTTGGCTAAAAATTACAACAACCA 4000  
 R O P G Y K L A G L A K N Y N N O

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

AACGGTTACCGTTAGTCAACAGTACTTTGATGATCAAGGCCACGGGCTGGA 4050  
 T V T V S O O Y F D D O G T G W

GTGAGGTTGTTCTTGGGGGTCAGACGGTCTGGGTTGATAACCATGCATTG 4100  
 S E V V L G G O T V W V D N H A L

GCA CAGATGCAAGTCAGTGATACAAGCC AACAGCTCTATGTGAATAGCAA 4150  
 A O M O V S D T S O O L Y V N S N

TGGTCGTAATGATGGGTTATTCTTGAATGCGCCATATCGTGGTCAAGGGT 4200  
 G R N D G L F L N A P Y R G O G

CACA ACTCATAGGCATGACGGCAGATTATAATGGGCAACATGTACAAGTG 4250  
 S O L I G M T A D Y N G O H V O V

ACCAAGCAAGGGCAAGATGCCTACGGTGCACAATGGCGTCTTATTACGCT 4300  
 T K O G O D A Y G A O W R L I T L

AAATAATCAACAGGCTCTGGGTTGATAGTCGCGCTTTGAGCACAACAATCA 4350  
 N N O O V W V D S R A L S T T I

TGCAAGCCATGAATGATGATATGTATGTGAATAGCAACCAACGGACAGAT 4400  
 M O A M N D D M Y V N S N O R T D

GGTTTGTGGTTAAACGCA CTTATACGATGAGTGGGGCTAAATGGGCTGG 4450  
 G L W L N A P Y T M S G A K W A G

TGATACGCGTTTGGCTAA TGGGCGCTATGTCCATATTTCAAAGCTTATT 4500  
 D T R L A N G R Y V H I S K A Y

CAAACGAAAGTCGGCAACA CATATTACTTGACGAATTTGAATGGTCAAAGC 4550  
 S N E V G N T Y Y L T N L N G O S

ACATGGATTGACAAGCGGGCATTACTGCGACCTTTGATCAGGTGGTGGC 4600  
 T W I D K R A F T A T F D O V V A

ATTAATGCAACGATTGTGGCAGCCAAACGACCAGATGGGATGTTTAAAGA 4650  
 L N A T I V A R O R P D G M F K

CAGCACCCATATGGGAAGCGGGGGCGCAGTTTGTGCGATTATGTGACAAAC 4700  
 T A P I W E A G A O F V D Y V T N

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

TATAACCAGCAAACCGTGCCAGTAACAAAGCAACATTCAGATGCTCAGGG 4750  
 Y N O Q T V P V T K Q H S D A Q G

TAAATCAATGGTACTTAGCGACAGTGAATGGGACACAATACTGGATTGATC 4800  
 N O W Y L A T V N G T D Y W I D

AACGGTCATTTTCACCAAGTAGTAACGAAGGTGGTTGATTATCAAGCTAAG 4850  
 O R S F S P V V T K V V D Y Q A K

ATTGTGCCACGGACAACACGTGATGGTGTGTTTAGTGGCGCACCCCTATGG 4900  
 I V P R T T R D G V F S G A P Y G

GGAAGTGAATGCTAAGCTAGTTAACATGGCAACTGCGTATCAAAATCAAG 4950  
 E V N A K L V N M A T A Y Q N O

TTGTCCATGCGACAGGAGAATATACGAATGCTTCAGGGATCACATGGAGT 5000  
 V V H A T G E Y T N A S G I T W S

CAGTTCGCGTTAAGCGGGCAAGAAGACAAGCTATGGATTGATAAGCGTGC 5050  
 Q F A L S G O E D K L W I D K R A

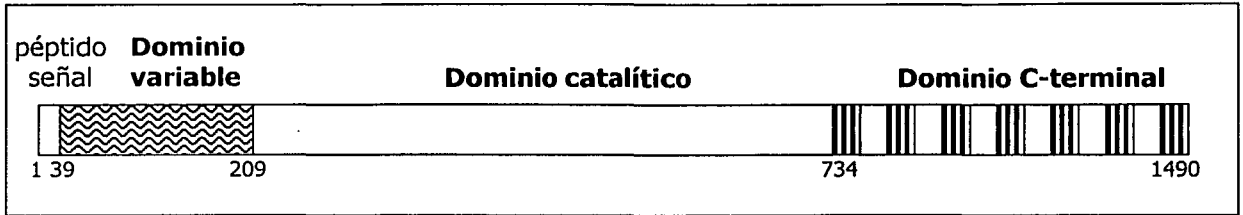
TTTGCAAGCTTAA 5063  
 L O A

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**3.2.6. Análisis de la secuencia de aminoácidos**

La inulosacarasa de *L. citreum* CW28 consiste de una secuencia de 1490 aminoácidos con un punto isoeléctrico de 5.09 y un peso molecular deducido de 165,137 Da, el mas alto reportado a la fecha para las FTFs. El análisis de la secuencia revela una alta identidad con las fructosiltransferasas de diferentes microorganismos en la región comprendida entre los aminoácidos 209 y 700 (figura 3.8). La región amino, que comprende de los amino ácido 1 al 138, al igual que la región carboxilo que va del aminoácido 940 al 1490 son homólogas a la alternansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 (Argüello-Morales, 2000b). De esta manera, se concluye que la estructura primaria de la IS de *L. citreum* esta

dividida en tres dominios (Figura 3.8): un dominio catalítico que abarca la secuencia completa de algunas FTF, y dos dominios homólogos a los dominios variable y de unión a polímero de la ASR, lo que da respuesta a una de las preguntas formuladas durante la caracterización bioquímica con respecto al elevado peso molecular de esta enzima.

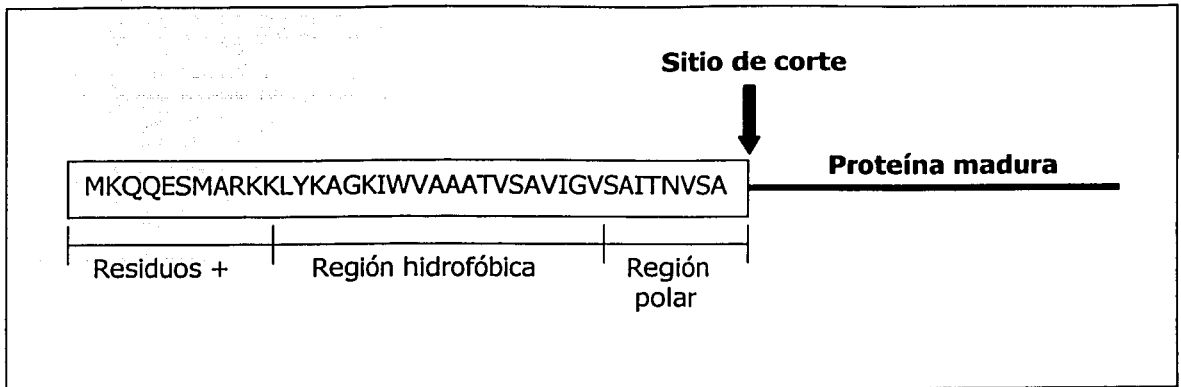


**Figura 3.8** Estructura primaria de la IS de *L. citreum* CW28.

**3.2.6.1. El péptido señal**

El análisis de la secuencia deducida de aminoácidos revela la presencia de un péptido señal típico de bacterias Gram positivas, se compone de tres dominios: una región con residuos cargados positivamente seguida de una región hidrofóbica y una región polar. Un sitio de división que sigue del amino ácido 39 fue predicho utilizando el programa diseñado por Nielsen y col. en 1997. Para confirmar este sitio de división se determinó la secuencia del N-terminal de la proteína madura después de una purificación mediante electroforesis en gel de acrilamida. Los primeros 10 aminoácidos de la proteína madura fueron identificados resultando la secuencia DVNQPLLAQK; con excepción del 10º residuo la secuencia es idéntica a la deducida para el sitio de corte predicho (Figura 3.9).

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACION



**Figura 3.9** Organización del péptido señal de la inulosacarasa de *L. citreum* CW28.

### 3.2.6.2. Dominio catalítico

Mediante alineamientos de la secuencia obtenida con la base de datos Blast se encontró similitud entre la región del dominio catalítico de la IS y las levansacararas bacterianas. Como se esperaba, la similitud fue mayor con las enzimas de géneros Gram positivos, como la LS de *Bacillus subtilis* (02730; 39% identidad y 56% positivas en 433 aminoácidos), la FTF de *S. salivarius* (Q55242; 36% identidad y 52% positivas en 714 aminoácidos) y la FTF de *S. mutans* (P11701; 31% identidad y 45% positivas en 784 aminoácidos). Menores porcentajes de identidad fueron encontrados con enzimas de bacterias Gram negativas como la LS de *Ewinia amylovora* (Q46656; 28% identidad y 44% positivas en 438 aminoácidos) y la LS de *Rahnella aquatilis* (O54435; 28% identidad y 43% positivas en 435 aminoácidos). Se encontró un motivo de 441 aminoácidos que es identificado con la familia 68 de las glicosilhidrolasas, que incluyen levansacararas e invertasas en la región que comprende del aminoácido 293 al 734 (pfam02435; <http://pfam.wustl.edu/>).

Alineamientos con FTF bacterianas muestran 8 cajas de identidad de secuencias conservadas (Pons y col., 2000). En la figura 3.10 se observan las cajas marcadas







3.2.6.3. Dominio variable y Carboxilo terminal

Como se mencionó con anterioridad las regiones del dominio variable y el carboxilo terminal presentan homología con la ASR de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 en los mismos dominios (Figuras 3.11a y 3.11b). Para el caso de la región variable se encontró un porcentaje de identidad del 36% (AJ250173: 36% identidad y 54% positivas en 140 aminoácidos), mientras que para el caso del C-terminal se encontró un porcentaje de identidad del 80% (AJ250173: 80% identidad y 86% positivas en 564 aminoácidos)

```

aslm          MKQQETVTRKKLYKSGKVVWAAATAFAVLGVSTVTVHADTNSNVAVKQINNTGTNDSGE 60
L.citreumIS  MKQQESMARKKLYKAGKIWVAAATVSAVIGVSAITNVSADVNQPLLAQEN-----FSGN 54
              *****:*****:**:*****. **:*:*:*:* * * * . : : :      **

aslm          KKVPVPSTNNDSLKQGTDFWYDSDGNRVDQKTNQILLTAEQLKKNNEKNLSVISDDTSK 120
L.citreumIS  KTEPVPDKSN-----KNESVKDSKVATSDELAKDSK---VATSDELAK 94
              * . * * * . . . *           : : . . . : * : : * * : : . * * : : *

aslm          KDDENISKQTKIANQQTVD TAKGLTTSNLSDPITGGHYENHNGYFVYIDASGKQVTGLQN 180
L.citreumIS  --DSKVATSDELAKDSKVATSDELVKD--SKVATSDELAKDS---KVATSDELAK---- 142
              * : : : . . . : * : : . . * : . * . . * . * . . . . . : * : : . .
    
```

**Figura 3.11a.** Alineamiento entre el dominio variable de la ASR de *L. mesenteroides* B-1355 (aslm) y la región N-terminal de la IS de *L. citreum* CW28 (*L. citreum*IS).

```

aslm          ITSSLREDGLFANAPYGVVTKDQNGNDLKWQYINHTKQYEGQQVQVTRQYTD SKGVSWNL 1560
L.citreumIS  VNATSRNDGLFLNAPYRQVGSSELVG-----FTKKYNGQIVAIDKQFFDDKGIWSQ 997
              : : : * : * * * * * * * * : : *           . * * : * * * : : * : * * : *

aslm          ITFAGDGLQQRLLVWDSRALMTIPFKTMNQISFISYANRNDGLFLNAPYQVKG YQLAGMS 1620
L.citreumIS  VIIDG-----QKFWVDNRGLNQVQTQDVNKKLYVNSASQSDGLFLNAPYRGINAKLVAMA 1052
              : : *           * : * * * . * . . . : : * : : . * : : * * * * * : : * : : *

aslm          NQYKQQQVTIAGVAN-VSGKDWSLISFNGTQYWIDSQALNTNFTHDMNQKVFVNTT SNLD 1679
L.citreumIS  KTYNGRYVNVLKQGKDAYNVNWSLIELDGQSLWIDSQALNTNFTHDMNQKVFVNTT SNLD 1112
              : * : * : * : : . . . : * * * : : * . * * * * * * * * * * * * * * * *

aslm          GLFLNAPYRQPGYKLAGLAKNYYNNQTVTVSQQYFDDQGTVWSQVVLGGQTVWVDNHALAQ 1739
L.citreumIS  GLFLNAPYRQPGYKLAGLAKNYYNNQTVTVSQQYFDDQGTGWSEVVLGGQTVWVDNHALAQ 1172
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

```

aslm      MQVSDTDQQLYVNSNGRNDGLFLNAPYRGQGSQ LIGMTADYNGQHVVTKQGQDAYGAQW 1799
L.citreumIS  MQVSDTSQQLYVNSNGRNDGLFLNAPYRGQGSQ LIGMTADYNGQHVVTKQGQDAYGAQW 1232
*****

aslm      RLITLNNQQVWVDSRALSTTIMQAMNDNMYVNSSQRTDGLWLNAPYMSGAKWAGDTRSA 1859
L.citreumIS  RLITLNNQQVWVDSRALSTTIMQAMNDNMYVNSNQRDGLWLNAPYMSGAKWAGDTRIA 1292
*****

aslm      NGRYVHISKAYSNEVGNTYYLTNLNGQSTWIDKRAFTVTFDQVVALNATIVARQRPDGMF 1919
L.citreumIS  NGRYVHISKAYSNEVGNTYYLTNLNGQSTWIDKRAFTATFDQVVALNATIVARQRPDGMF 1352
*****

aslm      KTAPYGEAGAQFVDYVTNYNQQTVPVTKQHSDAQGNQWYLATVNGTQYWIDQRSFSPVVT 1979
L.citreumIS  KTAPIWEAGAQFVDYVTNYNQQTVPVTKQHSDAQGNQWYLATVNGTQYWIDQRSFSPVVT 1412
*****

aslm      KVVVDYQAKIVPRTRDGVFSGAPYGEVNAKLVNMATAYQNQVHVATGEYTNASGITWSQF 2039
L.citreumIS  KVVVDYQAKIVPRTRDGVFSGAPYGEVNAKLVNMATAYQNQVHVATGEYTNASGITWSQF 1472
*****

aslm      ALSGQEDKLWIDKRALQA 2057
L.citreumIS  ALSGQEDKLWIDKRALQA 1490
*****

```

**Figura 3.11b.** Alineamiento entre el dominio de unión a polímero de la ASR de *L. mesenteroides* B- 1355 (aslm) y la región C-terminal de la IS de *L. citreum* CW28 (L.citreumIS)

La región carboxilo terminal en la ASR corresponde al dominio de unión a polímero que comienza en el amino ácido 1348. En general, en las glucosiltransferasas del género *Streptococcus* y *Leuconostoc*, este dominio corresponde a una tercera parte de la proteína y se ha reportado que consiste de una serie de elementos repetidos, relacionados pero no idénticos. Estos elementos repetidos en algunas glucosiltransferasas están relacionados con la retención de la actividad de síntesis de polímero y el efecto estimulador de la dextrana (Monchois y col, 1999). En glucosiltransferasas de algunas especies de *Streptococcus* que se encuentran tanto asociadas a células como extracelulares, la delección de todo el dominio C-terminal

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

resulta en un incremento en la secreción de la enzima (Vickerman y col, 1997). Estos elementos de repetición fueron identificados primero en *S. sobrinus* (Ferretti y col, 1987). En *Streptococcus* se han descrito cuatro elementos de repetición A, B, C y D en diferentes formas de organización. Solo el elemento A se ha encontrado en todas las GTF. En la ASR de *L. mesenteroides* estos elementos se encuentran organizados de la siguiente manera: A-C-A-A-A-A (Argüello-Morales 2000b). En la IS CW28 de *L. citreum* se encontraron tres unidades de repetición del tipo A en la región de homología con la ASR (Figura 3.12).

IS 1142    QQYFDDQGTGWSEVVL-GGQTVWVD-NHALAQMQV  
IS 1309    TYYLTNLNGQSTWIDKRAFTAT-FDQV-VALNATIV  
IS 1399    YVTNYNQQTPVTKQHSDAQGNQWYLATVNGTQYWID  
elemento A   WYYFDNNGYAVTGLQTINGQHLYFDANGVQVKG

**Figura 3.12** Elementos de repetición tipo A encontrados en la IS de *L. citreum* CW28

Además de estas secuencias ya conocidas, en la IS de *L. citreum* CW28 también se encuentra un set de siete elementos de repetición que se han identificado anteriormente solo en la ASR (Argüello-Morales, 2000b y Janecek y col, 2000). Aunque no se tiene una función conocida para ellos (Figura 3.13).

TESIS CON  
FALLA DE CUBIEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

953 DGLFLNAPY  
1032 DGLFLNAPY  
1111 DGLFLNAPY  
1190 DGLFLNAPY  
1269 DGLWLNAPY  
1348 DGMFKTAPY  
1428 DGVFSGAPY

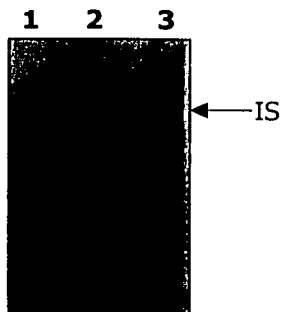
**Figura 3.13** Set de siete elementos de repetición encontrados en la IS de *L. citreum* CW28.

### 3.2.7. Expresión heteróloga de la proteína

Un fragmento de 5007 pb que incluye al gen completo y su región promotora fue clonado en el vector pCR 4-TOPO resultando el plásmido pCRIS con el que fue transformada la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ . En los extractos obtenidos a partir de la sonicación de las células cultivadas de *E. coli* DH5 $\alpha$ [pCRIS] se encontró actividad FTF con sacarosa mediante ensayos en los que se siguió la evolución del poder reductor por el método DNS descrito anteriormente. Se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes comprobándose la presencia de una banda del tamaño esperado en el extracto de *E. coli* DH5 $\alpha$ [pCRIS] como se observa en la figura 3.14.

Por otro lado, un segundo fragmento, de 3450 pb fue obtenido por PCR con los oligonucleótidos 28IS y 868IS. Este fragmento carece del dominio variable y de un fragmento del dominio catalítico que tiene la primer caja de identidad mostrada en la figura 3.9 y se clonó en el vector pCR 4-TOPO y se obtuvo el plásmido pCR3450 con el que se transformó la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ . Extractos de *E. coli*

DH5 $\alpha$ [pCR3450] no presentaron actividad y fueron utilizados como control negativo.

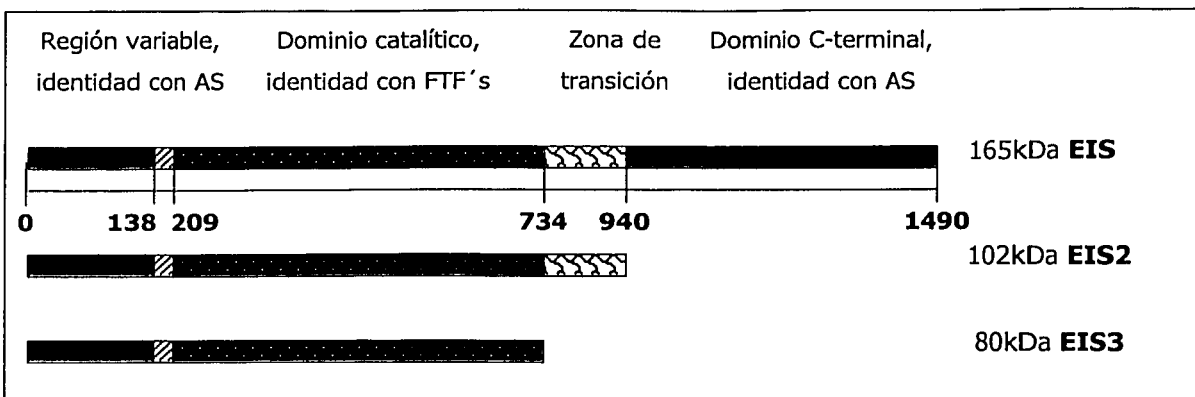


**Figura 3.14** Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes donde se observa la inulosacarasa expresada heterológamente. 1) *E. coli* DH5 $\alpha$ [pCR3450]; 2) *E. coli* DH5 $\alpha$ [pCRIS]; 3) IS de *L. citreum*.

**3.2.8. Expresión de dos versiones truncadas en el C-terminal de la IS en *E. coli*.**

Para tratar de responder la pregunta sobre cual es la función del C-terminal en la IS se realizaron dos construcciones eliminando este dominio (Figura 3.15). En la primera construcción del nucleótido 56 al 3389, la región de alta identidad con la ASR fue eliminada. Un fragmento de 3333pb se clonó en el vector pCR 4-TOPO resultando el plásmido pCRIS2 con el cual se transformó *E. coli* DH5 $\alpha$ . En una segunda construcción, una región de 2731pb con esa misma eliminación mas la región de transición (Figura 3.15) fue clonada en el vector pCR 4-TOPO resultando el plásmido pCRIS3 con el que fue transformada *E. coli* DH5 $\alpha$ . Con los extractos obtenidos a partir de la sonicación de las células de *E. coli* DH5 $\alpha$ [pCRIS2] y *E. coli* DH5 $\alpha$ [pCRIS3] se realizaron ensayos para determinar actividad midiendo azúcares reductores por el método DNS, encontrando que ambos extractos presentaron

actividad. En conclusión, las tres versiones de la enzima muestran actividad a 30°C y pH 6.5.

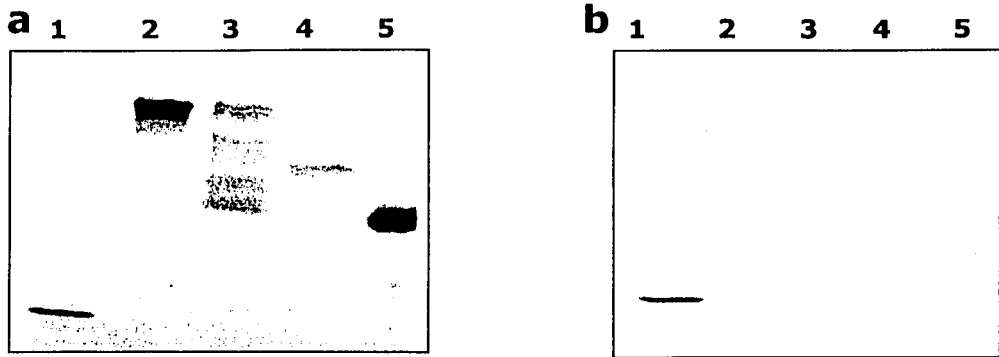


**Figura 3.15** Diagrama donde se representan las tres versiones de la IS que fueron expresadas en *E. coli*. EIS es la enzima completo; EIS2 es la enzima a la que se le eliminó la región del C-terminal con alta identidad con ASR y EIS3 es la enzima a la que se le eliminó la misma región que a EIS2 además de la región de transición.

### 3.2.9. Caracterización de las proteínas heterólogas

Para conocer el tipo de polímero producido por cada una de las proteínas heterólogas se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes que posteriormente fueron tratados con tween 80 y rafinosa para detectar síntesis de polímero *in situ*. Como se observa en la figura 3.16a las tres versiones de la enzima sintetizan un polímero de fructosa. Para determinar si el polímero producido por las enzimas recombinantes es de tipo inulina, estos geles se trataron con inulinasa y como se observa en la figura 3.16b, el polímero fue digerido por la enzima lo que confirma que las tres versiones de la proteína

presentan actividad inulosacarasa. En este experimento se uso levana como control, misma que no fue degradada por la enzima.



**Figura 3.16** Zimograma de las enzimas EIS, EIS2, EIS3. En 1) LS de *B. subtilis*; 2) EIS3; 3) EIS2; 4) EIS; 5) IS de *L. citreum*. En a) se muestra el gel teñido con reactivo de Schiff después de incubarlos con rafinosa. En b) se muestra el gel teñido con reactivo de Schiff después de incubación con rafinosa y posterior tratamiento con inulinasa.

Además se encontró que la actividad específica de la proteína EIS es de 0.015U/mg de proteína, mientras que la EIS2 presentó 0.016U/mg de proteína y EIS3 0.031U/mg de proteína. El peso molecular de la proteína EIS2 es 102,630Da, mientras que el de EIS3 es de 80,556 Da.

Para determinar si el dominio C-terminal tiene alguna influencia sobre la estabilidad de la proteína se realizaron estudios para determinar la vida media de las tres proteínas obtenidas y se encontró que a 40°C la vida media de EIS3 es reducida a 12 minutos, mientras que la EIS tiene 70 minutos de vida media y la EIS2 20 minutos, lo que revela que realmente el dominio C-terminal influye en la estabilidad de la proteína.

Como se mencionó con anterioridad, en las GTFs el dominio C-terminal influye en la relación hidrólisis/transferencia de estas enzimas, así que se determinó esta



relación para las enzimas EIS1 y EIS3, resultando un incremento de 47% en el primer caso hasta 70% en ESI3, lo que evidencia que este dominio modula la relación hidrolisis/transferencia en la IS al igual que lo hace en las GTFs, es importante mencionar que en las FTFs al carecer de este dominio esta modulación no existe.

Con el objetivo de caracterizar a fondo las tres versiones de la proteína se diseñaron los oligonucleótidos ISdirecto, ISreverso, E2reverso y E3reverso con los que se amplificaron las dos versiones truncadas del gen y el gen completo, en los tres casos sin la región promotora. Estos fragmentos se clonaron en el vector pBAD/TOPO el cual es un vector de expresión que tiene un promotor inducido por arabinosa y deja colas de histidina para facilitar la purificación de la proteína. Los plásmidos resultantes se denominaron pBADE1, en el caso del gen completo; pBADE2, para el fragmento con la delección de la región de alta identidad con la ASR y pBADE3 para el fragmento con esa delección mas la región de transición, se determinó actividad, sin embargo esta parte del trabajo no se concluyó en el presente estudio, pero actualmente se encuentra proceso.

TESIS CON  
FALLA DE OFICEN

# CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

84-17

#### 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La fructosiltransferasa de *L. citreum* es, en particular, una inulosacarasa ya que produce un polímero de fructosa con enlaces  $\beta$  2-1 denominado inulina. Actualmente se sabe que la IS en *L. citreum* produce inulina de alto peso molecular. Existen reportes que sustentan la característica de prebiótico de la inulina, sin embargo, todos ellos se refieren a inulina de bajo peso molecular extraída de plantas. Sería interesante determinar los pesos moleculares de la inulina producida por las diferentes versiones de la proteína expresada en *E. coli*, así como determinar si la inulina de alto peso molecular también tiene la característica de estimular selectivamente la flora benéfica del colon.

La inulina de alto peso molecular producida por *L. citreum* puede ser hidrolizada por endoinulinasas y así obtener tanto FOS como inulina de bajo peso molecular por lo que sería interesante obtener un método para la producción de inulina utilizando células completas de *L. citreum* inmovilizadas como biocatalizador. Este trabajo ya está siendo realizado en el laboratorio de Tecnología Enzimática del IBT por María Elena Soto, estudiante de Maestría bajo la dirección del Dr. Agustín López Munguía.

Se aisló y caracterizó el gen que codifica para la inulosacarasa de la cepa CW28 de *L. citreum* y de acuerdo con la estructura primaria de la IS obtenida a partir de la secuencia del gen, observamos que se trata de la primera FTF descrita que combina características de GTFs y FTFs. La IS presenta tres dominios estructurales El primero de ellos homólogo a las fructosiltransferasas bacterianas, los otros dos con identidad a la alternansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-1355, lo que explica su alto peso molecular, 165 kDa.

TESIS CON  
FALLA DE CENSUR

La expresión el gen de la inulosacarasa en *E. coli* DH5 $\alpha$  resultó exitosa. La proteína recombinante produce al igual que la silvestre un polímero de fructosa tipo inulina a partir de sacarosa.

Las dos construcciones realizadas, en las que se eliminó secuencialmente el C-terminal, fueron expresadas en *E. coli* DH5 $\alpha$  exitosamente. Ambas al ser puestas en contacto con sacarosa producen inulina. Sin embargo, es importante notar que su estabilidad se vio afectada por los cortes realizados, además, la enzima EIS3 mostró una disminución de la actividad polimerasa y un aumento en la capacidad hidrolítica, este mismo fenómeno ha sido reportado para las glucosiltransferasas. Es necesario concluir la caracterización de las proteína expresadas en *E. coli* (pCRIS, pCRIS2 y pCRIS3).

Al intentar localizar el gen de la IS en el genoma de *L. citreum*, primero se determinó la presencia de plásmidos en la cepa CW28 de *L. citreum*. Sin embargo, el gen de la inulosacarasa no se encontró en este material genético, al parecer está en cromosoma, aunque se ha documentado la presencia de megaplásmidos en bacterias ácido-lácticas y la posibilidad de se encuentre en estos cuerpos extracromosomales no se ha descartado, por lo que sería interesante verificar la presencia de megaplásmidos y explorar la posibilidad que el gen *is/* este presente en este material genético.

Durante la realización del presente trabajo se comenzó el estudio por mutagénesis sitio dirigida de algunos residuos Asp y Glu localizados en secuencias conservadas entre FTF's bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Este estudio pretenden dar luz sobre los aminoácidos implicados en la catálisis y esta basado en un reporte previo donde se aisló el intermediario fructosil-enzima y se determinó que existe un Asp involucrado (Chambert y Gonzy-Treboul, 1976).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El estudio de mutagénesis sitio dirigida continúan en proceso, y quizá sean el comienzo de experimentos que contribuyan a responder a la pregunta planteada con anterioridad sobre el por qué algunas de estas enzimas producen inulina y algunas levana y cuales son los aminoácidos implicados en la síntesis de heterooligosacáridos por lo que se propone también concluir con la construcción de dichas mutantes y caracterizarlas.

El hecho de que el DNA de la cepa CW28 de *L. citreum* no sea digerido en el sitio GATC por enzimas que lo cortan estando o no modificado por metilación tipo DAM, despierta el interés por explorar el tipo de modificación existente en el DNA de este microorganismo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# BIBLIOGRAFÍA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

87-A

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abo, H., Matsumura, T., Kodama, T., Ohta, H., Fukui, K., Kato, K., and Kagawa, H. (1991). Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding with *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthetase) *J Bacteriol.* **173**:989-996.
2. Alsop, R. (1983). Industrial production of dextrans. Process in industrial microbiology. Ed. Buschel, M.E. Elsevier. Vol 18. 1-43. Scientific Publishing Co. Amsterdam.
3. Argüello-Morales, M., Remaud-Simeon, M., Pizzut, S., Sarçabal, P., Willemot R. and Monsan, P. (2000). Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *FEMS Microbiol Lett* **182**: (1) 81-85.
4. Argüello-Morales, M. (2000b). L'alternane-saccharase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355: structure primaire et synthèse d'oligosides. Thèse Doc. L'institut National des Sciences Appliqués de Toulouse. France.
5. Arrieta J, L Hernandez, A Coego and V Suarez. (1996). Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology* **142**: 1077-1085.
6. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (2001) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc. USA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

7. Banas, J., Simon, D., Williams, LF., Ferretti, J., Russell, R. (1994). Analysis of a primer-independent GTF-I from *Streptococcus salivarius*. *FEMS Microbiol Lett.* **123**(3):349-54.
8. Batista, F.R., Hernandez, L., Fernández, J., Arrieta, J., Méndez, C., Gómez, R., et al. (1999) Substitution of ASP-309 by ASN in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase affect sucrose hydrolysis, but not enzyme specificity. *Biochem J* **337**: 503-506.
9. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochim.* **72**:248-254.
10. Belder, A.N. (1990). General applications of dextran and its derivatives. En: Dextran, 2ª Ed. Pharmacia LEO Therapeutics, 62-79. Uppsala, Sweden.
11. Bergeron, L., Morou-Bermudez, E., and Burne, R. (2000). Characterization of the fructosyltransferase gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45. *J Bacteriol.* **182**: 3649-3654.
12. Bergeron, L., and Burne, R. (2001). Role of fructosyltransferase and levansucrase of *Actinomyces naeslundii* in fructan and sucrose metabolism. *Infect Immun.* **69**: 5395-5402.
13. Betancourt L, T Takao, L Hernandez, G Padron and Yasutsugu. (1999). Structural characterization of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: identification of an N-Terminal blocking group and free-thiol cysteine residue. *J Mass Spectrom* **34**: 169-174.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



14. Canedo, M., Jimenez-Estrada, M., Cassani, J., and López-Munguía, A. (1999). Production of maltosylfructose (erlose) with levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Biotransformation*. **16**:475-485.
15. Chambert, R., MC Rain-Guion and MF Petit-Glatron. (1992). Readthrough of the *Bacillus subtilis* stop codon produces an extended enzyme displaying a higher polymerase activity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1132**: 145-153.
16. Chambert, R., Tréboul, G., and Dedonder, R. (1974). Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis* *Eur J Biochem*. **41**: 285-300.
17. Chambert, R., Tréboul, G., and Dedonder, R. (1976). Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Kinetic and thermodynamic aspects of transfructosylation processes. *Eur J Biochem*. **62**: 55-64
18. Chambert, R., Tréboul, G., and Dedonder, R. (1976b). Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Characterization of a stabilized fructosyl-enzyme complex and identification of an aspartyl residue as the binding site of the fructosyl group. *Eur J Biochem*. **71**: 493-508.
19. Chambert, R., and Petit-Glatron, M.F. (1989). Study of the effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Carboh Res* **191**: 117-123.
20. Chambert, R., and Petit-Glatron, M.F. (1991). Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *Biochem J*. **279**:35-41.
21. Chambert, R., and Petit-Glatron, M.F. (1993). Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increase its polymerase activity. *Carboh Res* **244**: 129-136.

22. Cote G. (1988). Production of a constitutive, extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. *Biotechnol Letters* **10**: 879-882.
23. Cote, G., and Robyt, J. (1982) Acceptor reactions of alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *Carbohydr Res.* **111**:127-142.
24. Dedonder, R. (1966). Levansucrase from *Bacillus subtilis*. In *Methods in Enzymology*, ed Neufeld E. F., Ginsburg G., Acad Press, New York, Vol. 8, 500-505
25. Dedonder, R. (1972). Role and mechanism of transglycosilation reactions. Biochemistry of the glycosidic linkage. PAABS, Symposium, 2, 21-76, Acad Press, Inc. New York.
26. Devulapalle, K., Goodman, S., Gao, Q., Hemsley, A., and Mooser, G. (1997). Knowledge-based model of a glucosyltransferase from oral bacterial group of mutants streptococci. *Protein Sci.* **6**: 2489-2493.
27. Ebisu, S., Kato, K., Kotani, S., and Misuki, A. (1975). Structural differences in fructans elaborated by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius*. *J Biochem (Tokyo)*. **78** (5): 879-887.
28. Edelman, J., and Jefford T.G. (1968) The mechanism of fructosan metabolism in plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytol.* **67**: 517-531.
29. Farrow, J., Flackman, R., and Collins, M. (1989). Nucleic acid homologies of some vancomycin-resitant *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp.nov. *Int J Syst Bacteriol.* **38**(3): 279-283.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

30. Ferretti, J.J., Gilpin, M.L., and Russell, R. (1987) Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* MFe28, *J Bacteriol* **169**: 4271-4278.
31. Franck, A., (2002) Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*. **87**:Suppl 2, S287-S291.
32. Franz, G., Hensel, A., and Kraus, J.(1988) Structure-activity relationship of immune modulating polysaccharides with an antitumoral effect. In *Biomedical and biotechnological advances in industrial polysaccharides*. Gordon and Breach Science Publishers. 241-249.
33. Funane, K., Ookuta, T., and Kobayashi, M. (1998). Glucan binding regions of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biosci Biotechnol Biochem*. **62**(1):123-127.
34. Gibson, G.R., and Roberfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **125**: 1401-1412.
35. Giffard, P., and Jacques, N. (1994). Definition of a fundamental repeating unit in Streptococcal glucosyltransferases glucan-binding regions and related sequences. *J Den Res*. **73**:6707-6710.
36. Giffard, P., Hettiaratchi, A., Allen, DM., and Jacques, N. (1994). The effect of C-terminal and N-terminal deletions on the activity of *Streptococcus salivarius* glucosyltransferase. 4<sup>th</sup> Int Conf Strep Genetics. p. 35.
37. Hamada, S., Horikoshi, T., Minami, T., Okahashi, N., and Koga, T. (1989). Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- synthesizing water-insoluble glucan from Serotype c *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol.* **135**:335-344.
38. Han YW., Clarke MA., (1990) Production and characterization of microbial levan. *J Agric Food Chem.* **38**: 393-396.
39. Hettwer U, G Michael and R Klaus. (1995). Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J Bacteriol* **64**: 2834-2839.
40. Hettwer U, FR Jaeckel, J Boch, M Meyer, K Rudolph and MS Ullrich. (1998). Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. glycinea and *P. syringae* pv. phaseolicola. *Appl Environ Microbiol* **64** (9): 3180-3187.
41. Heyer, A., Schroeer, B., Radosta, S., Wolff, D., Czaplá, S., and Springer, J. (1998). Structure of the enzymatically synthesized fructan inulin. *Carbohydr Res.* **313**: 165-174.
42. Heyer, A., and Wendenburg, R. (2001) Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. *App Environ Microbiol.* **67** 363-370
43. Hirayama, M., Sumi, N., and Hidaka, H. (1989). Purification and properties of a fructooligosaccharides-producing beta fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC20611. *Agric Biol Chem.* **53**:668-674
44. Jacques NA. (1993). The fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*. *New Phytol* **123**: 429-435.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

45. Jacques NA. (1995). Extracellular sucrose metabolism by *Streptococcus salivarius*. *Dev Biol Stand.* **85**: 315-322.
46. James, E., Reis, V., Olivares, F., Baldani, J., y Döbereiner, J. (1994). Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J Exp Bot.* **45**: 757-766.
47. Janecek, S., Svensson, B., and Russell, R. (2000) Location of repeat elements glucansucrases of *Leuconostoc* and *Streptococcus* species. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 53-57.
48. Jeanes, A., Haynes, C., Williams, J., Rankin, E., Melvin, M., Austin, J., Cluskay, B., Fisher, B., Tsuchiya, H., and Rist, C. (1954). Characterisation and classification of dextrans from ninety six strains of bacteria. *J Am Chem Soc.* **76**: 5041-5052.
49. Kawai, G., Taniguchi, H., and Nakamura, M. (1973). Polyfructan and oligofructan synthesized from sucrose by conidia of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. *Agric Biol Chem.* **37**: 2111-2119.
50. Kim, J., Chun, J., and Han, H.U. (2000) *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from Kimchi. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 1915-1919.
51. Koepsell, H., Tsuchiya, H., Hellman, N., Kazenko, A., Hoffman, C., Sharpe, E., and Jackson, R. (1953). Enzymatic synthesis of dextran. *J Biol Chem* **200**: 793-801.
52. Kralj, S., Van Geel-Shutten, G., Rahaoui, H., Leer, R., Faber, E., Van der Maarel, M., and Dijkhuizen, L. (2002). Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with alpha-(1-->4) and alpha-(1-->6) glucosidic bonds.. *Appl Environ Microbiol.* **68**:4283-4291.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

53. Kyono K, H Yanase, K Tonomura, H Kawasaki and T Sakai. (1995). Cloning and characterization of *Zymomonas mobilis* genes encoding extracellular levansucrase and invertase. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**: 289-293.
54. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
55. LeBrun, E., and Rapenbusch, R. (1980). The structure of *Bacillus subtilis* levansucrase at 3.8 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*. **255** (24): 12034-12056.
56. Li, H and Ullrich, M. (2001) characterization and mutational analysis of three allelic *Isc* genes encoding levansucrase in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol.* **183** (11): 3282-3292.
57. Liepa, V., Zakenfelds, E., Volpe, Z., Koronova, R., Lapsa, M., Laivenieks, M., Bekeris, M., and Pospishil, I. (1993) Levan prolongs the life-span of tumor-bearing or irradiated mice, and enhanced the antitumoral activity of leukocytes. *Proceedings of the Latvian Academy of Science B*. No 5 **500**: 59-64
58. Lively, R. (1988) Polysaccharides antigens as vaccines against bacterial pathogens . In *Biomedical and Biotechnological advances in industrial polysaccharides*. Gordon and Breach Science Publishers. 133-143.
59. MacGregor, A., Jespersen, H., and Svensson, B. (1996). Circularly permuted  $\alpha$ -amylase-type  $\alpha/\beta$ -barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferase. *FEBS Lett.* **398**:263-266.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

60. Marx, S.P., Nösberger, J., and Frehner, M. (1997). Seasonal variation of fructan- $\beta$ -fructosidase (FEH) activity and characterization of  $\beta$  (2-1) linkages specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *New Phytol* **135**: 267-277.
61. Miller, A., Eklund, S., and Robyt, J. (1986). Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr Res.* **147**:119-133.
62. Monchois, V., Willemont, R., Remaud-Simeon, M., Croux, C., and Monsan, P. (1996). Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only  $\alpha$  (1-6) and  $\alpha$  (1-3) linkages. *Gene.* **182**: 23-32.
63. Monchois, V., Agüello-Morales, M., and Russell, R. (1999). Isolation of an active catalytic core of *Streptococcus downei* Mfe28 GTF-I Glucosyltransferase. *J Bacteriol.* **181**:2290-2292.
64. Mooser, G. (1992). Glycosidase and glycosyltransferases, *In The Enzymes. Acad Press Inc. New York*
65. Mooser, G., Hefta, S., Paxton, R., Shively, J., and Lee, T. (1991). Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferases. *J Biol Chem.* **266**:8916-8922.
66. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and Gunnar von Heijne. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage site. *Protein Engineering* **10**: 1-6.
67. Niness, KR. (1999). Inulin and oligofructose: What are they?. *J Nutr.* **129**: 1402S-1406S.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

68. Ohtsuka K, S Hino, T Fukushima, O Osawa, T Kanematsu and T Ushida. (1992). Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. *Biosci. Biotech. Biochem*, 56, **9**: 1373-1377.
69. Olah, A., Papp, Z., and Szentirmai. (1993). inulin formation of penicillin producing industrial *Penicillium crysogenium* strains. *Acta Microbiol Hungarica*. **40**: 379-386.
70. Olivares-Illana, V. (1998). Caracterización de glicosiltransferasas de 15 diferentes cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas del pozol. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
71. Olivares-Illana, V., Wachter-Rodarte, C., LeBorgne, S., and López-Munguía, A. (2002) Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**: 112-117.
72. Perez M, L Guereca and A López-Munguía. (1996). Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**: 465-471.
73. Perlot, P., and Monsan, P., (1984) Production, purification and immobilization of *Bacillus subtilis* levansucrase. *Ann NY Acad Sci*. **434**:468-471
74. Pons, T., Hernández, L., Batista, F., and China, G. (2000). Prediction of a common  $\beta$ -propeller catalytic domain for fructosiltrasferases of different origin and substrate specificity. *Protein Science*. **9**: 2289-2291.

TESIS CON  
FALLA DE CUBIEN



75. Rapoport, G., and Dedonder, R. (1963), La lévane-sucrase de *Bacillus subtilis*. III.- Réactions D'hydrolyse, de transfer et d'échange avec des analogues de saccharose. *Bull Soc Chim Biol* **45**: 515-535.
76. Rapoport, G., (1966). Propriétés générales et activités enzymatiques de la lévane-sucrase purifiés de *Bacillus subtilis*. Thèse Doc. és Dvi. Univ. Paris.
77. Reddy, B., (1999) Possible mechanism by which pro- and pre-biotocs influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J Nutr* **129**: 1478S-1482S.
78. Rehms, J., Willmitzer, L., and Heyer, A. (1998). Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J Bacteriol.* **180**(5): 1305-1310.
79. Remaud-Simeon, M., Willemot, R., Sarçabal, P., Potocki, G., and Monsan, P. (2000). Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *J Mol Catal. B* **10**:117-128.
80. Roberfroid, M. B., (1999) Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose. Concepts in functional foods: The case of inulin and oligofructose. *J Nutr* **129**: 1398S-1401S.
81. Roberfroid, M. B., (1999) Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose. Caloric value of inulin and oligofructose. *J Nutr* **129**: 1436S-1437S.
82. Roberfroid, M. B., (2000) Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr* **71**: 1682S-1687S.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

83. Robyt, J., Kimble, B., and Walseth, T. (1974). The mechanism of dextransucrase action (The direction of dextran biosynthesis). *Arch Biochem Biophys.* **165**:634-640.
84. Robyt, J., and Walseth, T. (1978). The mechanism of acceptor reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. *Carbohydr Res.* **61**:433-445.
85. Rozen, R., Bachrach, G., Bronshteyn, M., Gedalia, I., Steinberg, D. (2001). The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett.* **195**: 205-210.
86. Sacha, A., van Hijum, Bonting, K., Marc, J., van der Maarel, Dijkhuizen, L. (2001). Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiol Lett.* **205**: 323-328.
87. Sato, S., and Kuramitsu, HK. 1988. *Infect Immun.* **56**: 1965-1960.
88. Sato, S., and Kuramitsu, HK. (1986). Isolation and characterization of a fructosyltransferase gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Infect Immun.* **52**(1):166-70.
89. Schillinger, U., Holzapfel, W., and Kandler, O. (1989). Nucleic acid hybridization studies on *Leuconostoc* and heterofermentative lactobacilli and description of *Leuconostoc amilibiosum* sp. nov. *Sys Appl Microbiol.* **12**:48-55.
90. Scholz-Ahrens K.E., Schaafsma, G., van den Heuvel E.G., and Schrezenmeir, J. (2001). Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr.* **73**(2 Suppl):459S-464S.



91. Seymour, F., and Knapp, R. (1980). Structural analysis of dextrans from strains of *Leuconostoc* and related genera, that contain 3-O- $\alpha$ -D-glucosylated-D-glucopyranosyl residues at branched point, or consecutive, linear position. *Carbohydr Res.* 81: 105-129.
92. Shimamura A, K Tsuboi, NT Nagase, M Ito, H Tsumori and H Mukasa. (1987). Structural determination of D- fructans from *Streptococcus mutans*, serotype *d,c,e*, and *f* strains, by  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. *Carbohydr Res* **165**: 150-154.
93. Shiroza, T., and Kuramitsu, H. (1995). Role of C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-S in glucan binding. *Appl Environ Microbiol.* **61**(5):2040-2042.
94. Shiroza, T., Ueda, S., and Kuramitsu, H. (1987). Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* **169**:4263-4270.
95. Sidebotham, R. (1974). Dextrans. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 30:371-444.
96. Song, D., and Jaques, N. (1999) Mutation of aspartic acid residue in fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem J* **344**: 259-264.
97. Sprenger, N., Bartlik, K., Brandt, A., Boller, T., and Wiemken, A. (1995) Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proc Natl Acad Sci.* **92**: 11652-11656.
98. Summer JB and SF Howell. (1935). A method for determination of invertase activity. *J Biol Chem* **108**: 51-54.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

99. Tanaka, T., Yamamoto, S., Oi, S., and Yamamoto, T. (1981). Structure of heterooligosaccharides synthesized by levansucrase. *J Biochem.* **90**: 521-526.
100. Tanriseven, A., and Robyt, J. (1992). Inhibition of dextran synthesis by acceptor reactions of dextransucrase, and the demonstration of separate acceptor binding site. *Carbohydr Res.* **225**:321-329.
101. Takahashi, M., Okada, S., Uchimura, T., and Kozaki, M., (1992). *Leuconostoc amelibiosum* Schillinger, Holzapfel and Kandler 1989 Is later subject synonymus of *Leuconostoc citreum* Farrow, Flackman, and Collins 1989. *Int J Syst Bacteriol.* 42(4): 649-651.
102. Van Geel-Shutten, G., Faber, E., Smit, E., Bonting, K., Smith, M., Ten Brink, B., Kamerling, J., Vliegthart, J., and Dijkhuizen, L. (1999). Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild type strain and mutant strain. *Appl Environ Microbiol.* **65**:3008-3014.
103. Van Hijum, S., van Geel-Schutten, H., Rahaoui, H., van der Maarel, M., and Dijkhuizen, L. (2002). Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesized high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol.* **68**:4390-4398.
104. Van Loo, J., Coussement, P., DeLeenheer, L., Hoebregs, H., and Smits, G. (1995). On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredient in the Western diet. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.* **35**: 525-552.



105. Vickerman, M.M., Sulavik, M.C., Nowak, J.D., Gardner, N.M., Jones, G.W. and Clewell, D.B. (1997) Nucleotid sequence analysis of the *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase gene, *gtfG*. *DNA Seq.* **7**: 83-95
106. Vijn, I., and Smeekens, S. (1999) Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology.* **120**: 351-359.
107. Von Eichel-Streiber, C., Sauerborn, M., and Kuramitsu, H. (1992). Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J Bacteriol.* **174**. 6707-6710.
108. Wachter-Rodarte, C. (1995). Estudio sobre la microbiología del pozol. Tesis Doctoral. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
109. Wildman, R. (2001). Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. CRC Press LLC. London.
110. Yamashita, H., Kobayashi, S., Iwase, H., Itoh, Y., and Masaoka, A. (1994). Recurrent Breast Cancer at 21 years after Resection Detected by Serum Tumor Markers and Manifested as Dermatomyositis. *Breast Cancer.* **1**(1):65-68.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# ANEXO 1

Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: A fructosyltransferase within a glucosyltransferase.

Olivares-Illana V., López-Munguía A. & Olvera C.

**(Artículo en revisión)**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Title:** Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: A fructosyltransferase within a glucosyltransferase.

**Running title:** The Inulosucrase of *L. citreum*

**Authors:** Vanesa Olivares-Illana, Agustín López-Munguía\* and Clarita Olvera.

**Address:** Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

\*Corresponding author. Present address: Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, UNAM. Avenida Universidad 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos 62250, México. Phone: (52-777) 3291609. Fax: (52-777) 3172388. E-mail: [agustin@ibt.unam.mx](mailto:agustin@ibt.unam.mx)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ABSTRACT

Inulosucrases are fructosyltransferases, enzymes that produce fructose polymers (fructans) from sucrose. The gene encoding for inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 was cloned, sequenced and expressed into *Escherichia coli*. The recombinant enzyme catalysed inulin synthesis from sucrose as the wild type enzyme. From sequence comparison it was found that this FTF is the result of an inclusion inside alternansucrase, a glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* 1355. IS possesses three domains: the N-terminal region, which has homology with the variable region of glucosyltransferases, the catalytic domain, homologous with the fructosyltransferases from various microorganisms, and the C-terminal domain, which present homology with the glucan binding domain (GBD) from AS. Two different C-terminally (GBD) truncated forms of the *isl* gene were successfully expressed in *E. coli*, retaining the ability to synthesize inulin, but losing thermal stability.

This is the first report of an inulosucrase bearing structural features of both glucosyltransferases and fructosyltransferases.

**Keywords:** Inulin, inulosucrase, fructosyltransferase, glucosyltransferase, alternansucrase, *Leuconostoc citreum*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## INTRODUCTION

In general, glycosyltransferases are enzymes that catalyse the transfer of a glycosyl residue from a donor molecule to a particular acceptor (19). In particular, there is a certain group of glucosyl (GTF) and fructosyl (FTF) transferases that are able to transfer glucose or fructose moieties from sucrose to a growing polysaccharide chain without the need of cofactors (8, 23).

Among FTF, inulosucrases (IS) produce inulin, a fructan polymer with  $\beta$  2-1 linkages position, while levansucrase catalyse a similar reaction resulting in a  $\beta$  2-6 linked fructose polymer known as levan. In both cases branching can occur in  $\beta$  2-6 and  $\beta$ 2-1 respectively. Little is known about the biochemistry and molecular biology of these enzymes (3), in spite of the growing importance of inulin and fructooligosaccharides in the food industry. Up to now, more than 19 FTFs have been sequenced but no crystal structure is available.

On the other hand, GTFs have been the subject of intensive research, particularly those involved in dextran production such a dextransucrase (DS) or alternansucrase (ASR) produced by *Leuconostoc* sp. and GTF from *Streptococcus* sp. due to their role in dental plaque formation. In this case the enzyme transfers glucose from sucrose, building polymers linked by  $\alpha$  1-6,  $\alpha$  1-3 or  $\alpha$  1-4 linkages depending on the specificity of the enzyme (6). However, no crystal structure is neither available for GTF, with the exemption of amylosucrase (25), a GTF resulting in an amylose-type polysaccharide.

An interesting feature of FTF and GTF is their ability to synthesize oligosaccharides of different polymerisation degrees from sucrose when efficient acceptor molecules like maltose or lactose are added to the reaction medium (7, 21, 14).

Although both group of enzymes, GTFs and FTFs build a polysaccharide from sucrose by transferring the glucose or fructose residue, and have been found in the same microorganism, their reaction mechanism, their sequences and their structural organization are quite different. GTFs have a high molecular weight, between 155 to 200 kDa, and are organized in three domains, starting in the N-terminal by the signal peptide and a variable region followed by the catalytic domain where the amino acids implicated in the catalysis have been identified, and a C-terminal domain, involved with binding to the synthesized glucan. It has been proposed by sequence analysis and analogy with  $\alpha$ -amylases that GTFs present a circular permutation of a  $(\beta/\alpha)_8$  barrel for the catalytic domain (4). This contrasts with FTFs which in average have one

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

third the molecular mass of GTF and are not organized in domains. Moreover, Pons *et al* (2000), predicted a  $\beta$ -propeller model for FTFs.

While several microorganisms have been reported as FTFs producers (10), only few genera produce GTFs: *Streptomyces* (17), which has not been studied in detail, *Leuconostoc* (18), *Streptococcus* (11), and *Lactobacillus* (15, 27). It is interesting to note that GTFs are produced by microorganisms that have also been reported as FTFs producers while the reverse is not true. In this paper we report the isolation of an enzyme bearing structural and modular features of both FTF and GTF.

The inulosucrase of *L. citreum* is a cell-associated enzyme. It was characterized both in its cell-associated insoluble form and after solubilisation by urea treatment. Unexpectedly, this fructosyltransferase has a molecular mass of around 165 kDa, the highest reported for FTFs and, in its cell-associated form, is highly specific for polymer synthesis, with low fructose transferred to maltose and lactose added to the reaction medium. The synthesized polymer has an inulin-like structure with  $\beta$ 2-1 glycosidic linkages, as demonstrated by  $^{13}\text{C}$  NMR (22).

In the present study, we report the identification and functional characterization of *isl*, a gene encoding for inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28, an enzyme responsible for the synthesis of inulin. From the analysis of the nucleotide and the predicted amino acid sequence it was found that this enzyme has three domains, the first and third with high identity with alternansucrase, a glucosyltransferase from *L. mesenteroides* 1355, producing alternan, a dextran type polymer consisting in alternated  $\alpha$  1-3,  $\alpha$  1-6 linkage (1). The second domain which is the catalytic one, has homology with the levansucrases and inulosucrases of several microorganisms. No similarity has been reported between GTF and FTF before, inside the already mentioned analogies.

## MATERIALS AND METHODS

### *Bacterial strains, media and growth conditions.*

The bacterial strain *L. citreum* CW28 (Facultad de Química collection, UNAM, México) was grown at 30°C and 200rpm as previously reported (22), with 20g of sucrose per liter as carbon source or with glucose in order to prevent the synthesis of polymer which interferes with DNA extraction.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*E. coli* strain DH5 $\alpha$  was used as host for cloning. The strain of *E. coli* was grown at 37°C and 250 rpm in Luria-Bertani (LB) medium and when appropriate, supplemented with 50 $\mu$ g of kanamicin per ml in order to maintain the plasmid constructions. Agar (1.5% w/v) was added for growth on solid medium.

#### *General molecular techniques.*

Plasmid and genomic DNA of *L. citreum* CW28 were extracted from cells according to Ausubel *et al.*, 2001. *E. coli* plasmid DNA was isolated using a QiaPrep spin plasmid kit (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA) as recommended by the manufacturer. Restriction and DNA-modifying enzymes were from New England Biolabs, Beverly Mass.; Roche Biochemical, Basel Switzerland. DNA was amplified with PCR techniques in a Robocycler Gradient 96 (Stratagene, La Jolla, CA). *E. coli* transformations were performed by electroporation in 0.2 mm cuvettes with the Bio-Rad Micropulser apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.) at 2.5kV, 25 $\mu$ F and 200 $\Omega$ . DNA fragments were isolated from a agarose gel with a Qiagen extraction Kit (Qiagen, Inc.; Chatsworth, CA). In all cases the biological reagents were applied following the instructions of the supplier.

For Southern hybridisation, DNA was restricted with endonucleases, separated by agarose gel electrophoresis, and transferred to a Hybond-N+ membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England.). The probes, which were labelled with P<sup>32</sup> by using a Rediprime Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England).

#### *PCR amplification*

The protein was purified as already described. Activity gels were performed in order to identify the active proteins. The band with the correct protein was excised from the gel and subjected to amino acid sequence determination (Institut Pasteur, France). Two peptides were sequenced from IS (28-MDVWDSWALQDSK and 29-TAPYGEAGAQFVDYV) and degenerated primers 28IS and 29IS were designed from these peptides (Table 1). The chromosomal DNA of *L. citreum* CW28 was used as template. Using Vent-pol a PCR fragment of 3000 pb was amplified (Figure 2a). Analysis of its nucleotide sequence confirmed its FTF identity but also ASR identity. Based on this sequence and on the AS homology we designed two primers 539IS and 868IS (Table 1). From *L. citreum* CW28 genomic DNA an amplification product with the expected size of about 445pb was obtained and sequenced

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

(Figure 2b). On the other hand, and based on the same sequence of 3000pb we designed the primers 128rIS and 421rIS (Table 1) for inverse PCR. *L. citreum* CW28 genomic DNA was digested with *Hind*III and ligated, yielding circular DNA molecules. PCR with the diverging primers 128rIS and 421rIS and the circular ligation products as template yielded an amplification product of about 1600 pb which was sequenced (Figure 2c). Analysing the sequence of all these fragments we obtain the complete sequence of the *isl* gene with its promoter region in a sequence of 5132 pb that was amplified using the primers 11pIS and 868IS (Figure 2d).

*Construction of the plasmids for expression of the isl gene and the truncated versions in E. coli.*

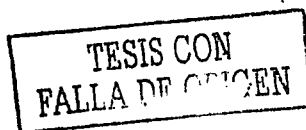
For the construction of a plasmid for expression of the complete *isl* gene we designed the primer 11PIS located on the nucleotide 56 and with the primer 868IS at the end of the gene. A PCR product of 5007 pb was amplified and cloned in *E. coli* strain DH5 $\alpha$  using the vector pCR 4-TOPO (Invitrogen, Calsbad, CA). The correct construction of the plasmid was confirmed by sequence analysis of both DNA strands of the insert.

For the construction of the truncated version of the protein ISE2 a primer 385IS (Table 1) was design and used with the primer 11PIS (Table 1). A product of amplification of 3333 pb was obtained which has no longer the AS identity region. This product was cloned in *E. coli* strain DH5 $\alpha$  using the vector pCR 4-TOPO. Another version of the protein was constructed lacking the very high AS identity region including 602 pb which are part of a transition region between the A S identity region and the FTF homologous region. For this construction we design the primer 384IS (Table 1) and we used that with 11PIS. This product was cloned in *E. coli* strain DH5 $\alpha$  using the vector pCR 4-TOPO.

*N-terminal amino acid sequencing*

The complete cells of *L. citreum* were separated in a SDS-PAGE gel (16) and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane by western blotting (Ausubel *et al*, 2001 ). After stained, the PDVF membrane with Ponceau S solution, the corresponding band was cut and subject to amino acid sequence analysis.

*Preparation of E. coli cell extracts and enzyme activity assay*



Cells of *E. coli* DH5 $\alpha$  harboring the constructions were grown over night and harvest by centrifugation (10 min at 4°C 5000 X g). The pellet was washed twice with 50mM sodium phosphate buffer, pH 6.5. Subsequently, the cells were resuspended in the same buffer and broken by sonication with four-10 seconds pulses of 10 microns with 3 minutes intervals. Cells debris and intact cells were removed by centrifugation for 40 min at 4°C and 10000 X g. The supernatant was used in the enzyme assays, which were carried out at 30°C in 50 mM pH 6.5 potassium phosphate buffer, containing 292 mM sucrose. The IS activity was measured by determination of the glucose release from sucrose by the 3,5-dinitrosalicylic acid method (DNS) (26).

#### *SDS-PAGE activity staining*

Electrophoresis was performed as reported by Laemmli. Samples were mixed with an equal volume of 2X sample buffer (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol) and incubated at 90°C for 5 min. The samples were electrophoretically separated on 6% polyacrylamide gels and stained with Coomassie Brilliant Blue. In order to observe the activity of the recombinant proteins in SDS-PAGE gels, periodic acid-Schiff reagent staining (PAS) was performed. The cellular extracts were run on SDS-PAGE gels, followed by washing in a preincubation buffer (50mM potassium phosphate buffer and 1% of Tween 80). Subsequently, overnight incubation in the preincubation buffer including 5% raffinose was carried out. The gels were washed 30 min with a solution of ethanol (75% v/v) and acetic acid (5% v/v) followed by 3 X 20 min sodium metabisufite (0.2% w/v) and acetic acid (5%v/v). Afterwards, the gels were stained with Schiff reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.), yielding purple spots where fructan polymer was produced. The reaction is stopped by incubation with a solution of sodium metabisufite (0.2% w/v) and acetic acid (5%v/v). In order to determine the type of polymer produced by the IS2 and IS3 forms, two SDS-PAGE activity gel were carried out in parallel. After incubation with raffinose, the buffer was change 50mM pH 4.5 acetate buffer and one of these gels was add with inulinase at 37°C and 48 hours. After this treatment periodic acid-Schiff reagent staining (PAS) was performed.

#### *Nucleotide sequence accession number*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

The sequence of the entire *isl* gene has been submitted to the GenBank under accession number AY191311.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Purification of the protein and isolation of the gene.*

Two peptides were sequenced from a purified inulosucrase after extraction from *L. citreum* cell culture by 8M urea treatments (9) and purified by SDS-PAGE electrophoresis (Figure 1). Using genomic DNA from *L. citreum* a 3 kpb fragment was amplified by PCR techniques using primers that were designed from the two peptides (Figure 2a). Sequence analysis of the 3 kpb fragment indicates identity both, with fructosyltransferases genes (*ftf*) in the amino terminal but also with the alternansucrase gene (*asr*) particularly in the C-terminal. Based in the homology with *asr*, two additional primers were designed in order to isolate the 3' (Figure 2b). With inverse PCR techniques the 5' of the *isl* ORF and the promoter region of the gene were obtained (Figure 2c).

### Nucleotide sequence analysis

In total, a DNA fragment of 5063 bp was sequenced. The analysis of this sequence shows one open reading frame of 4473 pb (ORF1), starting at 591. The consensus Shine-Dalgarno sequence is AGGAGG, at 8 pb upstream of the ATG initiation codon, a putative ribosomal binding site (RBS) was found "AGGGAG". the same RBS has been reported 8pb upstream of the initiation codon for the ASR in *L. mesenteroides* 1355 (1). A putative promoter sequenced can be identified 34 pb upstream of the ATG, with -35 (TTGTAAC) and -10 (TATAGT) with a spacing of 19 nucleotides. The gene of inulosucrase (*isl*) encodes a protein of 1490 amino acids starting in the position 591, and has a deduced molecular weight of 165,137 Da and a pI of 5.09. This is the largest FTF described until now.

The percentage G+C content of the *isl* gene is 37.25%, which is consistent with the value reported by Kim et al (13). The codon usage in the *isl* gene is consistent with the typical codon preferences found in *Leuconostoc* genes.

Using the complete *isl* gene as a probe, we made a Southern blot analysis in order to locate the *isl* gene in the *L. citreum* CW28 genome. The plasmid and the genomic DNA of *L. citreum* were run in separated lanes. After transferring and hybridisation, only the lane with

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

the genomic DNA and the control hybridised with the *isl* probe (data not show), indicating that the *isl* gene is located in the chromosomal DNA of *L. citreum*.

#### *Amino acid sequence analysis*

Blast searches with the deduced amino acid sequence revealed similarities with *Bacillus subtilis* LS (02730; 39% identity and 56% positives in 433 amino acids), *Clostridium acetobutylicum* LS (AAK79737.1; 39% identity and 55% positives in 456 amino acids), *S. salivarius* FTF (Q55242; 36% identity and 52% positives in 714 amino acids) and *S. mutans* FTF (P11701; 31% identity and 45% positives in 784 amino acids). Lower similarities were founded with *Ewinia amylovora* LS (Q46656; 28% identity and 44% positives in 438 amino acids) and *Rahnella a quatilis* LS (O54435; 28% identity and 43% positives in 435 amino acids). As expected the identity with FTFs from Gram-positives is higher than with Gram-negatives.

When an identity sequence analysis is carried out, high similarity was found with FTFs in the 209-700 amino acid region. In the deduced sequence, the amino acid residues 293 to 734, a core of 441 amino acids could be identified with the glycosyl hydrolase 68 family, which include several bacterial levansucrases and invertase from *Zymomonas* (pfam02435; website: <http://pfam.wustl.edu/>). Alignments with FTF's from Gram-positive bacteria show 8 blocks of conserved sequences that can be easily identified in IS (Figure 3).

Surprisingly, the amino and carboxy terminal regions 1-138 amino acid and of 940-1490 amino acid regions, are similar to alternansucrase domains: the variable region and the carboxy terminal domain. However the ASR catalytic domain is substituted by a complete FTF. This explains the high molecular weight of IS as two additional domains are found when compared with most FTF. In this context, IS is an ASR where the catalytic domain has been substituted by a complete FTF or, it is a FTF where the ASR N-terminal and C-terminal have been added.

As already mentioned, the C-terminal of the deduced amino acid sequence showed very high similarities with ASR from *L. mesenteroides* (AJ250173; 80% identity and 86% positives in 564 amino acids). This domain has been considered as capable of binding polymer (glucan for ASR) and consists of a series of related but not identical tandem repeats, each of 20-30 amino acids and defined as A, B, C and D. In general the GBD from glucosyltransferases present different repeats motifs (5). In IS as well as in ASR only motif A is found (Figure 4a).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Furthermore, a seven repeat elements set only found for ASR (12) but not for another glucosyltransferase is present in IS (Figure 4b). The C-terminal repeats domain of streptococcal GTF's binds glucans and probably contributes to sucrose-dependent adherence. In some GTF's but not all, it is also essential for the retention of glucan synthesis activity. The function of this domain in the GTF remains to be determined.

#### Signal peptide

Analysis of the IS amino acid deduced sequence revealed the presence of a putative Gram-positive signal peptide, and a cleavage site following amino acid 39 was predicted using the program designed by Nielsen *et al.*, 1997. To confirm the cleavage site, the *L. citreum* strain CW28 enzyme was purified by SDS-PAGE and subject to N-terminal sequence analysis. The first 10 amino acids were identified as DVNQPLLAQK; except for the 10<sup>th</sup> residue this sequence is identical to that of the deduced amino acid sequence after the predicted signal peptide cleavage site.

#### Expression of the *isl* gene in *E. coli* and characterisation of the protein

A fragment of 5007 pb included the complete *isl* gene and its promoter region was cloned in the vector pCR 4-TOPO resulting the plasmid pCRIS, which was transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . The full-length construction of IS yield many transformants. Extract of *E. coli* DH5 $\alpha$  cells containing the plasmid pCRIS showed sucrose transforming activity as measured by the release of reducing power from sucrose. SDS-PAGE of cell extracts showed that the IS protein is present as a band in the same molecular weight as the wild type enzyme. An activity gel with raffinose as substrate was made observing polymer production activity in both the wild and the recombinant enzyme forms after staining with the Schiff reactive (Figure 5).

#### *Expression of two C-terminally (GBD) truncated version of the *isl* gene in *E. coli**

In order to investigate the function of the C-terminal region in the enzyme two deletions of the carboxy-terminal region were designed. In the first deletion (56 to 3333 pb), the AS identity region was eliminated. A fragment of 3475 pb was cloned in pCR-4TOPO vector resulting in the plasmid pCRIS2 used to transform *E. coli* DH5 $\alpha$ . In the second deletion a fragment of 2731 pb was constructed deleting the same region as before plus the transition region the fragment was cloned in the same vector resulting the plasmid pCRIS3 used to



transform *E. coli* DH5 $\alpha$  (Figure 6). Transformants were obtained with both plasmids. Extracts of *E. coli* DH5 $\alpha$  cells showed sucrose consumption and polymer synthesis activities. According to SDS-PAGE activity gel, a molecular weight of 105000 and 83000 was estimated for the two deletions (Figure 5a). The three enzyme forms showed activity at 30°C pH 6.5. The presence of the additional C-terminal domain in EIS activity and stability was studied, concluding that while the complete enzyme expressed in *E. coli* has a specific activity of 0.015 U/mg of protein, 0.016U/mg and 0.031U/mg was measure for EIS2 and EIS3 respectively (Table 2). It may be concluded that the deletion of the 750 amino acid has an impact in the enzyme activity increasing the reaction rate, probably due to less steric hindrance effect in the reactants transport, usually controlling the reaction rate. Interestingly, the half life of the EIS3 at 40°C, is reduced to 12 minutes, while the EIS is relatively more stable (70 min), EIS2 has a half life of 20 min (Table2). The carboxy terminal contribute to the stability of the enzyme. Moreover, when the C-terminal is deleted the enzyme EIS3 is more hydrolytic that the complete enzyme (Table 2).

In order to determine the type of polymer produced by the EIS2 and EIS3 forms, two SDS-PAGE activity gels were carried out in parallel. After incubation with raffinose, the buffer was changed to 50 mM acetate buffer pH 4.5 and one of the gels subjected to inulinase treatment at 37 °C for 48 h, followed by periodic acid-Schiff reagent staining (PAS). In Figure 5a it may be observed that the product of the recombinant enzymes EIS, EIS2, EIS3 is digested by inulinase, while the control (levan) remains in the gel, allowing the conclusion that they are all capable of inulin synthesis (Figure 5b).

It may concluded that this inulosucrase is the first glycosyltransferase that has been found with structural and module characteristics of glucosyltransferase but still bearing fructosyltransferase activity.

When the C-terminal domain was deleted, the resulting enzyme was more hydrolytic than the wild type enzyme, this result is interesting because this is the first FTF that present this modular structure reported only for glucosyltransferase.

This feature could be particular of *Leuconostoc* genera since we have identified two hypothetical protein of *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 (NCBI Microbial Genomes Annotation Project) with homology with levansucrases, bearing C-terminals regions with identity with glucosyltransferase. Actually, the FTFs reported in *Leuconostoc* genera have molecular weights of more than 100 kDa, the average of bacterial FTFs molecular weight. It

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

is important still to verify if the presence of the additional domains has also an impact on the reaction mechanism or if it was only an adaptive form to increase the enzyme stability and avoid sucrose hydrolysis by avoiding water access to the catalytic domain.

How we mentioned in the introduction the propose mechanisms for the synthesis of fructans and glucans by FTFs and GTFs are very different and its possible that this inulosucrase of *L. citreum* follow a mechanism of glucosyltransferase because of the presence of this C-terminal glucan binding domain. Nowadays, we are investigate about the mechanism that follow the inulosucrase of *L. citreum* and even we are studied another fructosyltransferases of another strains of *Leuconostoc* in order to know if present similar characteristics of this enzyme.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This project was supported by Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) UNAM and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No 118116 and 25281-B.

We thank to Dr. Miguel Lara Flores and Dra. Guadalupe Espin Ocampo. T.L. Fernando Gonzalez by technical support. Eugenio López and Paul Gaytan by primer synthesis.

#### REFERENCES

- Argüello-Morales, M., Remaud-Simeon, M., Pizzut, S., Sarçabal, P., Willemot R. and Monsan, P. (2000). Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *FEMS Microbiol Lett* 182: (1) 81-85.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (2001) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Batista, F.R., Hernandez, L., Fernández, J., Arrieta, J., Méndez, C., Gómez, R., Tambara, Y., and Pons, T. (1999) Substitution of ASP-309 by ASN in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase affect sucrose hydrolysis, but not enzyme specificity. *Biochem J* 337: 503-506.
- Devulapalle, K., Goodman, D., Gao, Q., Hemsley, A., and Mooser, G. (1997). Knowledge-based model of a glucosyltransferase from the oral bacterial group of mutans streptococci. *Protein Sci.* 6: 2489-2493.
- Ferretti, J.J., Gilpin, M.L., and Russell, R. (1987) Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* MFe28, *J Bacteriol* 169: 4271-4278.

- Funane, K., Ishii, T., Matsushita, M., Hori, K., Mizuno, K., Takahara, H., Kitamura, Y., and Kobayashi, M. (2001) Water-soluble and water-insoluble glucans produced by *Escherichia coli* recombinant dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr Res* 334: 19-25.
- Funane, K., Ookuta, T., and Kobayashi, M. (1998). Glucan binding regions of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62(1):123-127.
- 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.* 14; 32(49):13696-13702.
- Hamada S, Horikoshi, T., Minami, T., Okahashi N., and Koga, T. (1989). Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan from serotype c *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol* 135: 335-344.
- Hettwer, U., Gross, M., and Rudolph, K. (1995). purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J Bacteriol* 177(10): 2834-2839.
- Jacques NA. (1995). Extracellular sucrose metabolism by *Streptococcus salivarius*. *Dev Biol Stand* 85: 315-322.
- Janecek, S., Svensson, B., and Russell, R. (2000) Location of repeat elements glucansucrases of *Leuconostoc* and *Streptococcus* species. *FEMS Microbiol Lett* 192: 53-57.
- Kim, J., Chun, J., and Han, HU. (2000) *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from Kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1915-1919.
- Koepsell, H., Tsuchiya, H., Hellman, N., Kazenko, A., Hoffman, C., Sharpe, E., and Jackson, R. (1953). Enzymatic synthesis of dextran. *J Biol Chem* 200: 793-801.
- Kralj, S., Van Geel-Shutten, G., Rahaoui, H., Leer, R., Faber, E., Van der Maarel, M., and Dijkhuizen, L. (2002). Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 synthesizing a unique, highly branched glucan with alpha-(1->4) and alpha-(1->6) glucosidic bonds. *Appl Environ Microbiol.* 68:4283-4291.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Mateju, J., Cudlin, J., Steinerova, N., Blumauerova, M., and Vanek, Z. (1978). Isolation of glucosyltransferase from *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol (Praha)*. 23(5):337-340.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Miller, A., Eklund, SH., and Robyt, J. (1986). Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr Res* 147: 119-133.
- Monsan, P., and Paul, F. (1995). Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbial Rev.* 16: 187-192.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and Gunnar von Heijne. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage site. *Protein Engineering* 10: 1-6.
- Ohtsuka, K., Hino, S., Fukushima, T., Osawa, O., Kanematsu, T., and Uchida, T. (1992) Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM- 1683. *Biosci Biotech Biochem* 56: 1373-1377.
- Olivares-Illana, V., Wachter-Rodarte, C., LeBorgne, S., and López-Munguía, A. (2002) Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from *Pozol*, a fermented corn beverage of Mayan origin. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 112-117.
- Pérez, M.A., Güereca, L., and López-Munguía, A. (1996). Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 45:465-471
- Pons, T., Hernández, L., Batista, F., and China, G. (2000). Prediction of a common  $\beta$ -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Sci.* 9: 2289-2291.
- Skov, L., Mirza, O., Henriksen, A., Potocki, G., Remaud-Simeon, M., Sarcabal, P., Willemot, R., Monsan, P., and Gajhede, M. (2000). Crystallization and preliminary X-ray studies of recombinant amylosucrase from *Neisseria polysaccharea*. *Acta Cryst.* D56: 203-205.
- Summer, J.B., and Howell, S.F. (1935). A method for determination of invertase activity. *J Biol Chem* 108: 51-54.
- van Hijum, S., van Greel-Schutten, H., Rahaoui, H., van der Maarel, M., and Dijkhuizen, L. (2002). Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesized high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol.* 68:4390-4398.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## LEGENDS TO FIGURES

Table 1. Primers designed for the isolation of inulosucrase gene from *L. citreum*. Where K= G or T; R= A or G; M= A or C and Y= C or T.

Table 2. Characterization of IS and two C-terminal truncated recombinant enzymes.

Figure 1. SDS-PAGE analysis of *L. citreum* proteins: Whole *L. citreum* cells where a polymer production *in situ* is observed (lane 1). Whole *L. citreum* cells stained with coomassie blue (lane 2). Standard molecular weight (lane 3).

Figure 2. Strategy used for the isolation of the *isl* gene from *L. citreum* CW28 chromosomal DNA.

Figure 3. Alignment of the IS with fructosyltransferases from other microorganisms. Alignments were made with CLUSTALW. An asterisk indicates a position with a fully conserved amino acid. Colon indicates a position with a fully conserved strong groups and a dot indicates a position with a fully weaker group. In boxes are conserved regions in fructosyltransferases.

Figure 4. Alignments of a) the three repeat elements from C-terminal of IS of *L. citreum*, the A element present in streptococcal GTF. b) seven repeat sequences from the C-terminal domain of IS of *L. citreum*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figure 5. a) SDS-PAGE activity analysis of *L. citreum* proteins cloned in *E. coli* staining with Schiff reactive. The wild IS from *L. citreum* (lane 1). The recombinant IS from *E. coli* (lane 2). The truncate IS2 from *E. coli* (lane 3). The truncate IS3 from *E. coli* (lane 4). The levansucrase of *B. subtilis* as control (lane 5). b) a) SDS-PAGE activity analysis and staining with Schiff reactive after inulinase treatment. The wild IS from *L. citreum* (lane 1). The recombinant EIS from *E. coli* (lane 2). The truncate EIS2 from *E. coli* (lane 3). The truncate EIS3 from *E. coli* (lane 4). The levansucrase of *B. subtilis* as control (lane 5).

Figura 6. Representation of the three versions of the IS proteins that were expressed in *E. coli* DH5 $\alpha$ . EIS, is the complete enzyme; EIS2 is the enzyme with a deletion of the C-terminal that present high identity with AS and EIS3 is the enzyme with a deletion of the same region of EIS2 plus a transition region.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Table 1.

| Primer | Sequence (5' to 3')               | Use         |
|--------|-----------------------------------|-------------|
| 28IS   | GATGKTGGGATAGYGGGCKTTRCAAGAT      | PCR         |
| 29IS   | ATCRACAAA YTMGCMCCMGCTTCACCATATGG | PCR         |
| 539IS  | CCATATGGTGAAGCGGGGGCGCAGTTTGTCGAT | PCR         |
| 868IS  | CCCTTAAGCTTGCAAAGCACGCTTATCAATCCA | PCR         |
| 128rIS | ATCTTGTAACGCCCAACTATCCCACACATC    | Inverse PCR |
| 42rIS  | GCAAGTGGTCTTTGCTTTAATGGGAGC       | Inverse PCR |
| 11PIS  | GCTATGGCGTCATGCAGGAACCACTTTATC    | PCR         |
| 385IS  | CTAATTTAAATCGCGTGAAAAGCTAATGGC    | PCR         |
| 384IS  | CCTAAGAGTGATCATCATCTCCCCAAACCC    | PCR         |

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Table 2

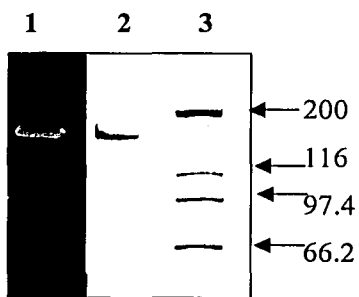
| Enzymatic form | Molecular Weight (kDa) | Activity (U/mg) | Half life at 40°C (min) | Hydrolysis/transfer % |
|----------------|------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------------|
| EIS            | 165,137                | 0.015           | 70                      | 47                    |
| EIS2           | 102,630                | 0.016           | 20                      | nd                    |
| EIS3           | 80,556                 | 0.031           | 12                      | 70                    |

nd means no determinated

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

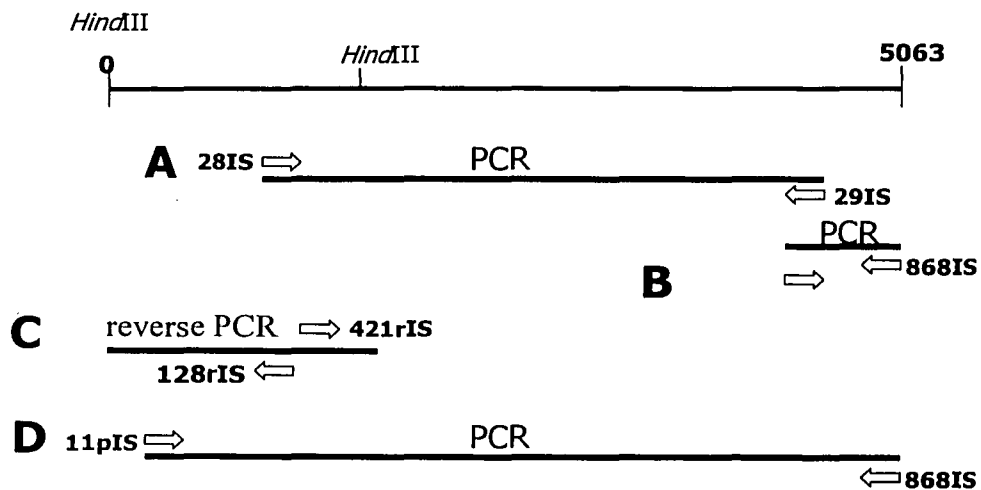


Figure 1



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figure 2



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figure 3

1  
S.salFTF IQVVDSNIPVQDAKSGVVSNNWGYQLVISMAGAPNKN-SNHIYLLYRKYGDNDFTHWKNAG 341  
Lb.reutIS LDVYDASIPVQDVRTGQVANWNGYQLVIAMGIPNQN-DNHIYLLYRKYGDNELSHWKNVG 326  
S.mutFTF LDVYDASIPVQDAKTGEVINWNGYQLVVAMGIPNTN-DNHIYLLYRKYGDNNFDHWKNAG 302  
L.citreamIS MDVYDASIMALQDSKTGEVINYHGKQVVFALMGAPLVQGDTHIYMLYNNYNNNAKLDGWWNAG 410  
:\*\*\*\*\*:\* : \* \* \* : \* \* : \* \* : \* \* : .....\* : \* : \* \* \*

2 3  
S.salFTF PIFGYNALEDDQNSGSATVNSDGSIQIYTYTKNDTSGGKLNWQQLASATLNLAVENDEVV 401  
Lb.reutIS PIFGYNSTAVSQEWSGSAVLNSDNSIQLEYTRVDTSDNNTNHQKIASATLYLTDNNGNVS 386  
S.mutFTF SIFGYNETPLTQEWSSSATVNEGDLSQLFYTKVDTSDKNSNNQLATATVNLGFDQDVR 362  
L.citreamIS PVFGYNAKPEQWSGSAVVNSDDSIQLEYTRVADDWK---QALATVNIKITSNENSLG 466  
:\*\*\*\*\* :\*\*\*\*\*:\*.\*:\*:\*:\* : \* :\* : : : .. :

4  
S.salFTF IKSVENDHILFGG--DNYHYQSYPKFMSTFDDDNHNDGNPDRTDNYCLRDPHHIED-NGS 458  
Lb.reutIS LAQVANDHIVFEG--DGYYYQTYDQWKATNKG-----ADNIAMRDPHHIVEDNGD 434  
S.mutFTF ILSVENDKVLTPEGVMAYHYQSQWRSTFTG-----ADNIAMRDPHHIVEDNGD 412  
L.citreamIS IQSLQNDHILFEG--DGYFYSRDKQLKP-----QADMFTLRDPKLIELDDGE 511  
: : \* \* : : \* \* : : \* : \* \* : \* \* : \* \* :

5  
S.salFTF RYLIFESENTGDENYQGEKQIYKMSNYGGDDAFNLKSFNLINVNKHLYNLASWANGSIGIL 518  
Lb.reutIS RYLVEEASTGLENYQGEDQIYNWLNYGGDDAFNIKSLFRILSNDDIKSRATWANAAIGIL 494  
S.mutFTF RYLVEEASTGTENYQGEDQIYNFTNYGSSAYNVKSLFRFLDDQDMYNRASWANAAIGIL 472  
L.citreamIS RYLTFEANTGIYDEASDQQTVNLNYYGGGLTYDVARMLGVVNSNRALYSSTANGAIGLL 571  
\*\*\* \*\* : \* : \* \* : \* \* : : : : : : : : \* : \* \* :

6 7  
S.salFTF KLDDNEKNPSVAELYTPLVTSHMVTDEVERPSVVMKGGKYYLFETASRINKSTDAEGTVAA 578  
Lb.reutIS KLNKDEKNPKVAELYSPLISAPHVSDEIERPNVVKLNGKYYLFAATRNLNRGSNDDAWMA 554  
S.mutFTF KLKGDKKTPVEDQYFTPLLSSTMVSDLELRPNVVKLGDKYYLFTASRLNHRGSNDDAWMA 532  
L.citreamIS KLKGDYFNPILDRLYKPLITAVGVTDIEERANIVPFNGKYYLFTDSRFNRSAAD---NSP 628  
\* \* : \* : \* : \* \* : \* \* : \* \* : \* \* : \* \* :

8  
S.salFTF REAVGDVVMLGFVSDSLRGKYRPLNGSGVVLTASVPADWRTSTYSYAVPVEGSSDTLL 638  
Lb.reutIS NYAVGDNVAMGVYVADSLTGSYKPLNDSGVVLTASVPANWRTATYSYAVPVAGKDDQVL 614  
S.mutFTF NEVVGDNVVMLGYVSDQLTNGYKPLNNSGVVLTASVPADWRTATYSYAVPVAGSSDTLL 592  
L.citreamIS MSMAPDGAMMMGFVSDSLFGDYKPLNGNGIVLVTNNSFTSRNTTYSWYTVPVKGRPDML 688  
\* \* \* : \* : \* \* : \* \* : \* \* : \* \* : \* \* :

S.salFTF VTSYMTNRGGIAGAENKSTWAPSFLLKMNADDTTEVLPKMTNQGDIWDBKSSSELVHVGD 698  
Lb.reutIS VTSYMTNRNGVAGKMDSTWAPSFLLQINPDNTTTLAKMNTNQGDIWDDSSENLDMIGD 674  
S.mutFTF MTAYMTNRNEVAGKGNSTWAPSFLLQVLPDCTTKVLAEMTQQGDWIDEPSRRTDTVGT 652  
L.citreamIS VTSYMTNRGLASGTQYSTFAPSFLKIDGD-QTHVLTNVTTEQGDWVWGGDDHSHIVELLA 747  
:\*\*\*\*\* : \* \* \* : \* \* : \* \* : \* \* : \* \* : \* \* :

S.salFTF Q--NSAKLPNEDEFV---DYYAVSG-YGLKPHYPTVDGSTGVSE---AHGVLTVTVKDG 749  
Lb.reutIS L--DAAALPGERDKP---VDWDLIG-YGLKPHDPATPN----- 706  
S.mutFTF L--DTAYLPGENGGY---IDWNVIGGYGLKPHTPGQYQ----- 685  
L.citreamIS LNTEDAYLTNNQKNINYSPDWSHIDGYGYPIVTVNIKVDVLTFTYISGILSPDLSFKNAPGR 807  
: \* \* \* : \* \* :

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figure 4a**

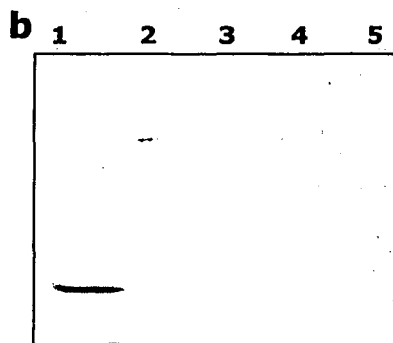
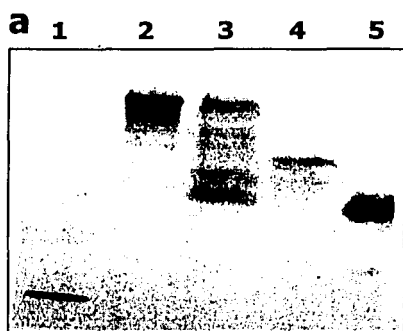
|           |                                       |
|-----------|---------------------------------------|
| IS 1142   | QQYFDDQGTGWSEVVL-GGQTVWVD-NHALAQMQV   |
| IS 1309   | TYYLTLNLNGQSTWIDKRAFTAT-FDQV-VALNATIV |
| IS 1399   | YVTNYNQQTVPVTKQHSDAQGNQWYLATVNGTQYWID |
| element A | WYYFDNNGYAVTGLQTINGQHLYFDANGVQVKG     |

**Figure 4b**

|      |           |
|------|-----------|
| 953  | DGLFLNAP  |
| 1032 | DGLFLNAPY |
| 1111 | DGLFLNAPY |
| 1190 | DGLFLNAPY |
| 1269 | DGLWLNAPY |
| 1348 | DGMFKTAPY |
| 1428 | DGVFSGAPY |

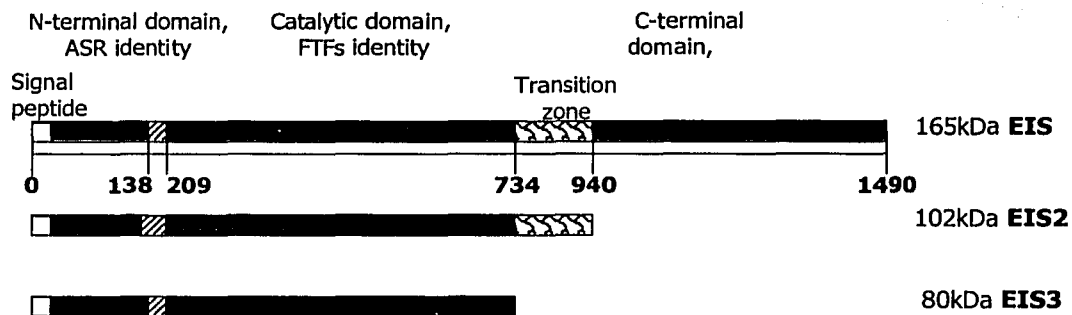
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figure 5



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figure 6



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANEXO 2

Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin  
Oliveras-Illana V., Wachter-Rodarte W., LeBorgne S., & López-Munguía A.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin

V Olivares-Illana<sup>1</sup>, C Wachter-Rodarte<sup>2</sup>, S Le Borgne<sup>1</sup> and A López-Munguía<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, CP 62271, Mexico; <sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, CP 04510, México, D.F., Mexico

A cell-associated fructosyltransferase was extracted from a novel source, a strain of *Leuconostoc citreum* isolated from Pozol, a Mexican traditional fermented corn beverage, where lactic microflora are partially responsible for the transformation process. The enzyme is associated with the cell wall. It was characterized both in its cell-associated insoluble form and after separation by urea treatment. The fructosyltransferase has a molecular mass of 170 kDa, the highest reported for this type of enzyme, and in its insoluble form is highly specific for polymer synthesis, with low fructose transferred to maltose and lactose added to the reaction medium (acceptor reactions). The synthesized polymer has an inulin-like structure with  $\beta$ 2-1 glycosidic linkages, as demonstrated by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (NMR). Bacterial inulosucrases have only been reported in *Streptococcus mutans*.

*Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (2002) 28, 112–117 DOI: 10.1038/sj/jim/7000224

**Keywords:** *Leuconostoc citreum*; inulosucrase; sucrose; levansucrase; dextransucrase

## Introduction

Fructosyltransferases such as levansucrase (LS), as well as glucosyltransferases like dextransucrase (DS), are examples of glycosyltransferases that catalyze the transfer of a fructose or a glucose residue from sucrose to a growing polysaccharide chain, resulting in the synthesis of high molecular weight polymers of fructose (fructans) or glucose (glucans), respectively. The polymers produced by these enzymes have different sizes and structures, depending on the enzyme-producing strain. Dextrans are glucans containing a main linear chain with  $\alpha$ 1-6 glucosidic linkages [23], while mutans are distinguished by the  $\alpha$ 1-3 bonds in the main chain "alternate"  $\alpha$ 1-6 and  $\alpha$ 1-3 linkages in their structure. Branching may occur in different positions such as  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-4 and  $\alpha$ 1-6, depending on the source of the enzyme [5]. On the other hand, levans are fructans containing  $\beta$ 2-6 linkages in the main linear chain with  $\beta$ 2-1 branch points, while the reverse is the case for inulin ( $\beta$ 2-1 in the main chain and  $\beta$ 2-6 branch points) [24]. The corresponding glycosyltransferases do not require any cofactors or high-energy phosphorylated intermediates, as they use the free energy liberated by the cleavage of sucrose for the synthesis [19]. All these polymers have found a variety of applications in the fields of cosmetics, foods, separation technology and medicine.

An interesting feature of these enzymes is their ability to catalyze the synthesis of low molecular weight oligosaccharides from sucrose when efficient acceptor molecules like maltose are added to the reaction medium [13]. Some of these oligosaccharides are used as prebiotics in both cosmetic and food applications

as they are highly resistant to attack by digestive enzymes, being substrates only for beneficial native probiotic flora [30].

The main producers of fructosyltransferases are Gram-positive bacteria such as several *Bacillus* species (including *Bacillus subtilis* [4], *Bacillus circulans* [19], *Bacillus polymyxa* [3], *Bacillus amyloliquefaciens* [29]), *Rahnella aquatilis* [18], and *Lactobacillus reuteri* [32]. They are also found in some Gram-negative bacteria such as *Zymomonas mobilis* [14], *Erwinia herbicola* [5], *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola* [9] and *Acetobacter diazotrophicus* [1,2]. All the fructosyltransferases from these microorganisms are levansucrases (LSs), with levan as the main enzymic product. Inulosucrases have been isolated only from plants and fungi, with the exception of a similar activity reported in *Streptococcus mutans* by Shiroza *et al* [26]. Both *Leuconostoc mesenteroides* as well *Streptococci* from oral flora have been reported as dextran and levan producers [7,8]. Differences among bacterial fructosyltransferases are illustrated in Table 1.

Dextransucrases (DSs) are extracellular enzymes, cell-associated or both, depending on the producing strain while LSs are generally extracellular with the exception of LS from *Actinomyces viscosus*, which produces extracellular and cell-associated forms [31] and that from *Streptococcus salivarius*, which is cell-associated in the absence of sucrose, but released from the cell and secreted into the culture medium in its presence [12]. DSs are large enzymes, with a reported molecular mass from 64 to 184 kDa [21], while LSs are smaller with a molecular mass between 45 and 64 kDa, with the exception of the *S. salivarius* and *S. mutans* enzymes, which have molecular masses of 140 (fructosyltransferase) and 87 kDa (fructosyltransferase with inulin-like activity), respectively, as reported in Table 1 [11,26]. There are few reports documenting LS activity in *L. mesenteroides*. Actually, due to very low expression levels, LS activity in this source had previously been considered as a minor contaminant of DS [17,20,33]. Up to now

Correspondence: Dr A López-Munguía, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, CP 62271, México

Received 25 September 2000; accepted 30 October 2001



Table 1 Comparison of the properties of fructosyltransferases produced by several bacteria

| Microorganisms                                | Cellular localization | Molecular mass (kDa) | Optimal pH | Optimal temperature (°C) | $K_m$ (mM) | Production   | Acceptor reactions | References |
|-----------------------------------------------|-----------------------|----------------------|------------|--------------------------|------------|--------------|--------------------|------------|
| <i>B. subtilis</i>                            | extracellular         | 50                   | 6.5        | 45                       | 18         | induced      | yes                | [4]        |
| <i>B. circulans</i>                           | extracellular         | 52                   | 6.5        | 40                       | 20         | —            | yes                | [19]       |
| <i>A. diazotrophicus</i>                      | extracellular         | 58, 65               | 5.0        | —                        | 11.8±1.4   | constitutive | yes                | [1,2]      |
| <i>R. aquatilis</i>                           | extracellular         | 64                   | 6.0        | 55–60                    | 50         | —            | —                  | [18]       |
| <i>Z. mobilis</i>                             | extracellular         | 47                   | 5.0        | 50                       | 122        | —            | —                  | [14]       |
| <i>E. herbicola</i>                           | extracellular         | —                    | —          | —                        | —          | constitutive | —                  | [5]        |
| <i>P. syringae</i><br>pv. <i>phaseolicola</i> | extracellular         | 45                   | 6.2        | 18                       | 160        | constitutive | —                  | [9,10]     |
| <i>S. mutans</i>                              | extracellular         | 74, 80, 87, 90       | —          | —                        | 12±1       | constitutive | —                  | [11,12,25] |
| <i>S. salivarius</i>                          | extracellular*        | 140                  | —          | —                        | —          | constitutive | —                  | [11,26]    |
| <i>L. citreum</i> CW28                        | cell-associated       | 170                  | 6.5        | 45                       | 66         | induced      | no                 | this work  |

\*Extracellular in the presence of sucrose.

— None reported.

the fructosyltransferase from *S. mutans* is the only inulosucrase reported in bacteria.

In this work, we report on a novel *Leuconostoc citreum* strain (CW28) identified by RNA 16S analysis performed by Midi Labs (Newark, DE), and previously identified as *L. mesenteroides* by API 50-CH, a strain that produces large amounts of a cell-associated fructosyltransferase in the presence of sucrose. This organism was detected in a collection of *L. mesenteroides* strains isolated from Pozol, a nonalcoholic fermented beverage produced by lactic acid fermentation of lime-treated corn, which is consumed in the southeast of México, in the Maya region located in the states of Chiapas, Tabasco, Campeche and Yucatán. This beverage dates back to the Maya culture and its production has been transferred by tradition and confined mainly to the rural regions. *L. citreum* was first described by Farrow *et al* in 1989 [6], followed by *Leuconostoc amelibiosum* by Schillinger *et al* in 1989 [22]. In 1992 Takahashi *et al* [28] concluded that *L. amelibiosum* is a later subjective synonym of *L. citreum*, and proposed that the name *Leuconostoc citreum* should be retained. This is the first report concerning the isolation of fructosyltransferase from *L. citreum* with inulin-synthesizing capability.

## Materials and methods

### Materials

Sucrose, glucose, lactose, raffinose and 3,5-dinitrosalicylic acid were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). The electrophoresis reagents were from Bio-Rad Laboratories (CA). Urea and Tween 80 were from Merck (Darmstadt, Germany). Yeast extract, was from Difco Laboratories (Detroit, MI).  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $NaCl$ ,  $MnSO_4$  and  $FeSO_4$  were from J.T. Baker (S.A. de C.V. Edo. De México, México). Two enzymes capable of polymer digestion were used for identification purposes: dextranase (Amano Chemical, Yokohama, Japan) and inulinase from *Rhizyromyces marxiianus*, a gift from Dr. M. García-Garibay from UAM-I, Mexico.

### Bacterial strains and culture conditions

The *Leuconostoc* strains used in this work were isolated from Pozol by Dr. Carmen Wachter (Facultad de Química de the UNAM, México). These strains were cultured in 250-ml Erlen-

meyer flasks containing 50 ml of culture medium. The cultures were incubated in a New Brunswick incubator shaker Series 25 (Edison, NJ) at 30°C, pH 6.9 for 12 h; aeration was provided by agitation at 200 rpm. The culture medium was composed of (in g/l): sucrose 20, yeast extract 20,  $K_2HPO_4$  20,  $MgSO_4$  0.2,  $CaCl_2$  0.05,  $NaCl$  0.01,  $MnSO_4$  0.01 and  $FeSO_4$  0.01. After 8 h, when the culture reached an optical density of 7–10, the culture was centrifuged for 10 min at 10,000×g. Both supernatant and cell pellet were assayed for fructosyltransferase activity. The same medium and culture conditions were used later to produce the enzyme in 500 ml Erlenmeyer flasks with 200 ml of culture medium.

The selected strain was identified as *Leuconostoc mesenteroides* by the API 50-CH test (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France), a classification kit based on the strain fermentation profile for 50 different carbohydrates. However, the strain was later sent for classification to Midi Labs (Newark, DE) who identified it as *L. citreum* by 16S rRNA analysis.

### Enzyme assays

Enzyme assays were carried out at 30°C in 12 ml of 50 mM phosphate buffer, pH 6.5, containing 27 mM sucrose and using complete cells or an appropriate dilution of the culture supernatant as the enzyme source. Total glycosyltransferase activity was measured by following the initial release of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid method (DNS) [27]. One activity unit (U) for all glycosyltransferases is defined as the amount of enzyme that produces 1  $\mu$ mol of either fructose or glucose per minute. In the

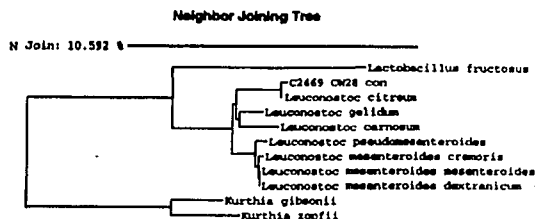


Figure 1 Phylogenetic analysis of the 16S rRNA from *Leuconostoc* strain CW28.

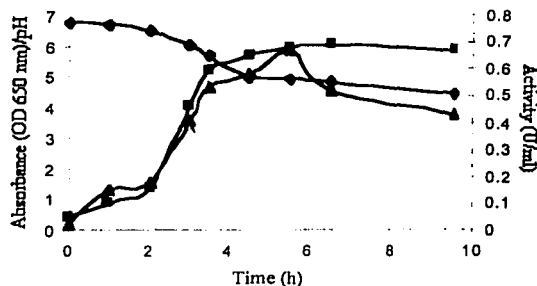


Figure 2 Time course of *L. citreum* CW28 growth, LS production and pH change in culture. (■) OD 650 nm; (▲) IS activity; (◆) pH.

case of IS the activity was also determined by measuring the initial rate of glucose release from sucrose with a glucose/fructose kit (Roche Biochemicals, Mannheim, Germany). The release of fructose in the reaction medium indicated DS activity while the release of glucose indicated LS or IS activity. Both sugars could also be formed by sucrose hydrolysis due to the transfer of glycosyl residues to water molecules. The relative amount of each activity could be determined by a sugar balance (HPLC), while in order to discriminate between LS and IS  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR) analysis of the product was required.

#### Enzyme solubilization

*L. citreum* CW28 cells grown in 200 ml culture for 4–6 h were centrifuged for 10 min at  $10,000\times g$  and extensively washed with 50 mM phosphate buffer, pH 6.5. Afterwards, several methods were applied to extract the cell-associated enzyme. Best results were obtained when the washed pellet was suspended in 5 ml 8 M urea at  $25^\circ\text{C}$  for 1 h with occasional gentle shaking [8]. The extract was then dialyzed overnight against 10 mM phosphate buffer, pH 6.5, centrifuged for 10 min at  $10,000\times g$  and the supernatant was assayed for IS activity.

#### Electrophoresis

SDS-PAGE was performed as reported by Laemmli [15]. Samples were mixed with an equal volume of  $2\times$  sample buffer (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol) and incubated at  $90^\circ\text{C}$  for 5 min. The samples were electrophoretically separated on 6% polyacrylamide gels and stained with Coomassie Brilliant Blue.

#### Glycosyltransferase activity gels

DS, IS and LS activities were detected on gels after SDS-PAGE by *in situ* production of dextran inulin or levan from sucrose. For activity *in situ*, the samples were mixed with an equal volume of  $2\times$  sample buffer (without 2-mercaptoethanol), but were not incubated at  $90^\circ\text{C}$ . After electrophoresis the gel was washed twice for 30 min with 50 mM phosphate buffer pH 6.5 containing 1% Tween 80, followed by incubation with 5% sucrose or 5% raffinose in the same buffer. Zones of enzyme activity were evident to the eye due to the formation of polymer bands. While sucrose was a substrate of DS, LS and IS, raffinose was specific for LS and IS. In some cases, the gels were treated with dextranase (Amano Chemical) after polymer synthesis in order to provide further evidence for the nature of the polymers.

Table 2 Chemical shifts for C NMR spectra of inulin, levan and the *L. citreum* CW28 polymer

| Carbon atom | Chemical shift (ppm)           |        |         |
|-------------|--------------------------------|--------|---------|
|             | <i>L. citreum</i> CW28 polymer | Levan* | Inulin* |
| C-1         | 61.4                           | 60.7   | 60.9    |
| C-2         | 103.6                          | 104.2  | 103.3   |
| C-3         | 77.5                           | 76.3   | 77.0    |
| C-4         | 74.9                           | 75.2   | 74.3    |
| C-5         | 81.8                           | 80.3   | 81.1    |
| C-6         | 62.7                           | 63.4   | 62.2    |

\*Shimamura et al [25].

#### Polymer production

Polymer production was performed with whole *L. citreum* cells at  $30^\circ\text{C}$  in 50 mM phosphate buffer pH 6.5 containing 10% sucrose for a reaction period of 5 h. Cells were removed by centrifugation and the polymer was precipitated with two volumes of ethanol, dialyzed against 10 mM phosphate buffer pH 6.5, lyophilized and analyzed by  $^{13}\text{C}$  NMR.

## Results and discussion

#### Identification of the isolated strains

Fourteen strains isolated from *Pozol* in the collection of C. Wacher were identified on the basis of their morphological and biochemical properties. The strains were aerobic, nonmotile, non-spore-forming Gram-positive bacteria. The cells were rod shaped and organized in chains of three to four cocci. All 14 strains grew as viscous colonies in sucrose solid media and were primarily identified as *L. mesenteroides* strains. Afterwards, a 16S rRNA analysis revealed that strain CW28 was closer to *L. citreum* as illustrated in Figure 1.

#### Glycosyltransferase activity

The 14 strains isolated from *Pozol* were assayed for glycosyltransferase activity by measuring total reducing sugars, glucose and fructose liberated in the reaction medium. Six of the 14 strains exhibited extracellular DS activity, two cell-associated DS activity

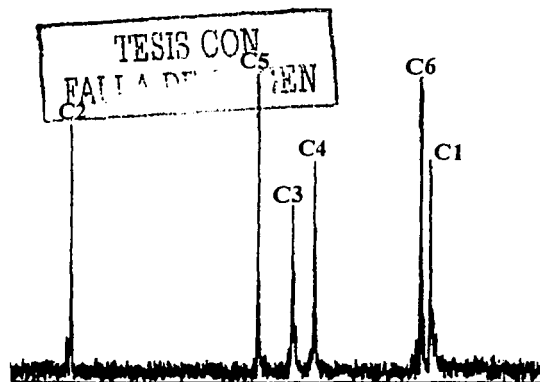
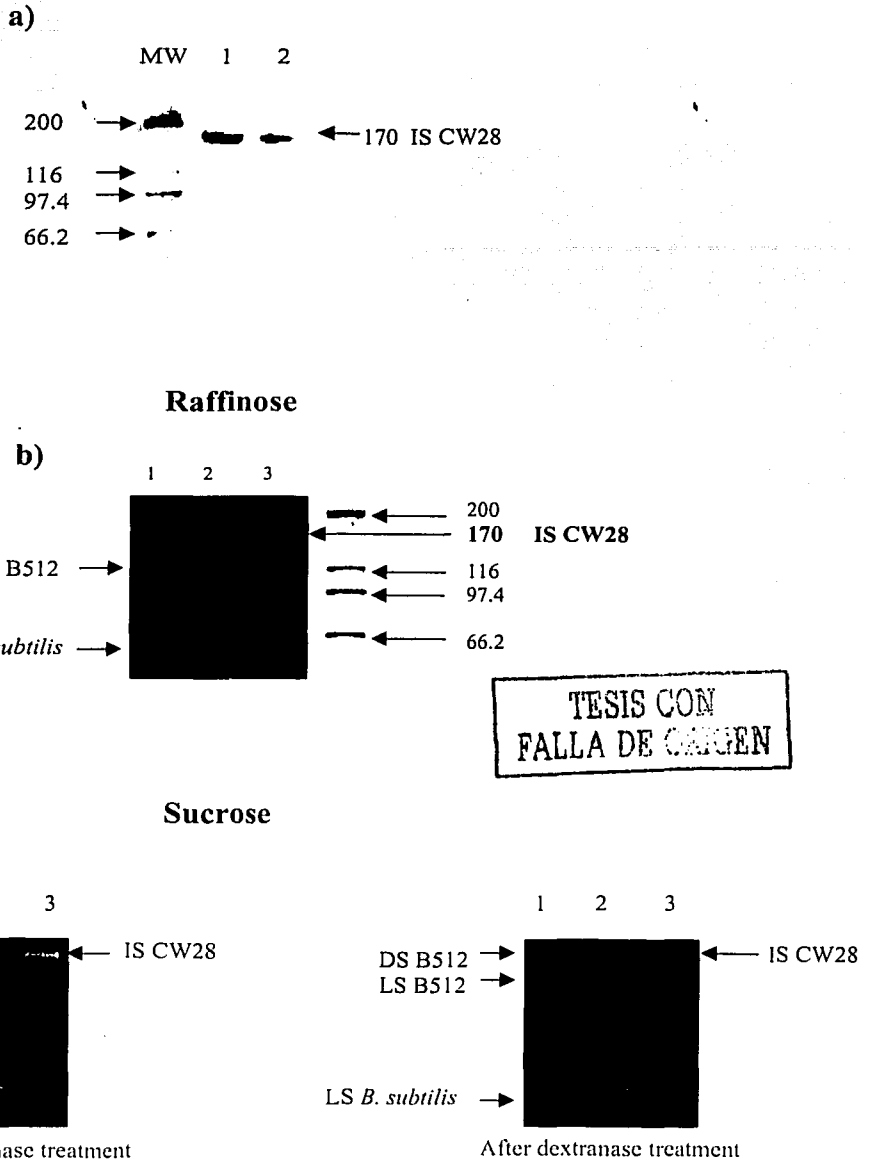


Figure 3  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of *L. citreum* CW28 polymer.



TESIS CON  
 FALLA DE CARGEN

Figure 4 SDS-PAGE analysis of *L. citreum* CW28 cell-associated and solubilized IS. (a) SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue. Lane 1, *L. citreum* whole cells in lytic solution; lane 2, 8 M urea solubilized *L. citreum* IS. (b) Activity gel. *In situ* polymer production after incubation with raffinose. Lane 1, *L. mesenteroides* B-512F; lane 2, *B. subtilis* LS; lane 3, *L. citreum* CW28 IS. (c) Activity gel. *In situ* digestion of dextran by dextranase after incubation with sucrose. Lane 1, *L. mesenteroides* B-512F; lane 2, *B. subtilis* LS; lane 3, *L. citreum* CW28 IS.

and one strain had cell-associated fructosyltransferase activity and was registered as CW28. The rest of the strains presented very low glycosyltransferase activity.

#### Fructosyltransferase production

*L. citreum* CW28 was cultured as described earlier. A typical growth curve is shown in Figure 2, where it may be observed that

enzyme production is cell associated. The enzyme was induced by sucrose and no fructosyltransferase activity was detected in cells grown in the presence of 125 mM glucose.

#### Production, identification and purification of the fructose polymer produced by the CW28 strain

Both enzymes, LS and IS produce fructose polymers in the presence of sucrose or raffinose, liberating glucose in the reaction medium. Therefore, in order to differentiate between both activities the structure of the polymer must be determined. Polymer was performed with whole *L. citreum* cells as described earlier. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of the polymer corresponded to a fructose polymer with  $\beta$ 2-1 and  $\beta$ 2-6 linkages, which is the usual structure found in inulin as shown in Figure 3. Six main resonances at 103.6, 81.8, 77.5, 74.9, 62.7 and 61.4 ppm were found, which are similar to the peak positions reported for inulin [25]. In our sample, the anomeric carbon C2, and the primary carbons C1 and C6 are closely grouped as in inulin, while of the ring carbons C3, C4 and C5, only C4 is closer to the levan group (Table 2). Furthermore, the polymer was digested with inulinase providing additional proof that the polymer produced by *L. citreum* CW28 is an inulin-like polysaccharide.

#### IS solubilization

*L. citreum* CW28 cells were treated with urea as already described in order to solubilize the cell-associated activity. After the treatment most of the IS was lost; only 10% of the initial activity in whole cells was recovered in the supernatant, with the remaining activity found in the cellular debris (30% of the original activity). Whole cells and the supernatant proteins obtained after this treatment were analyzed by SDS PAGE. Surprisingly, in whole cells only one protein, IS, was solubilized by the lytic solution in the sample buffer used for SDS-PAGE, as shown in Figure 4a and demonstrated by electrophoresis (size) and the zymogram analysis (*in situ* gel activity).

#### Properties of soluble and cell-associated IS

Molecular weight determination by SDS-PAGE was carried out with whole cells directly applied to the gel and with the solubilized IS. After SDS treatment, the gels were extensively washed to remove residual SDS and incubated in the presence of sucrose to observe the bands of activity as a result of polymer synthesis. LS from *B. subtilis* and DS from *L. mesenteroides* B-512F were used as controls. The single-band activity observed in the CW28 whole cells gel lane corresponds to a protein of a molecular mass of approximately 170 kDa. In addition, an activity gel was performed using raffinose as the fructosyl residue donor (Figure 4b). In this figure, activity bands were observed for *B. subtilis* and *L. citreum* CW28, supporting the conclusion that both strains present fructosyltransferase activity. An activity band of low molecular mass (approximately 90 kDa) was also observed in Figure 4b for *L. mesenteroides* B-512F corresponding to LS produced by this strain, as already reported [16]. The molecular weight of the *L. citreum* IS was much higher than values reported for other fructosyltransferases (45 and 64 kDa) and for almost all LSs, except for the enzyme from *S. salivarius*, which produces a 140-kDa LS; a value of 87 kDa has been documented for IS from *S. mutans* as indicated in Table 1. Further evidence for IS activity is presented in Figure 4c, where the polymer band from DS

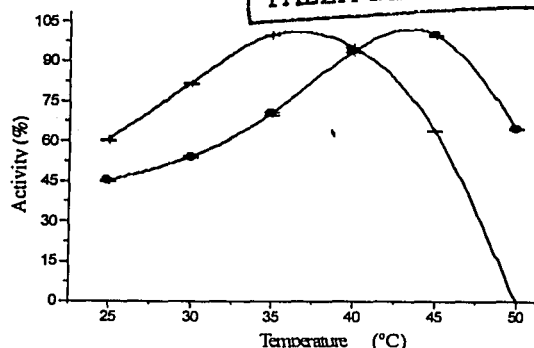


Figure 5 Effect of temperature on IS activity. The effect was determined in the presence of phosphate buffer pH 6.5. (—) solubilized IS; (•) cell-associated IS.

is completely digested by dextranase, while activity bands obtained with enzymes from *B. subtilis* and *L. citreum*, containing levan and the inulin-like polymers, respectively, are not degraded (differences between the two gels shown in Figure 4c are also due to the treatment of the right-hand gel with dextranase for 2 h at 50°C).

The optimum reaction conditions for CW28 IS were investigated. Optimum pH values for cell-associated and free IS were 6.5 in both cases (data not shown). The optimum temperature for cell-associated IS was higher than the optimum found for the soluble form, as shown in Figure 5. However, the enzymatic activity in both preparations decreased rapidly at temperatures above 45°C, with complete deactivation after 30 min at 50°C. A stability study was carried out at three different temperatures. Both cell-associated and soluble IS were stable at 30°C in a 1-h experiment. However, at 50°C the enzyme in both forms was deactivated in 30 min (results not shown). At 30°C the enzyme followed Michaelis-Menten kinetics, with  $K_m$  values of 66 and 38 mM for the cell-associated and the solubilized IS, respectively, as calculated by linear regression analysis from Lineweaver-Burk type plots in a sucrose concentration range of 0–550 mM. The specific activity of the IS was 0.25 U/mg of cells and 5.6 U/mg of urea-solubilized protein.

A common property of fructosyltransferases is their specificity to transfer the fructosyl moiety of sucrose to several acceptors, with sugars such as maltose and lactose reported among the most efficient [18]. We observed that both forms of IS from *L. citreum* had very low efficiency towards maltose and lactose. No acceptor products were obtained with the cell-associated IS, as most of the fructose in the substrate was directed towards polymer synthesis. This result, as well as the increase in the  $K_m$  to twice its original value, may be due to the effect of steric hindrances on the cell-associated enzyme. Therefore, sites potentially implicated in acceptor reactions, might become accessible when IS is released from the cell wall.

Inulin is a polysaccharide of growing industrial interest obtained solely from vegetal sources. Enzymatic synthesis from sucrose may become an attractive alternative source if successful scale-up and process economics with inulosucrases show feasibility.

**Acknowledgements**

The authors express their gratitude to Ma. Elena Rodríguez, Fernando González and Mario Trejo for technical support as well as to Dr. Manuel Jimenez Estrada for <sup>13</sup>C NMR spectra.

**References**

- 1 Arrieta J, L Hernandez, A Coego and V Suarez. 1996. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology* 142: 1077-1085.
- 2 Betancourt L, T Takao, L Hernandez, G Padron and Yasutsugu. 1999. Structural characterization of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: identification of an N-terminal blocking group and free-thiol cysteine residue. *J Mass Spectrom* 34: 169-174.
- 3 Bezzate S, M Steinmetz and S Aymerich. 1994. Cloning, sequencing, and disruption of a levansucrase gene of *Bacillus polymyxa* CF43. *J Bacteriol* 176: 2177-2183.
- 4 Chambert R, MC Rain-Guion and MF Petit-Glatron. 1992. Read-through of the *Bacillus subtilis* stop codon produces an extended enzyme displaying a higher polymerase activity. *Biochim Biophys Acta* 1132: 145-153.
- 5 Cote GL. 1988. Production of a constitutive, extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. *Biotechnol Lett* 10: 879-882.
- 6 Farrow J, R Richard, R Flackman and M Collins. 1989. Nucleic acid homologues of some vancomycin-resistant *Leuconostoc* and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 39: 279-283.
- 7 Funane K, T Ookura and M Kobayashi. 1998. Glucan binding regions of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 123-127.
- 8 Hamada S, T Horikoshi, T Minami, N Okahashi and T Koga. 1989. Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan from serotype c *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol* 135: 335-344.
- 9 Hettwer U, FR Jaekel, J Boch, M Meyer, K Rudolph and MS Ullrich. 1998. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola*. *Appl Environ Microbiol* 64: 3180-3187.
- 10 Hettwer U, G Michael and R Klaus. 1995. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J Bacteriol* 64: 2834-2839.
- 11 Jacques NA. 1993. The fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*. *New Phytol* 123: 429-435.
- 12 Jacques NA. 1995. Extracellular sucrose metabolism by *Streptococcus salivarius*. *Dev Biol Stand* 85: 315-322.
- 13 Koepsell H, H Tsuchiya, N Hellman, A Kazenko, C Hoffman, E Sharpe and R Jackson. 1953. Enzymatic synthesis of dextran. *J Biol Chem* 200: 793-801.
- 14 Kyono K, H Yanase, K Tonomura, H Kawasaki and T Sakai. 1995. Cloning and characterization of *Zymomonas mobilis* genes encoding extracellular levansucrase and invertase. *Biosci Biotechnol Biochem* 59: 289-293.
- 15 Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 16 Miller A, SH Eklund and J Robyt. 1986. Milligram to gram scale purification and characterization of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr Res* 147: 119-133.
- 17 Monsan P and A López-Munguía. 1981. On the production of dextran by free and immobilized dextranase. *Biotechnol Bioeng* 23: 2027-2037.
- 18 Ohtsuka K, S Hino, T Fukushima, O Osawa, T Kanematsu and T Ushida. 1992. Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683. *Biosci Biotech Biochem* 56, 9: 1373-1377.
- 19 Perez M, L Guereca and A López-Munguía. 1996. Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 45: 465-471.
- 20 Robyt J and F Walseth. 1979. Production, purification, and properties of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr Res* 68: 95-111.
- 21 Sánchez-González M, A Alagon, R Rodríguez-Sotres and A López-Munguía. 1999. Proteolytic processing of dextranase of *Leuconostoc mesenteroides*. *FEMS Microbiol Lett* 181: 25-30.
- 22 Schillinger U, W Holzapfel and O Kandler. 1989. Nucleic acid hybridization studies on *Leuconostoc* and heterofermentative lactobacilli and description of *Leuconostoc amelibiosum* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 12: 48-55.
- 23 Seymour F, R Knapp and S Bishop. 1976. Determination of the structure of dextran by <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydr Res* 51: 179-194.
- 24 Seymour F, R Knapp and A Jeanes. 1979. Structural analysis of levans by use of <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydr Res* 72: 222-228.
- 25 Shimamura A, K Tsuboi, NT Nagase, M Ito, H Tsumori and H Mukasa. 1987. Structural determination of D-fructans from *Streptococcus mutans*, serotype d, c, e, and f strains, by <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Carbohydr Res* 165: 150-154.
- 26 Shiroza T and HK Kuramitsu. 1988. Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions. *J Bacteriol* 170: 810-816.
- 27 Summer JB and SF Howell. 1935. A method for determination of invertase activity. *J Biol Chem* 108: 51-54.
- 28 Takahashi M, S Okada, T Uchimura and M Kozaki. 1992. *Leuconostoc amelibiosum* Schillinger, Holzapfel, and Kandler 1989 is a later subjective synonym of *Leuconostoc citreum* Farrow, Flackman, and Collins 1989. *Int J Syst Bacteriol* 649-651.
- 29 Tang L, R Lenstra, TV Borchert and V Nagarajan. 1990. Isolation and characterization of levansucrase-encoding gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Gene* 96: 89-93.
- 30 Vallete P, V Pelenc, Z Djouzi, C Andrieux, F Paul, P Monsan and O Sylit. 1993. Bioavailability of new synthesized glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *J Sci Food Agri* 62: 121-127.
- 31 Van Der Hoeren JS, GD Vogels and MF Bekkers. 1976. A levansucrase from *Actinomyces viscosus*. *Caries Res* 10: 33-48.
- 32 Van Geel-Schutten GH, EJ Faber, E Smit, K Bonting, MR Smith, B Ten Brink, JP Kamerling, JF Vliegenthart and L Dijkhuizen. 1999. Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strain. *Appl Environ Microbiol* 65: 3008-3014.
- 33 Wilke-Douglas M and J Perchorowicz. Methods of compositions for altering physical characteristics of fruit and fruit products. U.S. Patent WO 89/12386.

TESIS CON  
 FALLA DE ... EN