



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATALISIS

OBTENCIÓN DE BIOCATALIZADORES A PARTIR DE VARIANTES
DE LA LEVANSACARASA DE *Bacillus subtilis* CON NUEVAS
PROPIEDADES DE TRANSFRUCTOSILACIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN
CIENCIAS

PRESENTA:

Ma. Elena Ortiz Soto

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Agustín López-Munguía C.

Cuernavaca, Morelos. Octubre 2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis en el Laboratorio de Tecnología Enzimática, bajo la asesoría del Dr. Agustón López-Munguía Canales.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, no. 165334 y no. 53115) y por la UNAM con el proyecto PAPIIT no. IN228006-3.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Agustín López-Munguía C. por su dirección, apoyo y compromiso durante el desarrollo del proyecto.

A los miembros del Comité Tutorial: Dr. Mariano García Garibay, Dr. Eduardo Horjales y Dr. Enrique Rudiño-Piñera, por su aportación al proyecto.

A los integrantes del jurado de examen para la obtención del grado: Dr. Rafael Vázquez Duhalt, Dr. Mario Soberón Chávez, Dr. Jesús caballero Mellado y Dr. Joel Osuna Quintero, por la revisión a la tesis y su aportación para la edición final del documento.

Al Dr. Enrique Rudiño y al Dr. Manuel Rivera por la colaboración directa que se estableció en el transcurso de todo este trabajo.

A los T.L. Fernando González Muñoz y Aurelia Ocampo por el apoyo técnico brindado.

A la M.C. Ma. Elena Rodríguez por el soporte técnico en la inmovilización de enzimas y a la Dra. Clarita Olvera por la parte molecular.

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo a mi familia, por absolutamente todo.

Agradezco con especial cariño a mi hermana Chabelí, por estar, por ser mi ejemplo. A Mamá, porque es la responsable de que muchas cosas sucedan. A Era, a mis hermanas Berenice y Ceci. A Fabian, Manuel, Javier, Alexa, Angie, Eduardo y todos los que no menciono. A mi abuelo, que se me olvidó en la tesis de maestría pero que es una de las personas que más influencia han tenido en mi vida.

A mi padre siempre.

A Agustín, por ayudarme a crecer, por su amistad y su confianza. Por impulsarme a seguir adelante en cada momento.

Al grupo de las y los López. A Clarita, Male y Edmundo por su crítica y su contribución en cada etapa del doctorado, a nivel personal y profesional.

A Fer, Gina, Alina, Gaby e Ivan, por compartir los buenos, los no tan buenos y los malos momentos, por formar *“una especie de nueva familia”*.

A las Arpías: Arlette, Sandra, Chelo y Angela (que más bien pertenece a las Arpías reloaded), por ser un equipo insuperable en el plano académico y en el personal.

A Julio, Eugenio, Joyce, Nuris, Anabel, Andrés, Mil y Alejandro, por el scrabble, las películas, el karaoke, las luchas, las fiestas, etc.

A Emir, Aisel y Andrey, por el apoyo incondicional y porque siempre han estado cerca sin importar qué tan lejos se encuentren físicamente, el huso horario o el plan telefónico.

A Manuel, por su contribución tan importante al proyecto y por disentir.

Y finalmente a Enrique, por todo lo que hemos vivido en este tiempo, por ser no sólo un investigador excelente y un gran colaborador, sino el mejor de los amigos.

ÍNDICE

ÍNDICE I

ÍNDICE DE TABLAS III

ÍNDICE DE FIGURAS IV

RESUMEN 1

SUMMARY 3

INTRODUCCIÓN 5

1	GENERALIDADES	8
1.1	FRUCTANAS	8
1.2	ESTRUCTURA Y ESPECIFICIDAD DE FTF BACTERIANAS	9
1.3	INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	14
1.3.1	Inmovilización convencional e inmovilización libre de soportes	14
1.3.2	FTF inmovilizadas	15
2	OBJETIVO GENERAL	17
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1	Mutagénesis sitio-dirigida	18
3.2	Propiedades bioquímicas de la LS	19
3.3	Determinación de la relación hidrólisis/transfructosilación	20
3.4	Análisis del perfil de productos: síntesis de levana y oligosacáridos	20
3.5	Cristalización, colección de datos, determinación estructural y refinamiento	20
3.6	Cromatografía de permeación en gel	21
3.7	Electroforesis	21
3.8	Cuantificación de proteína	21
3.9	Preparación de CLECs®	22
3.10	Preparación y optimización de CLEAs	22
3.11	Determinación de actividad en CLEAs	22
3.12	Inmovilización de la LS silvestre, R360K y Y429N sobre Eupergit C →	22
3.13	Producción del xilósido	23
3.14	Estabilidad térmica de los biocatalizadores	23
3.15	Estabilidad operacional de los biocatalizadores	23
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1	ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN DE LA LS DE <i>B. subtilis</i>	24
4.1.1	Diseño de las variantes de la LS de <i>B. subtilis</i>	24
4.1.2	Efecto de las mutaciones en los parámetros cinéticos y en las propiedades bioquímicas de las mutantes	24
4.1.3	Cristalización de la mutante S164A	27
4.1.4	Efecto de las mutaciones en la especificidad de reacción, de producto y de aceptor	29
4.1.5	Efecto de activación por sustrato	33
4.1.6	Conclusiones sobre los resultados obtenidos de las mutaciones sitio-dirigidas en la LS de <i>B. subtilis</i>	35
4.2	OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOCATALIZADORES PARA REACCIONES DE TRANSFRUCTOSILACIÓN.	36
4.2.1	Análisis de la red cristalina de la LS silvestre de <i>B. subtilis</i> y obtención de CLECs	36
4.2.2	Obtención de CLEAs	38
4.2.3	Inmovilización sobre Eupergit C	40
4.2.4	Actividad de CLEAs	40
4.2.5	Efecto del método de inmovilización en la estabilidad del biocatalizador.	41
4.2.6	Estabilidad operacional de las enzimas inmovilizadas	42

4.2.7	Conclusiones sobre los biocatalizadores libres de soporte obtenidos a partir de la LS silvestre de <i>B. subtilis</i> y sus mutantes.	43
5	CONCLUSIONES GENERALES	44
6	PERSPECTIVAS	45
7	BIBLIOGRAFÍA	46
8	APÉNDICE	49

Abreviaturas

Selected mutations in bacillus subtilis levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties.

Evaluation of cross-linked crystals and aggregates of *Bacillus subtilis* levansucrase and mutants for transfructosylation reactions.

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla I	Oligonucleótidos utilizados para mutagénesis sitio-dirigida.	18
Tabla II	Parámetros cinéticos, estabilidad y pH óptimo de la LS silvestre y mutantes.	26
Tabla III	Caracterización de CLEAs de la LS silvestre y las mutantes	39
Tabla IV	Caracterización de la LS silvestre y las mutantes R360K y Y429N inmovilizadas sobre Eupergit C [®]	40

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estructura de la levansacarasa de <i>B. subtilis</i> .	10
Figura 2	Mecanismo de reacción de la LS de <i>B. subtilis</i> .	11
Figura 3	Contactos de los aminoácidos del sitio activo con sacarosa y rafinosa.	12
Figura 4	Superposición de las levansacarasas de <i>B. subtilis</i> y <i>G. diazotrophicus</i> .	13
Figura 5	Alineamiento múltiple de secuencias y selección de regiones semiconservadas de la familia 68 de las glicosil-hidrolasas.	25
Figura 6	Distancias interatómicas entre aminoácidos seleccionados para mutagénesis y residuos críticos en la LS silvestre de <i>B. subtilis</i> .	27
Figura 7	Densidad electrónica de los residuos del sitio de unión a sacarosa de la mutante S164A.	28
Figura 8	Vista en estereo de los residuos que interaccionan con la sacarosa. Mutante S164A; LS silvestre (PDB 1OYG); y LS unida a sacarosa (PDB 1PT2).	28
Figura 9	Perfil de pH de la LS silvestre y la mutante S164A.	29
Figura 10	Perfil de levana y oligosacáridos obtenido a partir de sacarosa por la LS silvestre de <i>B. subtilis</i> y sus mutantes.	30
Figura 11	Hidrólisis, transfructosilación y reacciones de aceptor de la LS silvestre de <i>B. subtilis</i> y sus mutantes.	32
Figura 12	Cinética de conversión de sacarosa de la LS silvestre y de la variante S164A.	33
Figura 13	Influencia de la concentración de levana en la actividad de la LS silvestre, S164A y Y429N.	34
Figura 14	Influencia de la temperatura en la activación por levana en la mutante S164A.	35
Figura 15	Arreglo cristalino de la LS de <i>B. subtilis</i> (PDB 1oyg, grupo espacial P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁).	37
Figura 16	Cristales de la LS silvestre de <i>B. subtilis</i> y de las mutantes R360K/S.	37
Figura 17	Efecto de la concentración de glutaraldehído en la actividad de la LS silvestre y las mutantes R360K, R360S y Y429N.	38
Figura 18	Actividad de CLEAs de la LS silvestre y de las mutantes en reacciones de síntesis de levana y xilósido.	41
Figura 19	Efecto del método de inmovilización en la actividad residual después de una hora de incubación a diferentes temperaturas.	42
Figura 20	Estabilidad operacional de las LS inmovilizadas.	43

RESUMEN

Las fructosiltransferasas (FTF) bacterianas son enzimas que sintetizan polímeros de fructosa a partir de sacarosa y se clasifican dentro de la familia 68 de las glicosil-hidrolasas (GH68). Las FTF se dividen en levansacararas (LS) e inulosacararas (IS). Las primeras sintetizan levana, un polímero con enlaces β 2-6 y las IS producen inulina, un polisacárido con enlaces β 2-1. El objetivo de este estudio es la identificación y modificación de residuos involucrados en el reconocimiento de aceptores y en la estructura de los productos de reacción en la enzima LS de *Bacillus subtilis*, así como analizar la influencia de tales modificaciones en las propiedades bioquímicas de la enzima. A partir de un análisis múltiple de secuencias de FTF de la familia GH68 se seleccionaron para mutagénesis nueve residuos de regiones semiconservadas de la LS de *B. subtilis* y se realizó la construcción y caracterización de trece mutantes: S164A/K/T, H243L, I341V, A344P, R360K/S, G361F, F414W, Y429F/N y R433A

Se demostró que las mutantes H243L, R360K/S y Y429N presentan un cambio en la afinidad del subsitio +1. Estas mutantes, excepto H243L, perdieron la capacidad de producir polímero y sólo sintetizan oligosacáridos, al igual R433A. Por otro lado, la variante S164A indujo el fenómeno de activación por levana, lo que resultó en un aumento de casi 400 % en la velocidad de reacción en presencia de polímero. La mutación S164A también generó un aumento de 12 veces en la estabilidad térmica de la variante en comparación con la LS silvestre de *B. subtilis*. Se reportó la estructura cristalográfica de esta mutante, encontrando que S164 es un residuo importante para mantener la posición del nucleófilo en el sitio activo de la enzima. Además, se obtuvo evidencia del papel que desempeña el residuo Y429 en la especificidad de aceptor. Este es un residuo clave que coordina la posición de la sacarosa en la cavidad catalítica. En cuanto a las mutaciones en las posiciones restantes, se obtuvieron versiones de la LS con un amplio rango de especificidades y nuevas propiedades bioquímicas.

Como resultado de este trabajo se elaboraron biocatalizadores libres de soporte (cristales y agregados catalíticos entrecruzados con glutaraldehído) con especificidad diferente a la de la LS silvestre. Para este propósito, se seleccionaron las mutantes R360K/S y Y429N en las que se suprimió la síntesis de levana, así como la LS silvestre y se estudiaron en la síntesis de fructósidos, usando xilosa como aceptor modelo. Las mismas enzimas fueron inmovilizadas sobre Eupergit C[®] para obtener un biocatalizador control. Los cristales entrecruzados fueron inactivos debido a problemas difusionales, en tanto que los agregados entrecruzados fueron tan eficientes en la síntesis de fructósidos como las enzimas en solución correspondientes. La actividad específica de los agregados de la LS silvestre y las mutantes R360K y Y429N fue alrededor de 70, 40 y 200 veces más alta comparada con la actividad mostrada por las enzimas respectivas inmovilizadas en Eupergit C[®]. Aunque la estabilidad térmica de los agregados

entrecruzados y de los derivados de Eupergit C[®] fue similar, la estabilidad operacional de los agregados se vio afectada a largo plazo por la síntesis de levana. Esta característica hace imperativo el uso de mutantes de la LS con baja o nula actividad en la síntesis de polímero.

En general, este trabajo aporta elementos importantes al conocimiento de la relación estructura-función de la LS de *B. subtilis* al determinar el papel que desempeñan nueve residuos cercanos al sitio activo, que con excepción de R360 no interactúan directamente con el sustrato, en la especificidad, propiedades cinéticas y estabilidad térmica de la enzima. Tal información puede ser aplicada en un futuro al diseño de biocatalizadores con características predeterminadas. Asimismo, con los biocatalizadores libres de soporte, los de mayor actividad específica reportados hasta la fecha, se generó una opción innovadora en la glicosilación de azúcares que puede ser aplicada en la glicosilación de compuestos de interés en el área farmacológica y de alimentos.

SUMMARY

Levansucrases are fructosyltransferases belonging to family 68 of glycoside hydrolases (GH68) that catalyze transglycosylation reactions with sucrose, resulting in the synthesis of fructooligosaccharides and/or a fructan polymer. Six semiconserved regions were identified around the negatively charged central pocket of the *Bacillus subtilis* levansucrase catalytic domain, mainly located in β -strands and loops of the five-bladed β -propeller. Amino acids that, due to their proximity to the active site (around 15 Å from the sucrose glycosidic bond), were likely to be involved in substrate binding and have their side chains either directed toward sucrose or the catalytic surface were selected. In order to evaluate the role of these residues, the following mutants were constructed: S164A/K/T, H243L, R360K/S, I341V, A344P, G361F, F414W, Y429F/N and R433A. The substitutions of these residues were chosen following the variation already explored by nature in those positions, except for H243 and R433.

It was found that H243L, R360K/S and Y429N mutations decrease the affinity at the subsite +1, as the transfructosylation efficiency on xylose is low when compared to wild type levansucrase and the other mutants. A product specificity modification was obtained with mutants Y429N and R433A that no longer produce levan but exclusively oligosaccharides. An effect of the mutation S164A on enzyme stability and kinetic behavior was observed; this mutation also increases 12-fold the thermal stability and induces a levan activation effect on the reaction effect that enhances about 400 % the reaction rate. We report the crystallographic structure of this mutant and found that S164 maintains the nucleophile position in the active site. It was also found that Y429 has an important role in acceptor specificity, as this is a key residue contributing to the effective sucrose binding coordination in the catalytic domain-binding pocket. Some of these mutations resulted in levansucrases with a broad range of specificities and new biochemical properties.

Wild type levansucrase and R360K/S and Y429N mutants were selected in order to explore xylose transfructosylation using carrier free biocatalysts. The enzymes were crystallized, aggregated or subjected to traditional immobilization onto Eupergit C[®]. We demonstrated that levan synthesis is considerably reduced in the presence of high affinity acceptors such as xylose and maltose, reducing also their hydrolytic activity. Therefore, the appropriate enzyme and reaction conditions

were defined to reduce polymer synthesis as well as hydrolysis, far from eventual diffusional limitations by levan. While cross-linked levansucrase crystals were inactive, cross-linked levansucrase aggregates were able to catalyze the synthesis of fructosides as efficiently as the soluble enzymes. The specific activity of wild type levansucrase, R360K and Y429N mutants was around 70, 40 and 200-fold higher respectively when compared to the equivalent Eupergit C[®] derivatives. Although the thermal stability of biocatalysts was similar, the cross-linked aggregates operational stability was affected by levan synthesis so that levansucrase mutants with restricted polymer synthesis activity were used.

Despite the information available concerning the structure of levansucrases and the nature of the residues involved in substrate binding, structure–function studies determining reaction specificity (hydrolysis/transfructosylation), fructan molecular weight and linkage specificity, as well as acceptor properties are still lacking. This information is essential not only to understand the basis of fructosyltransferases activity but also for a rational design of biocatalysts based on levansucrase specificities. Therefore, the principal aim of this work is to identify residues implicated in acceptor and product specificity, as well as in biochemical LS properties. Furthermore, the carrier free biocatalysts obtained from the *B. subtilis* levansucrase mutants are an innovative option to transfructosylation reactions.

INTRODUCCIÓN

Las FTF son enzimas que sintetizan polímeros de fructosa conocidos como fructanas a partir de sacarosa (reacción de transfructosilación). Sin embargo, el residuo fructosilo puede ser transferido a una molécula de agua (reacción de hidrólisis) o hacia alguna molécula aceptora diferente a la sacarosa o al polímero, adicionada al medio de reacción (reacción de aceptor) (Chambert et al. 1974). En general, las moléculas aceptoras del residuo de fructosa pueden ser agua, disacáridos, trisacáridos como rafinosa, y alcoholes primarios (Chambert et al. 1974). Las FTF se clasifican en Levansacararas (LS, EC 2.4.1.10), las cuales producen polímeros con enlaces β 2-6 (levana) y en Inulosacararas (IS, EC 2.4.1.9), que sintetizan polímeros con enlaces β 2-1 en la cadena principal (inulina). Se estima que aproximadamente 40,000 especies de plantas, así como una gran diversidad de bacterias, ciertas levaduras, hongos y algas, sintetizan polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos de fructosa mediante la acción de FTF (van Hijum et al. 2006).

En lo que a las aplicaciones de fructanas se refiere, estudios realizados con levana indican que este polímero promueve la proliferación celular y tiene efecto hipocolesterolémico y antiinflamatorio (Kim et al. 2005; Yamamoto et al. 1999). Por otro lado, la inulina es el polímero de fructosa con mayor aplicación industrial en la actualidad. Además de ser clasificada como prebiótico (Roberfroid 2007), la inulina es utilizada en la industria alimentaria como fibra soluble y sustituto de grasa, así como texturizante y estabilizante en postres, productos lácteos y fórmulas infantiles (Roberfroid 2000). Tanto LS como IS son aplicadas en la síntesis de fructooligosacáridos (FOS) o fructósidos, dependiendo de su especificidad de transferencia del residuo fructosilo (Ozimek et al. 2006b; Seibel et al. 2006). Entre los compuestos glicosilados más importantes se encuentran las cadenas de alquilo insaturadas que tienen actividad antifúngica y antimicrobiana, además de péptidos y esteroides que son usados en formulaciones antitumorales (de Roode et al. 2003), (Das and Rosazza 2006; Kim et al. 2000).

Las LS se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias gram-positivas y gram-negativas, en tanto que las IS se han encontrado exclusivamente en bacterias ácido-lácticas.

Actualmente se cuenta con las estructuras cristalográficas de las LS de *B. subtilis* y de *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 (Meng y Futterer 2003; Martínez-Fleites et al. 2005). Las estructuras cristalográficas muestran un solo dominio con un plegamiento β -propela de cinco hojas con una cavidad central con carga negativa en forma de embudo donde se ubica el sustrato. Se ha reportado que los aminoácidos D86, D247 y E342 son los residuos catalíticos, participando directamente en el mecanismo de reacción descrito como Ping-Pong Bi-Bi, y que involucra la participación de un intermediario covalente fructosil-enzima (Meng y Futterer 2003).

El papel que juegan los aminoácidos cercanos al sitio activo de algunas FTF en el mecanismo de reacción, así como en la especificidad de productos, ha sido investigado. Chambert y Petit-Glatron (1991) demostraron que la mutación R360/K/S disminuye la actividad de polimerización de forma drástica en la LS de *B. subtilis*. Posteriormente, Batista et al. (1999) reportaron que la mutación del residuo D309 que forma parte del motivo RDP por asparagina en la LS de *Acetobacter diazotrophicus* (actualmente *Gluconacetobacter diazotrophicus*) incrementó la hidrólisis de sacarosa.

A pesar de la información estructural disponible y de los estudios relacionados con la naturaleza de los residuos involucrados en la unión del sustrato, aún se carece de información derivada de la relación estructura-función que sienta las bases para entender qué determina la especificidad de reacción (hidrólisis/transfructosilación), de productos y de enlace (β 2-6 o β 2-1), siendo esta última la que establece la diferencia fundamental entre LS e IS. Esta información es esencial no solo para entender las bases de la actividad de las FTF, sino para el diseño racional de las mismas, encaminado a la síntesis dirigida de oligosacáridos, polímero o productos de las reacciones de aceptor.

Es importante considerar que la implementación eventual de FTF en procesos biocatalíticos requiere de una enzima robusta con un perfil adecuado de temperatura y pH, así como de una proteína estable en solventes orgánicos, características que permitirán el diseño eficiente de un biocatalizador. Adicionalmente, la optimización de tales procesos requiere de la reducción de la pérdida de sustrato que resulta de la actividad hidrolítica concomitante a la actividad global de FTF, lo cual puede ser abordado desde la ingeniería de medios o la ingeniería de proteínas. Finalmente, en lo que al diseño de biocatalizadores se refiere,

una estrategia adicional para mejorar la actividad, estabilidad y selectividad de enzimas fue introducida mediante la inmovilización de enzimas sobre diversos soportes, facilitando de esta manera su manejo en procesos continuos. Sin embargo, el uso de soportes resulta en una dilución de la actividad específica, ya que puede representar de 90 a 99.9 % de la masa del biocatalizador (Cao et al. 2003). Esto representa una gran desventaja particularmente en el caso de enzimas con baja actividad específica. Los biocatalizadores libres de soportes basados en la insolubilización de la enzima pura representan una opción atractiva en este sentido, ya que su actividad específica es la máxima que puede ser alcanzada por unidad de biocatalizador. Además, la exclusión de soportes reduce considerablemente los costos en el proceso de producción. Entre los biocatalizadores libres de soporte destacan los CLECs (cross-linked enzyme crystals) y los CLEAs (cross-linked enzyme aggregates) por su elevada aplicación en procesos biocatalíticos diversos.

El objetivo de este trabajo es contribuir al conocimiento de la relación estructura-función de las FTF mediante la identificación de residuos implicados en la especificidad de aceptor y de producto, así como en las propiedades bioquímicas de la LS, con el fin de obtener mutantes que permitan la elaboración de biocatalizadores con diferentes características. En particular, el trabajo está enfocado en la obtención de biocatalizadores libres de soporte, mismos que además de presentar las ventajas ya señaladas resultarían en una opción innovadora en la glicosilación de compuestos de interés en el área farmacológica y de alimentos.

1 GENERALIDADES

1.1 FRUCTANAS

La extensa variedad estructural de los polisacáridos los ubica en papeles centrales en el almacenaje y utilización de fuentes de energía, en la señalización célula-célula en la expansión y recambio de la pared celular y en la invasión viral (Davies et al. 1997).

Ritsema y Smeekens (2003) reportan que la producción de fructanas en plantas se encuentra relacionada con la resistencia a la sequía y al congelamiento, evitando la ruptura de las membranas celulares, en tanto que en bacterias, los polímeros de fructosa cumplen la función de depósitos de energía o fuentes de carbono, además de que en algunos casos contribuyen a la patogenicidad mediante la formación de películas o *biofilms*. Entre las especies patógenas formadoras de películas se encuentran *Pseudomonas syringae* y varias especies de bacterias de la cavidad oral, incluidas *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, y *Actinomyces viscosus* (Laue et al. 2006; Steinberg et al. 2002b).

Debido a su estructura, las fructanas encuentran aplicación en las áreas de alimentos, farmacéutica y cosmética. Las propiedades de estos polímeros y por tanto la diversificación en la aplicación de los mismos, dependen tanto del tipo de enlace de los residuos de fructosa (β -2-6 o β -2-1) como de la longitud de cadena. Aunque los efectos biológicos de la levana han sido poco estudiados, (Kim et al. 2005) reportan que este polímero tiene efecto antiinflamatorio y promueve la proliferación celular, señalando su potencial como agente cosmético. Asimismo, su efecto hipocolesterolémico ha sido demostrado. Este efecto puede ser el resultado de la alteración de la circulación enterohepática de esteroides debido a que la levana probablemente une o atrapa los esteroides en el intestino evitando su absorción (Yamamoto et al. 1999).

Por otro lado, las propiedades de la inulina como prebiótico han sido ampliamente documentadas (Roberfroid 2007). El efecto prebiótico de la inulina se extiende más allá del tracto gastrointestinal, probablemente mediado por la influencia que ejerce sobre el sistema inmune (Lenoir-Wijnkoop et al. 2007). Como se mencionó anteriormente, en la industria alimentaria la inulina se emplea como fibra soluble y como sustituto de grasas, texturizante y estabilizante (Roberfroid 2000).

En la actualidad existe un interés creciente en los oligosacáridos tipo inulina y levana, incluyendo aquellos que contienen xilosa, galactosa, glucosa y manosa en función de las propiedades y características descritas (Gibson 1998; Lagaert et al. 2007), así como por la elevada demanda de edulcorantes con bajo contenido calórico (Seibel et al. 2006). La hidrólisis y fermentación FOS por la microflora del colon, especialmente por bifidobacterias y

lactobacilos, aporta aproximadamente 1.5 Kcal/g, representando 38 % del valor aportado por una molécula de hexosa digerida (Roberfroid 1999).

En la actualidad, la glicosilación de compuestos de interés tanto en el área de alimentos como en la farmacéutica está siendo abordada mediante el estudio de la especificidad de transferencia del residuo fructosilo de diversas FTF (Ozimek et al. 2006b; Seibel et al. 2006).

1.2 ESTRUCTURA Y ESPECIFICIDAD DE FTF BACTERIANAS

Las FTF de bacterias se agrupan en la familia 68 de las glicosil-hidrolasas, en tanto que las invertasas, levanasas, inulinasas y FTF de hongos y plantas se encuentran clasificadas dentro de la familia 32. A diferencia de las fructanas de plantas que son sintetizadas por dos o más enzimas, las fructanas bacterianas son producidas por la acción de una sola enzima, LS o IS.

Diversas especies de bacterias gram-positivas sintetizan LS, entre las que se encuentran *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. polymyxa* y *B. amyloliquefaciens*, además de *Rahnella aquatilis*, *Lactobacillus reuteri*, *L. sanfranciscensis*, *Streptococcus salivarium*, etc. Entre las bacterias gram-negativas se encuentran *Zymomonas mobilis*, *Erwinia herbicola*, *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas syringae* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* entre otras. Por otro lado, se ha reportado que las bacterias ácido-lácticas (LAB por sus siglas en inglés) *S. mutans*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. citreum* producen IS (Anwar et al. 2008; Olivares-Illana et al. 2002; van Hijum et al. 2002).

A nivel de aminoácidos, las LS de organismos gram-negativos y gram-positivos muestran una similitud de aproximadamente 20 %, en tanto que la similitud entre FTF producidas por LABs aumenta a más de 60 % (Anwar et al. 2008). En general las FTF de LABs son mas grandes que las de otras bacterias (van Hijum et al. 2006). Recientemente se reportó una nueva subfamilia de FTF que combina dominios estructurales de fructosil y glucosiltransferasas, dando lugar a enzimas de pesos moleculares comparables con los de estas últimas, que sobrepasan los 120 kDa. Esta subfamilia incluye la IS de *L. citreum*, la LS de *L. mesenteroides* NRRL B-512F y dos LS de *L. mesenteroides* ATCC 8293 (Morales-Arrieta et al. 2006).

Las estructuras cristalográficas de las LS de *B. subtilis* (Meng y Futterer 2003) y de *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 (Martinez-Fleites et al. 2005) determinadas a 1.50 Å y 2.50 Å de resolución respectivamente, revelan que ambas FTF tienen un plegamiento tipo β -propela de cinco hojas formadas a su vez por 4 hebras β antiparalelas que presentan una topología clásica en forma de 'W' (Figura 1). La superficie molecular de ambas enzimas

muestra una cavidad central con carga negativa donde se ubica el sustrato. Además, se reportó que los aminoácidos D86, y E342 son los residuos catalíticos (el nucleófilo y el residuo ácido/base general respectivamente), en tanto que D247, aunque necesario para la catálisis, no se encuentra directamente implicado en el mecanismo de reacción (numeración de la LS de *B. subtilis*). La mutación de cualquier aminoácido de la triada catalítica resulta en la pérdida de actividad de la enzima.

Las FTF hidrolizan el enlace glicosídico de la sacarosa y la energía liberada es utilizada para transferir el residuo de fructosa hacia diversos aceptores como sacarosa, cadenas de polímero en crecimiento, agua u otras moléculas (monosacáridos, disacáridos y alcoholes entre otras). Como la sacarosa actúa como aceptor y donador del residuo fructosilo, los polímeros poseen una molécula de glucosa al inicio de cada cadena (French y Waterhouse 1993).

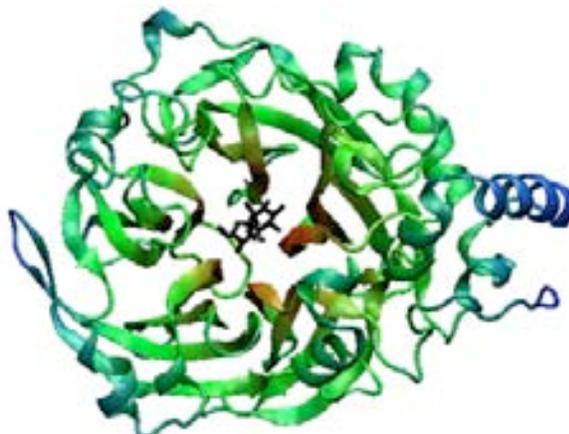


Figura 1. Estructura de la levansacarasa de *B. subtilis*.

Chambert et al. (1974) determinaron que el mecanismo de reacción de la LS de *B. subtilis* se ajusta a un modelo tipo Ping-Pong Bi-Bi que involucra la formación de un intermediario covalente fructosil-enzima. Para la formación del intermediario covalente, el grupo β - carboxilato de un residuo aspártico (D86) realiza un ataque nucleofílico del sobre el C2 de la fructosa (Figura 2A), seguido de la transferencia de un protón de un residuo ácido (E342) al grupo saliente (glucosa, Figura 2B). Posteriormente, el grupo ácido desprotonado remueve un protón de la molécula aceptora (Figura 2C), dando lugar a un anión altamente reactivo que realiza un segundo ataque nucleofílico sobre el enlace éster del complejo enzima-fructosa (Figura 2D) (Chambert et al. 1974).

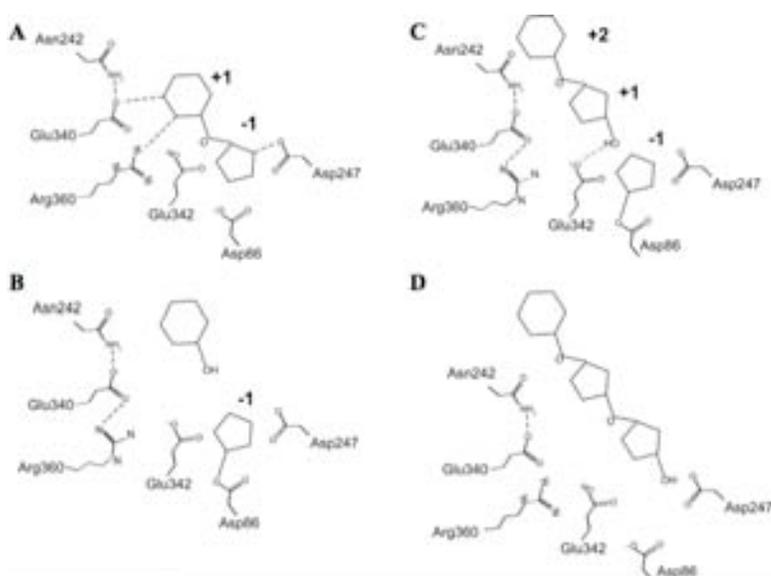


Figura 2. Mecanismo de reacción de la LS de *B. subtilis*. A) Formación del intermediario covalente, D86 realiza un ataque nucleofílico del sobre el C2 de la fructosa; B) Transferencia de un protón de E342 a la glucosa; D) Remoción de un protón de la molécula aceptora por E342 y D) Ataque nucleofílico de la molécula aceptora sobre el enlace éster del complejo enzima–fructosa (Meng y Fütterer 2008).

Recientemente, Meng y Fütterer (2008) aportaron nuevos elementos sobre el mecanismo de reacción de la LS de *B. subtilis* a partir de la estructura cristalográfica de la mutante E342A unida a rafinosa. Después de la formación del intermediario covalente D86-fructosa, y de la protonación de la glucosa, el anillo fenólico de Y411 se desplaza hacia el fondo del sitio activo, probablemente alterando y debilitando la interacción con R360, ya que la conformación de éste último aminoácido se estabiliza con la unión de la molécula donadora, estableciendo puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo 2 y 3 del residuo de glucosa de la sacarosa. Con la liberación de la glucosa, R360 alterna entre diferentes rotámeros, acoplándose con E340 a través de un puente salino. La flexibilidad de R360 permite suponer que este residuo forma un sitio de *docking* transitorio para la unión de la molécula aceptora del residuo fructosilo, a través de una red de interacciones que involucra a N242 y E340, ubicados en el borde de la cavidad del sitio activo (Figura 2).

De acuerdo con Davies et al. (1997), el sitio activo de las GH puede ser dividido en subsitios con respecto a la hidrólisis del enlace glicosídico, de tal forma que los residuos en contacto con la fructosa conforman el subsitio -1 y los aminoácidos en contacto con la molécula de glucosa constituyen el subsitio +1. Los aminoácidos que forman parte de los subsitios -1, +1

y +2 (ocupado por la molécula aceptora) han sido identificados. El subsitio -1 está formado por los residuos D86, W85, R246, D247 y W163, en tanto que el subsitio +1 está constituido por R360, E340, E342 y R246 (Ozimek et al. 2006a) (Figura 3A). A partir de la estructura cristalográfica de la LS de *B. subtilis* unida a rafinosa se determinó que el subsitio +2 está formado por N242 y Y237, los cuales interactúan con la molécula de galactosa de la rafinosa de manera indirecta a través de puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua (Figura 3B) (Meng y Fütterer 2008). La posición 242 había sido señalada como parte del subsitio +2 previamente por Homann et al. (2007). De acuerdo con la estructura cristalográfica, R360 y N242 se encuentran unidos de manera indirecta a través de puentes de hidrógeno con E340, lo que sugiere que los tres aminoácidos pueden formar parte de los sitios de unión del residuo fructosilo.

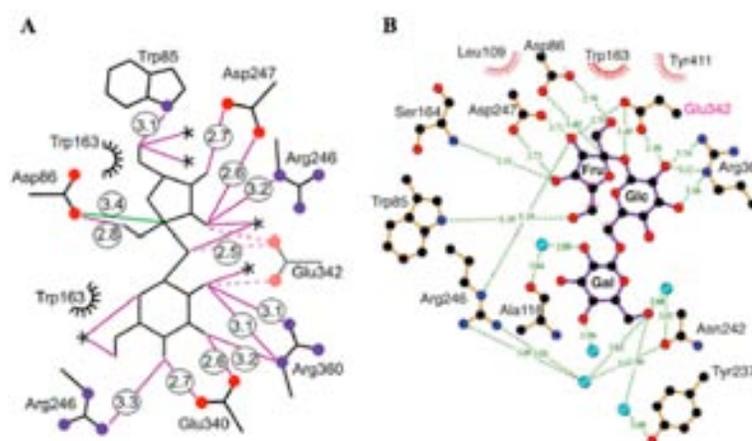


Figura 3. Contactos de los aminoácidos del sitio activo con sacarosa (A) y rafinosa (B) (Meng y Fütterer 2003; Meng y Fütterer 2008).

La modificación de la afinidad de diferentes subsitios puede afectar la especificidad de reacción (hidrólisis de sacarosa o transfructosilación), además del peso molecular de las fructanas sintetizadas. (Ozimek et al. 2006a) reportaron cambios en el peso molecular de las fructanas producidas por la IS de *Lactobacillus reuteri*121 al modificar las interacciones con sacarosa en el subsitio -1, sugiriendo que el subsitio -1 no solo está involucrado en el reconocimiento del sustrato, sino que se relaciona de manera indirecta en la determinación del peso molecular de los productos sintetizados.

Previamente, Chambert y Petit-Glatron (1991) demostraron que la actividad de transfructosilación e hidrólisis de la LS de *B. subtilis* puede ser modulada mediante la mutación de R360, residuo conservado en las FTF de bacterias gram positivas y sustituido por histidina en

1.3 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

1.3.1 Inmovilización convencional e inmovilización libre de soportes

Las enzimas han sido empleadas en diversos procesos en la industria de alimentos desde hace varios siglos y recientemente han encontrado aplicación en la industria farmacéutica y química. Su estructura y mecanismo de reacción están siendo elucidados gradualmente mediante técnicas como cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN), así como por métodos bioquímicos. En la actualidad, es posible obtener grandes cantidades de enzima, así como modificar la estructura de la misma mediante ingeniería genética, alterando de esta manera sus propiedades físico-químicas y biológicas. De esta forma es posible obtener enzimas “hechas a la medida” que puedan ser empleadas a pH y temperaturas extremas o en presencia de solventes orgánicos (Katchalski-Katzir y Kraemer 2000).

Las enzimas inmovilizadas son objeto de interés creciente desde hace varias décadas debido a las ventajas que representan sobre las enzimas en solución, por lo que el número de procesos que involucran enzimas inmovilizadas sigue incrementándose de manera constante (Tischer and Kasche 1999).

Los beneficios que se buscan mediante la inmovilización de enzimas, además de un manejo conveniente de las preparaciones enzimáticas, son la fácil separación de la enzima y el producto, así como la consiguiente reutilización de la misma, lo que permite establecer procesos catalizados por enzimas que sean económicamente viables.

Las inmovilización de enzimas puede realizarse mediante: a) entrecruzamiento de la enzima soluble con glutaraldehído, b) adsorción sobre matrices sólidas, c) adsorción sobre materiales sólidos con entrecruzamiento subsiguiente, d) enlace covalente a una matriz sólida, e) atrapamiento dentro de fibras, microcápsulas o membranas y f) entrecruzamiento de cristales o agregados de la enzima pura (Cao et al. 2000; Katchalski-Katzir y Kraemer 2000; Margolin 1996)

A partir de la segunda mitad del siglo XX se empezó a desarrollar la inmovilización de enzimas sobre diversos soportes, sin embargo el soporte puede representar hasta el 99.9 % de la masa del biocatalizador, lo cual inevitablemente conduce a bajos rendimientos espacio-tiempo y volumétricos (Schoevaart et al. 2004). La inmovilización de enzimas que excluye el uso de soportes inertes ofrece ventajas sobre la inmovilización tradicional, como dar lugar a una elevada productividad volumétrica y a bajos costos de producción, ya que el

biocatalizador excluye el uso de soportes costosos al estar compuesto exclusivamente de proteína y de bajas concentraciones del agente entrecruzante, generalmente glutaraldehído.

La técnica de entrecruzamiento de proteínas en solución con agentes bifuncionales fue desarrollada en 1960, sin embargo, el entrecruzamiento de enzimas en solución, CLEs (cross-linked enzymes), produce biocatalizadores con baja retención de actividad, pobre reproducibilidad y baja estabilidad mecánica. Por otro lado, los cristales enzimáticos entrecruzados, introducidos con éxito a la biocatálisis industrial a finales de siglo, representan una mejor opción (Häring y Schreier 1999). Para la obtención de CLECs (cross-linked enzyme crystals) se requieren enzimas con alta pureza y el paso posterior de cristalización. El entrecruzamiento mantiene las proteínas en estado cristalino fuera de las condiciones que permitieron la cristalización (Margolin y Navia 2001), lo que permite su aplicación en el área biotecnológica. Adicionalmente, tanto el entrecruzamiento como el estado cristalino, le confieren a la proteína una mayor estabilidad contra la desnaturalización por calor, pH, solventes orgánicos y proteólisis comparada con la de la proteína soluble, (Govardhan 1999; Häring y Schreier 1999; Margolin 1996; Tischer y Kasche 1999).

Una opción adicional a los CLECs son los CLEAs (cross-linked enzyme aggregates), biocatalizadores que comparten las características antes descritas para los cristales entrecruzados. La elaboración de CLEAs se basa en la agregación de las moléculas proteicas en estructuras supermoleculares que puede ser inducida por adición de sales, solventes orgánicos o polímeros no iónicos sin cambiar la estructura tridimensional original de la proteína y manteniendo por tanto la actividad catalítica de las enzimas (Cao y col., 2000). Los agregados sólidos se mantienen juntos por enlaces no covalentes y pueden ser resuspendidos en un medio acuoso, por lo que al realizar el entrecruzamiento químico se obtienen agregados insolubles.

1.3.2 FTF inmovilizadas

La actividad y las propiedades de la enzima, así como de los productos de las FTF en solución difieren del comportamiento que muestran estas enzimas cuando se encuentran insolubilizadas, generalmente por inmovilización sobre algún soporte (Steinberg et al. 2002a).

La LS de *B. subtilis* inmovilizada sobre hidroxiapatita (un gel de fosfato de calcio con estructura similar a los ácidos teicoicos de la pared celular de Gram positivas), mostró un aumento en *k_{cat}* y un desplazamiento hacia la reacción de transfructosilación. El peso

molecular de la levana sintetizada por la enzima inmovilizada fue considerablemente mayor, así como el porcentaje de ramificación. Estos cambios pueden ser producto de la modificación del mecanismo molecular de transfructosilación, probablemente como resultado de la restricción de la disponibilidad de agua en el microambiente de la enzima, o bien de la restricción a la difusión de las cadenas de fructana en crecimiento, ocasionada por el microambiente generado al insolubilizar la enzima (Chambert y Petit-Glatron 1993). El mismo efecto sobre el peso molecular de fructanas fue observado por Steinberg et al. (2002a) al inmovilizar FTF de *S. mutans* sobre hidroxiapatita.

Por el contrario, Jang et al. (2000) observaron un aumento en la concentración de levana de menor grado de polimerización al inmovilizar la LS de *Z. mobilis* sobre el mismo soporte (hidroxiapatita). Dado que observaron que el peso molecular de la levana sintetizada por la enzima inmovilizada y en solución disminuye con el tiempo de incubación, los autores proponen que el aumento en la estabilidad en la enzima inmovilizada conlleva al aumento en la hidrólisis de la levana formada. Bajo condiciones óptimas, el biocatalizador mostró una actividad de 20 U/g de soporte y perdió 40 % de actividad después de 6 ciclos de reuso. Al inmovilizar la LS de *Z. mobilis* en magnetita activada por titanio, el biocatalizador resultante presentó las mismas características que el obtenido con hidroxiapatita, pero su actividad específica fue menor (6 U/g de soporte) (Jang et al. 2001).

Más allá de la generación de información básica sobre el cambio en las propiedades de la enzima y los productos de reacción en condiciones de inmovilización, la obtención de biocatalizadores inmovilizados ha sido explorada con un enfoque aplicado. Debido al aumento en la demanda de edulcorantes bajos en calorías, así como al creciente interés que generan los FOS en la industria de alimentos y farmacéutica, (Baciu et al. 2005) inmovilizaron una FTF de *B. subtilis* NCIMB 11871 en Trisopor® y Eupergit® C para la producción de un galactosilfructósido, obteniendo biocatalizadores con actividades específicas de 3 a 7 U/g de soporte.

El objetivo de este trabajo, además de contribuir al conocimiento de la relación estructura-función de las FTF, plantea el estudio de las propiedades de la LS de *B. subtilis* insolubilizada empleando como alternativa la inmovilización no convencional en sistemas donde la matriz proteica es el catalizador y el soporte. Particularmente se plantea la obtención de biocatalizadores de elevada actividad específica como CLECs (cross-linked enzyme crystals) y los CLEAs (cross-linked enzyme aggregates), mismos que representan una opción innovadora en la glicosilación de compuestos de interés en diferentes áreas de la industria.

2. OBJETIVO GENERAL

Modificar la especificidad de la LS de *B. subtilis* mediante la identificación y sustitución de los residuos involucrados en los subsitios de reconocimiento de sustratos y productos. Obtener y caracterizar biocatalizadores libres de soporte obtenidos a partir de mutantes con nuevas propiedades de transfructosilación de interés en las áreas farmacológica y de alimentos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Identificar regiones semi-conservadas involucradas en los subsitios de reconocimiento de sustratos y productos en la LS de *B. subtilis* a partir del análisis de secuencia de las FTF de la familia 68 de las glicosil-hidrolasas.
- ❖ Realizar mutagénesis sitio-dirigida de los residuos seleccionados.
- ❖ Producir, purificar y caracterizar la LS recombinante de *B. subtilis* y las variantes.
- ❖ Cristalizar las mutantes de interés.
- ❖ Elaborar y caracterizar biocatalizadores del tipo CLECs y CLEAs.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Mutagénesis sitio-dirigida

Las estructuras cristalográficas de la LS de *B. subtilis* con y sin sustrato (Códigos de acceso en Protein Data Bank (PDB) 1OYG y 1PT2 respectivamente), fueron empleadas para evaluar la distribución espacial de los aminoácidos seleccionados para mutagénesis (Meng y Futterer 2003). La identificación de regiones semiconservadas de FTF se realizó mediante el análisis del alineamiento estructural de 36 FTF depositadas en el PDB (Berman et al. 2000a; Berman et al. 2000b), usando la secuencia de la LS de *B. subtilis* LS como prueba en una búsqueda en Psi-BLAST (Zhang et al. 1998). Los alineamientos finales fueron realizados en clustal W (Chenna et al. 2003) y editados con JalView program V 2.3 (Clamp et al. 2004; Meng y Futterer 2003). El algoritmo ASAView fue usado para calcular la accesibilidad al solvente de los residuos seleccionados (Ahmad et al. 2004). Las mutaciones fueron introducidas en el gen de la LS de *B. subtilis* mediante el QuikChange site-directed mutagenesis system (Stratagene) de acuerdo a las especificaciones del proveedor, y la clonación se realizó en el vector pET 22b+ bajo el control del promotor T7 (NOVAGEN).

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para mutagénesis sitio-dirigida.

Oligonucleótidos	Secuencia de DNA (5' a 3')
S164Afw	aaacacaagaatgg <u>gca</u> ggttcagccacattta
S164Arvs	taaatgtggctgaacc <u>tgc</u> ccattctgtgttt
S164Kfw	aaacacaagaatgg <u>aaa</u> ggttcagccacattta
S164Krvs	taaatgtggctgaacc <u>ttt</u> ccattctgtgttt
H243Wfw	acagctcagcgacaac <u>tgg</u> acgctgagagatcct
H243Wrvs	aggatctcagcgt <u>cca</u> gttgcgctgagctgt
I341Vfw	cacagtaacagatgaa <u>gtg</u> gaacgcgcgaacgtc
I341Vrvs	gacgttcgcgcgttc <u>cac</u> tcatctgttactgtg
E342Afw	taacagatgaaatt <u>gcc</u> cgcgcgaacgtctta
E342Arvs	taaagacgttcgcgcg <u>ggc</u> aatttcacatctgta
A344Pfw	agatgaaattgaacgc <u>cgc</u> aacgtctttaaattg
A344Prvs	cattttaaagacgtt <u>ggg</u> gcgtcaatttcacatct
R360Kfw	cctgtcactgactcc <u>aaa</u> ggatcaaaaatgac
R360Krvs	gtcattttgatcc <u>ttt</u> ggagtcagtgaaacagg
R360Sfw	cctgtcactgactcc <u>tct</u> ggatcaaaaatgac
R360Srvs	gtcattttgatcc <u>aga</u> ggagtcagtgaaacagg
G361Ffw	gttcactgactccgc <u>ttc</u> tcaaaaatgacgatt
G361Frvs	aatcgtcatttttga <u>gaa</u> gcgggagtcagtgaaac
F414Wfw	aaccttactactcacac <u>tgg</u> gctgtacctcaagcg
F414Wrvs	cgcttgaggtacagc <u>cca</u> gtgtgagtaagtaaagggtt
Y429Nfw	aatgtcgtgattacaagc <u>aac</u> atgacaaacagagga
Y429Nrvs	tcctctgtttgtcat <u>gtt</u> gcttgtaatcacgacatt
R433Afw	agctatatgacaaac <u>gcg</u> ggattctacgcagac
R433Arvs	gtctgcgtagaatcc <u>cgc</u> gtttgcattatagct

Con el objetivo de obtener mutantes con nuevas propiedades bioquímicas, la estrategia de mutagénesis sitio-dirigida se basó en un diseño de modificación de aminoácidos ubicados en las regiones semiconservadas de FTF de la familia 68 de las glicosil-hidrolasas, como se describe en la sección de resultados. Las secuencias de los oligonucleótidos usados en la obtención de las mutantes se muestran en la Tabla I. La construcción de cada mutante fue verificada mediante secuenciación automática de DNA (3130XL-Applied Biosystems) en el Instituto de Biotecnología (UNAM).

Transformantes de *E. coli* BL21 [*E. coli* F⁻ ompT hsdS_B (r_B-m_B) gal dcm (DE3)] fueron crecidas en medio Luria-Bertani con 10 µg/mL de ampicilina a 37 °C, inducidas con 0.2 mM IPTG (Research Organics) a una densidad óptica de 0.5, e incubadas a 22 °C por otras 4 h. Las células fueron recuperadas por centrifugación (5000 rpm, 15 min), resuspendidas en 8 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0, 0.1 M, y lisadas en una prensa de French (Thermo Spectronic). La LS silvestre y las mutantes fueron purificadas por cromatografía de intercambio catiónico siguiendo el protocolo previamente reportado (Meng and Futterer 2003).

3.2 Propiedades bioquímicas de la LS

Todos los ensayos para la caracterización tanto de la LS silvestre como de las mutantes fueron realizados con las enzimas purificadas.

Las velocidades iniciales fueron medidas siguiendo la liberación de poder reductor a partir de 120 g/L de sacarosa a pH 6.0 y 37 °C, a menos que se especifique otra cosa, usando el método del ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de equivalentes de glucosa por minuto. Tal actividad corresponde a la actividad LS global, ya que incluye las dos actividades de la enzima: hidrólisis y transfructosilación. Para determinar el pH óptimo, las velocidades iniciales fueron medidas a 37 °C en un rango de pH entre 4 y 8. En todos los casos, los ensayos se realizaron ajustando la concentración de proteína a una actividad enzimática 0.5 U/mL.

Para evaluar el efecto de cada mutación en la estabilidad, alícuotas de la LS silvestre y de las variantes (1 mg proteína/mL) fueron incubadas a 40 °C determinándose la actividad residual a diferentes tiempos. La estabilidad fue expresada como el tiempo de vida media de la enzima ($t_{1/2}$) o como la constante de primer orden de la velocidad de desactivación a 40 °C.

Las velocidades iniciales de la reacción global y las constantes cinéticas fueron determinadas en un rango de concentraciones de sacarosa de 0 a 1.2 M y en presencia de levana (0 to 15 g/L). Todas las reacciones se realizaron con una actividad enzimática de 0.5 U/mL. Las constantes cinéticas fueron determinadas por regresión lineal usando el método de Lineweaver/Burk.

3.3 Determinación de la relación hidrólisis/transfructosilación

La relación H/T para cada enzima fue determinada midiendo la cantidad de glucosa y fructosa liberada a partir de 120 g/L de sacarosa en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0, 50 mM. La aparición de fructosa es resultado de la actividad hidrolítica de la enzima, en tanto que la diferencia entre las concentraciones de glucosa y fructosa corresponde a la actividad de transfructosilación. La relación H/T en presencia de aceptores fue determinada empleando el mismo procedimiento. Los azúcares involucrados en la reacción, como xilosa, fructosa, glucosa, rafinosa y sacarosa fueron cuantificados por HPLC en un sistema Waters 600E (Waters Corp. Milford, MA) equipado con un detector de índice de refracción (Waters 410), y una columna Carbohydrate (4.6 x 250 mm) mantenida a 35 °C, usando acetonitrilo/agua (75:25) como fase móvil a un flujo de 1.2 mL/min.

3.4 Análisis del perfil de productos: síntesis de levana y oligosacáridos

El efecto de las mutaciones en el perfil de productos fue analizado por HPLC en un sistema Waters 600E (Waters Corp. Milford, MA) equipado con un detector de índice de refracción (Waters 410). Todas las reacciones se realizaron a 37 °C en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0, 50 mM y 120 g/L de sacarosa, con 0.5 U/mL de actividad enzimática. La producción de oligosacáridos se analizó usando una columna C-18 de fase reversa a 30 °C con agua como fase móvil a un flujo de 0.7 mL/min, en tanto que la síntesis de levana se analizó por cromatografía de permeación en gel, usando una columna en serie Ultrahydrogel (UG 500 y lineal) a 35 °C, con agua como fase móvil a un flujo de 0.8 mL/min.

3.5 Cristalización, colección de datos, determinación estructural y refinamiento

Se obtuvieron cristales de la LS silvestre y de las mutantes S164A, R360K y R360S después de dializar la proteína pura (8 g/L) contra agua tetradestilada a 4 °C durante 7 días. El conjunto de datos de la variante S164A fue colectado usando un difractor con ánodo rotatorio de cobre (Rigaku RU200H), acoplado a una colección de espejos Yale y un

detector Raxis-IV (*imaging-plate*). La colecta de datos se realizó a 100 K con ayuda de un criostato (Oxford Cryosystems 600 series). Las imágenes de difracción fueron indexadas e integradas usando MOSFLM (Leslie 1992) y los datos fueron escalados y truncados con SCALA y TRUNCATE dentro de la suite CCP4 (Collaborative Computational Project 1994). Una solución de glicerol al 50 % (v/v) fue usada como crioprotector. La estructura de S164A fue determinada por reemplazo molecular usando MolRep (Vagin y Teplyakov 1997) con la entrada 1OYG del PDB (Meng and Futterer 2003) como modelo de búsqueda. Esto fue requerido debido a las diferencias en los parámetros de la celda unitaria entre los cristales de la LS nativa ($a=51.1 \text{ \AA}$, $b=67.0 \text{ \AA}$, $c=123.7 \text{ \AA}$) y la mutante S164A ($a=50.9 \text{ \AA}$, $b=55.8 \text{ \AA}$, $c=124.6 \text{ \AA}$). Sin embargo, se encontró que ambos cristales comparten el grupo espacial ($P2_12_12_1$) y el contenido de la celda unitaria (un monómero dentro de la unidad asimétrica).

La estructura fue refinada usando el programa CNS (Brünger et al. 1998), siguiendo el protocolo: minimización de cuerpo rígido, minimización restringida, afinamiento individual de parámetros de desplazamiento atómico, cálculo de mapa de densidad electrónica ($2F_o-F_c$) y mapa de diferencias (F_o-F_c), y ajuste visual utilizando el Coot (Emsley and Cowtan 2004). El afinamiento fue terminado con el programa REFMAC (Murshudov et al. 1997), manteniendo el mismo grupo de reflexiones para el cálculo de R_{free} que el empleado en CNS.

Los factores de estructura para la mutante S164A se depositaron en el Protein Data Bank (PDB) con el código de acceso 2VDT.

3.6 Cromatografía de permeación en gel

La homogeneidad (mono o polidispersión) de la LS silvestre purificada por intercambio catiónico se analizó en una columna de permeación en gel Sephacryl S-200 High Resolution (rango de separación de 5-250 kDa). La muestra fue eluída con una solución de fosfatos 150 mM a un flujo de 2.5 mL/min.

3.7 Electroforesis

Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (6 %) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). La migración de las proteínas se realizó a amperaje constante de 20 mA.

3.8 Cuantificación de proteína

La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford utilizando albúmina sérica bovina para la elaboración de la curva patrón (Bradford 1976). La absorbancia fue medida a 595 nm.

3.9 Preparación de CLECs[®]

Se obtuvieron cristales de la LS silvestre y de las mutantes R360K/S después de 12 días de dializar la proteína pura (8 g/L) con agua desionizada a 4 °C. Los cristales fueron entrecruzados con 1.5 % de glutaraldehído en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7.0 con sulfato de sodio 2 M como agente precipitante durante 1h a 28 °C. Los cristales entrecruzados fueron recuperados por centrifugación (4000 rpm) y lavados con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0.

3.10 Preparación y optimización de CLEAs

Se determinó la influencia de la concentración de glutaraldehído en la actividad de los CLEAs precipitando 1 mg/mL de proteína con 60 % de sulfato de amonio en solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, pH 7.0 y modificando la concentración de glutaraldehído de 0.2 a 1% (v/v). La concentración de proteína fue optimizada variando la concentración inicial de enzima de 1 a 6 mg/mL y manteniendo la concentración de glutaraldehído en 0.2 %.

Finalmente, los CLEAs con mayor actividad específica fueron obtenidos precipitando 4 mg/mL de proteína en solución amortiguadora de fosfatos 100 mM, pH 7.0, con 60 % de sulfato de amonio durante 30 minutos y entrecruzando con 0.2 % de glutaraldehído. El entrecruzamiento se realizó a 15 °C y 700 rpm durante 30 minutos. Después de este tiempo, la reacción fue diluida 10 veces con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0.

3.11 Determinación de actividad en CLEAs

Se tomaron alícuotas de 40 µL de la reacción de entrecruzamiento y se determinó actividad total (CLEAs y enzima libre en solución). Posteriormente se midió la actividad del sobrenadante después de retirar los CLEAs por centrifugación. La actividad de los CLEAs se obtuvo restando la actividad del sobrenadante a la actividad total de la suspensión de entrecruzamiento.

3. 12 Inmovilización de la LS silvestre, R360K y Y429N sobre Eupergit C[®]

Se utilizó Eupergit C[®] como soporte para la inmovilización de la LS silvestre y las mutantes R360K/S. Eupergit C[®] es un polímero acrílico con grupos oxirano y tiene una distribución de tamaño de partícula de 100 a 200 μm , un diámetro de poro aproximado de 0.1-2.5 μm y una superficie específica de 10-20 m^2/g .

Se mezcló 1g de Eupergit C[®] peso seco con 10 y 20 mg de enzima pura en solución amortiguadora de fosfatos 1 M, (pH 6.0 y 7.0), y se agitó durante 38 y 72 h respectivamente a 20 °C. El biocatalizador se recuperó por filtración y se lavó con solución amortiguadora de fosfatos, 50 mM, pH 6.0 (6 x 10 mL). La proteína libre se determinó en el sobrenadante y en los lavados por el método de Bradford y por actividad.

3. 13 Producción del xilósido

La síntesis del xilósido se realizó usando una actividad enzimática de 0.5 U/mL en reacciones con 120 g/L de sacarosa y 120 g/L de xilosa a pH 6.0 y 37 °C. Los azúcares involucrados se analizaron como se describió previamente.

3. 14 Estabilidad térmica de los biocatalizadores

Tanto las enzimas solubles como los CLEAs y las enzimas inmovilizadas sobre Eupergit C[®] se incubaron a 30, 40, 50 y 60 °C en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0. Se tomaron alícuotas después de 1 h de incubación y se midió la actividad residual. Los ensayos se realizaron incubando 2 mg/mL de enzima pura o de biocatalizador.

3. 15 Estabilidad operacional de los biocatalizadores

Los ensayos de estabilidad operacional se realizaron mediante reacciones secuenciales empleando una cantidad de biocatalizador equivalente a una actividad enzimática de 4 U/mL, tanto para biocatalizadores tipo CLEAs como para enzimas inmovilizadas en Eupergit C[®], usando 120 g/L de sacarosa y 120 g/L de xilosa en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 6.0 a 37 °C, con agitación magnética de 1100 rpm. Después de 3 h, el medio de reacción fue centrifugado y el biocatalizador resuspendido en medio de reacción fresco para realizar un nuevo ciclo de reacción. Se determinó la conversión de sacarosa al final de cada ciclo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN DE LA LS DE *B. subtilis*

4.1.1 Diseño de las variantes de la LS de *B. subtilis*

Se aplicaron criterios básicos de mutagénesis sitio-dirigida para modificar residuos involucrados en los sitios de unión de sustratos y productos en el sitio catalítico de la LS de *B. subtilis*. Se realizó un análisis de secuencia y la comparación estructural de 36 miembros de la familia GH68, ya que las enzimas de esta familia poseen la flexibilidad de realizar las reacciones de transfructosilación, hidrólisis y de aceptor (Figura 5). Derivado de este análisis, se eligieron 6 regiones semiconservadas alrededor de la cavidad cargada negativamente que conforma la región catalítica y se seleccionaron aminoácidos con cadenas laterales dirigidas hacia la superficie o hacia la molécula de sacarosa que se encontraran aproximadamente a 15 Å del enlace glicosídico del sustrato. Para evaluar el papel de tales residuos se construyeron las siguientes mutantes: S164K/A/T, H243L, R360K/S, I341V, A344P, G361F, F414W, Y429N/F y R433A. Los aminoácidos seleccionados fueron sustituidos por residuos ubicados en esa misma posición en otras enzimas de la familia GH68, excepto para H243 y R433.

4.1.2 Efecto de las mutaciones en los parámetros cinéticos y en las propiedades bioquímicas de las mutantes

La LS silvestre y sus mutantes fueron expresadas y purificadas, obteniendo aproximadamente 30 mg de LS pura por litro de medio de cultivo. Como parte de un análisis global, se determinaron las constantes cinéticas, el pH óptimo y la estabilidad a 40 °C de las mutantes construidas (Tabla II). La mutante S164K no mostró actividad, en tanto que las variantes S164A, R360S y Y429N presentaron una disminución drástica de la misma. La LS silvestre y todas las mutantes siguieron un comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten. Sólo la mutante S164A mostró un ligero aumento en la afinidad por el sustrato, en tanto que el valor de Km se elevó considerablemente para las variantes R360S, G361F y Y429N.

Debido a que el D86 tiene un papel esencial en la catálisis, se espera que cualquier modificación cerca del mismo tenga un efecto crítico en la actividad de la LS. Este fue el caso de la mutante S164K, la cual no presentó actividad, en tanto que S164A mostró un aumento de la afinidad por sacarosa, pero con una disminución de 26 veces en kcat. El aumento en la afinidad por el sustrato, coincide con lo reportado por (Homann et al. 2007) en la sustitución de S173 por alanina en *B. megaterium* (S164A en *B. subtilis*). Estos autores encontraron una reducción de 2 veces en la eficiencia catalítica como resultado de la sustitución, confirmando el

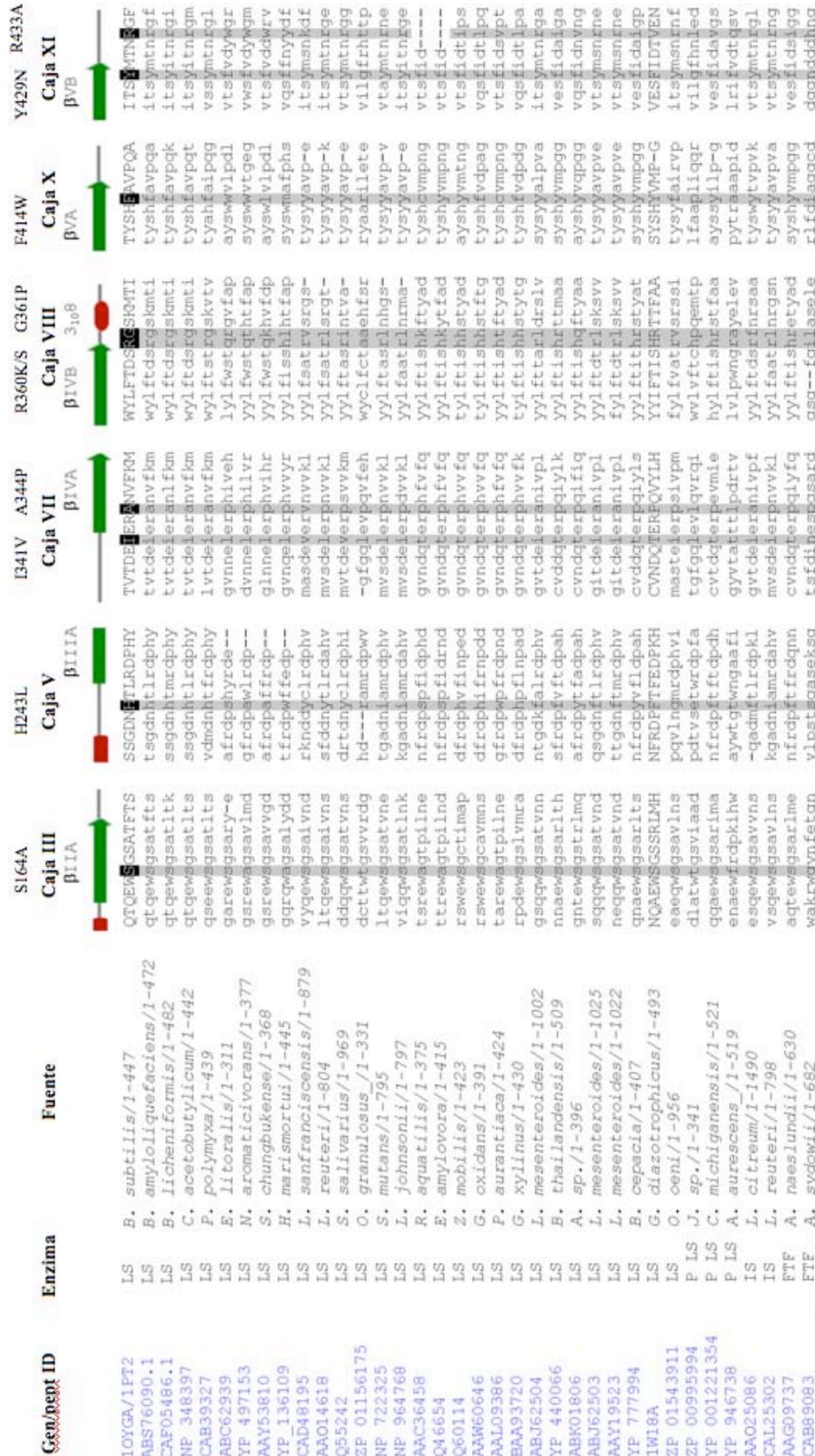


Figura 5. Alineamiento múltiple de secuencias y selección de regiones semiconservadas de miembros de la familia 68 de las glicosil-hidrolasas. La representación gráfica de la estructura secundaria de la LS de *Bacillus subtilis* (entrada PDB 1OYG) y los nombres asignados a la región se muestran en la parte superior. Las α -hélices y las hojas β se muestran como cilindros rojos y flechas verdes respectivamente. Las secuencias de las LS de *B. subtilis* y *G. diazotrophicus* se muestran en letras mayúsculas. Se cuenta con la estructura tridimensional de ambas enzimas (1OYG y 1W18 respectivamente). Los residuos seleccionados para mutagénesis se presentan en cajas sombreadas. La posición de éstos residuos y su sustitución se indican en la parte superior de la figura.

papel crítico de ésta posición. En un intento por restaurar la actividad se construyó la mutante S164T, con la cual, si bien se recuperó la actividad, hubo una pérdida de afinidad por sacarosa.

Tabla II. Parámetros cinéticos, estabilidad y pH óptimo de la LS silvestre y mutantes.

Levansacarasa	Km (mM sacarosa)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (s ⁻¹ mM ⁻¹)	t _{1/2} (min)	pH óptimo
LS silvestre	8	164.6	20.3	52.0 (± 4.79)	6
S164A	2.5	6.4	2.5	628.0 (± 51.0)	6
S164T	47.9	121.4	2.5	19.64 (± 0.68)	6
H243L	10.5	141.5	13.5	7.9 (±0.04)	6
I341V	7.4	166.3	22.6	31.4 (± 0.54)	6
R360K	30	170.2	5.6	42.11 (±0.86)	6
R360S	154	13.5	0.09	17.21 (±1.16)	6
G361F	297.3	57.4	0.19	<1	6
Y429N	319.4	6.3	0.02	47.04 (± 2.61)	5-6
Y429F	61.8	147.1	2.3	16.8 (± 0.02)	6
R433A	29.3	87.5	2.98	16.0 (±1.61)	6-7

La eliminación de los contactos directos o indirectos con el sustrato de los residuos mutados en las variantes R360K/S, G361F, Y429N y R433A puede ser el origen de la disminución tanto en afinidad como en *kcat* mostrado por las mismas (Figura 5). Al cambiar asparagina por fenilalanina en la posición 429 (mutante Y429F), se recuperó la actividad y se observó un aumento en la afinidad por el sustrato respecto a la mutante Y429N, lo que demuestra la importancia del residuo aromático en esta posición, así como la contribución del grupo hidroxilo de la tirosina para la realización eficiente de la catálisis. Por otro lado, la reducción en la eficiencia catalítica mostrada por la G361F podría ser explicada por la desestabilización de la región comprendida entre R360 e I374.

El pH óptimo fue el mismo para todas las mutantes (6.0), excepto para Y429N y R433A, las cuales mostraron una pequeña variación en éste parámetro (5-6 y 6-7 respectivamente).

Respecto a la estabilidad térmica, las mutantes H243L y G361F presentaron una drástica pérdida de estabilidad respecto a la LS silvestre. La estabilidad del resto de las mutantes se modificó ligeramente, excepto para S164A, la cual resulto ser 12 veces más estable a 40 °C que la enzima silvestre, con un tiempo de vida media de 628.0 (± 51.0) minutos. Probablemente la estabilidad de la variante S164A es el resultado de la sustitución de un aminoácido hidrofílico como la serina por un aminoácido no polar. La estabilización mostrada por S164A no fue

observada con la mutante S164T, la cual tiene un $t_{1/2}$ de 20 min. Para analizar si en el aumento aparente de la estabilidad térmica de la mutante S164A está relacionado con una mayor velocidad de replegamiento de la proteína respecto a la LS silvestre, es necesario realizar los análisis correspondientes de plegamiento.

Algunos cambios observados en el comportamiento de las mutantes de la LS pueden ser explicados con base en la estructura cristalográfica de la LS silvestre (Meng y Futterer 2003). La reducción en el tiempo de vida media de la mutante H243L puede ser explicado por la eliminación de las interacciones polares que involucran a los residuos K189, D219, Q226 y V228 con H243 a través de dos moléculas de agua (Figura 6). Adicionalmente se encontró que G361 juega un papel importante en la estabilidad de la LS, ya que la vida media disminuyó drásticamente con la mutante G361F. Este cambio se sustenta en la probable desestabilización del β -hairpin formado entre R360 y I374; la desestabilización casi completa es el resultado de sustituir la glicina en una región compacta por un residuo voluminoso como la fenilalanina.

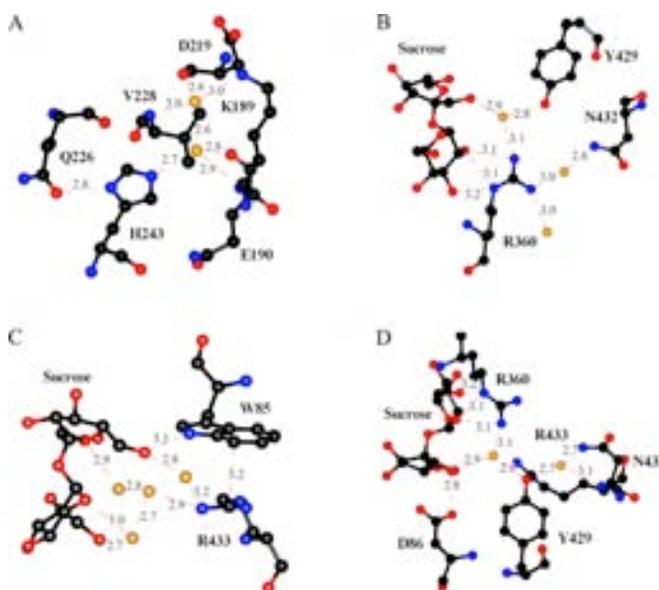


Figura 6. Distancias interatómicas entre aminoácidos seleccionados para mutagénesis y residuos críticos en la LS silvestre de *B. subtilis*. Las interacciones involucran a: A) H243, B) R360, C) R433 y D) Y429 ya sea con sacarosa, moléculas de agua (amarillo) u otros residuos cercanos.

4.1.3 Cristalización de la mutante S164A

La variante S164A fue cristalizada con éxito. La estructura cristalográfica a 3.2 Å de resolución aportó información estructural valiosa para describir el cambio de propiedades

cinéticas que mostró la variante respecto a la enzima parental. La densidad electrónica del sitio activo de la mutante se muestra en la Figura 7.

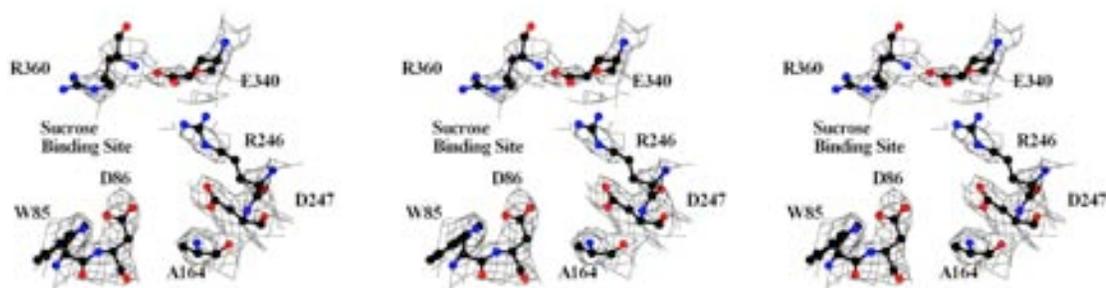


Figura 7. Densidad electrónica de los residuos del sitio de unión a sacarosa de la mutante S164A. Vista en estereo de los residuos de la mutante S164A que en la LS silvestre de *B. subtilis* tienen interacción con la sacarosa.

El efecto de las mutaciones en los parámetros cinéticos fue analizado considerando la estructura cristalográfica de la LS de *B. subtilis* unida a sacarosa (Meng y Futterer 2003). Se observó que S164 forma parte de β IIB, estableciendo un puente de hidrógeno (2.7 Å) con el nucleófilo D86 en la estructura de la LS silvestre. Cuando se comparó la estructura cristalográfica de S164A con las estructuras de la LS silvestre previamente reportadas (Meng y Futterer 2003), se observó un desplazamiento de las posiciones de D86, W85 y R360. Como se muestra en la Figura 8, la alanina de la mutante es incapaz de mantener la posición del nucleófilo D86, el cual es desplazado 1.20 Å en la dirección opuesta. Es probable que el desplazamiento en la posición de D86 contribuya a la baja actividad mostrada por la variante S164A. Aunque la resolución de la estructura cristalográfica es limitada, la densidad electrónica representada a un nivel de 1σ y el error coordinado estimado basado en Sigma A statistics (0.44 Å) soportan las observaciones realizadas sobre el efecto de la mutación S164A en la posición de D86.

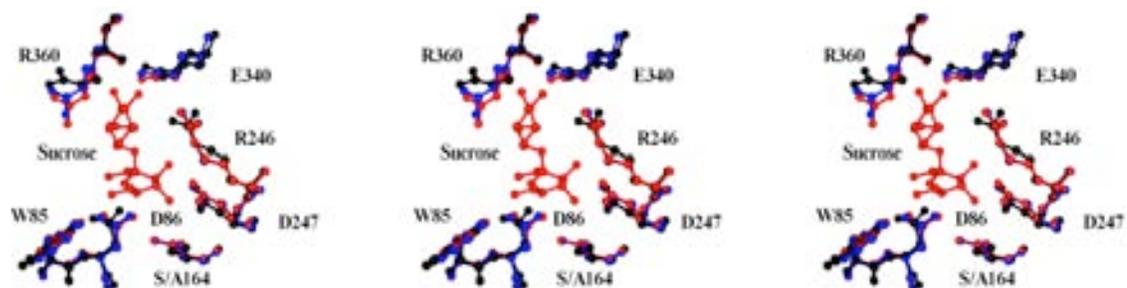


Figura 8. Vista en estereo de los residuos que interaccionan con la sacarosa en la mutante S164A (negro); LS silvestre (PDB 1OYG) (azul); y LS unida a sacarosa (PDB 1PT2) (rojo).

En una explicación adicional a la pérdida de actividad en la mutante S164A se sugiere que el puente de hidrógeno entre S164 y el nucleófilo D86 podría tratarse de un enlace de hidrógeno de baja energía (Low barrier hydrogen bond, LBHB por sus siglas en inglés), como ha sido reportado para diversas glicosil hidrolasas que retienen la configuración del carbono anomérico (Michel et al. 2001). En éstas enzimas, se propone que el LBHB mantiene al nucleófilo con carga negativa al inicio del ciclo catalítico (Kleywegt et al. 1997), por lo que la pérdida del mismo se vería reflejado en la actividad de la enzima y en el perfil de pH de la misma. Sin embargo, dado que el pH óptimo de la LS silvestre y de la mutante S164A fue el prácticamente el mismo (Figura 9), es probable que la pérdida de actividad sea el resultado solo del desplazamiento del nucleófilo respecto a su sustrato como se mencionó anteriormente, y no a un cambio en el estado de protonación del sitio activo.

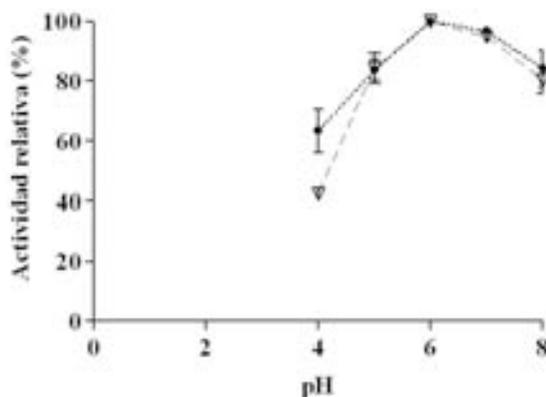


Figura 9. Perfil de pH de la LS silvestre (▽) y la mutante S164A (●).

4.1.4 Efecto de las mutaciones en la especificidad de reacción, de producto y de aceptor

La levana sintetizada por la LS silvestre de *B. subtilis* presenta una distribución bimodal, con un peso molecular promedio de 3500 y 8.3 kDa (Figura 10A). Las variantes I341V, A344P, F414W y S164T no presentaron variación en dicho perfil (datos no mostrados), en tanto que las mutantes H243L y S164A sintetizan levana con una distribución monomodal de alto y bajo peso molecular respectivamente. Se encontró que R360S, Y429N y R433A solo sintetizan oligosacáridos (Figure 10B). A diferencia de Y429N, la mutante Y429F sintetiza cantidades muy pequeñas de polímero con distribución bimodal. Aunque G361F y R360K

producen oligosacáridos de forma preferencial, ambas mutantes conservan la capacidad de sintetizar polímero de alto peso molecular, aunque en bajas concentraciones.

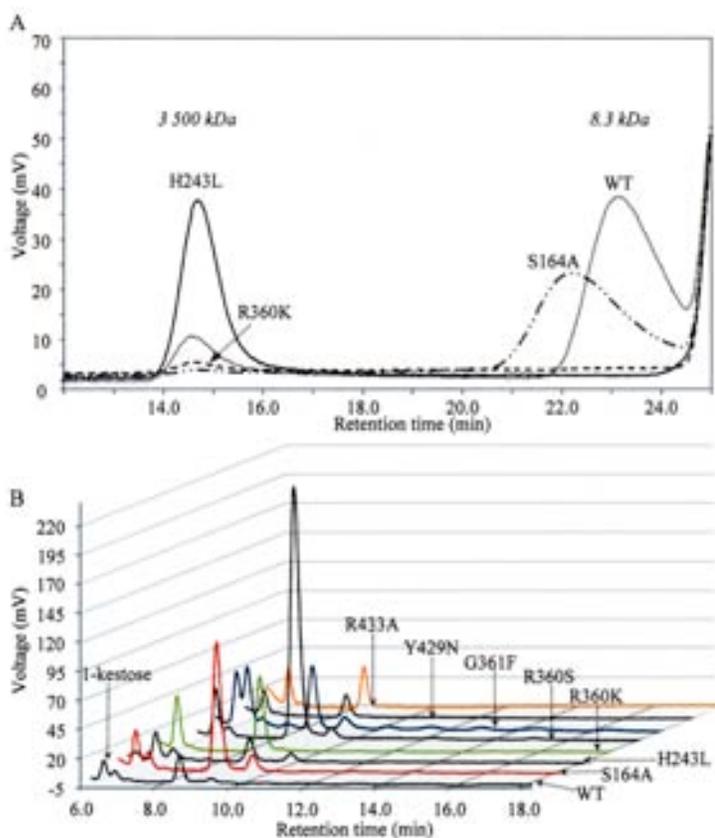


Figura 10. Perfil de levana y oligosacáridos obtenido a partir de sacarosa por la LS silvestre de *B. subtilis* y sus mutantes. El peso molecular de la levana (A) y el perfil de oligosacáridos (B) se analizó después de alcanzar la conversión de sacarosa de 80 %.

Ozimek et al. (2006b) proponen que la polimerización es una reacción procesiva que requiere de una elevada afinidad del polímero en crecimiento por los subsitios +2, +3 y subsiguientes. El cambio en la especificidad de producto mostrado por las variables R360S, Y429N y R433A podría ser consecuencia de una disminución en la afinidad de las moléculas en crecimiento por los subsitios correspondientes, ya que éstas mutantes solo sintetizaron oligosacáridos. En el caso de la mutante R360S, se ha reportado que se altera la especificidad del subsitio +1 y probablemente del +2, ya que como se mencionó anteriormente, R360 se localiza en el límite de los subsitios esos subsitios (Meng y Fütterer 2008).

En el caso de la mutante Y429N, es posible que el efecto de la pérdida de la coordinación de la red de agua resultante de la mutación se haya extendido hasta el subsitio +2,

ya que ésta fue la única mutante que sólo mostró actividad hidrolítica en presencia de rafinosa (datos no mostrados).

Para obtener información más clara sobre el efecto de las mutaciones en los subsitios +1 y +2, se analizó el cambio en la especificidad en reacciones con sacarosa (donde la sacarosa es el donador y el aceptor) y en reacciones sacarosa/aceptor, donde el aceptor puede ser xilosa o maltosa. En presencia solo de sacarosa, se observó un cambio en la especificidad (H/T) para las mutantes H243L, R360K/S, G361F, Y429N, y R433A, las cuales se volvieron más hidrolíticas, reduciendo el porcentaje de fructosa transferida para la producción de polímero y/o oligosacáridos (Figura 11A). Se encontró que, debido a la ubicación de los aminoácidos mutados y de la pérdida de interacciones señalada previamente, es posible que R360/K/S y G361F disminuyan la afinidad de la molécula aceptora (sacarosa y/o levana) en el subsitio +1, en tanto que H243L podría disminuir la afinidad en el subsitio +2, ya que se ha reportado que N242 forma parte del mismo (Homann et al. 2007). La mayor actividad hidrolítica se observó con Y429N, la cual disminuyó su actividad de transfructosilación a sólo 4 % de la sacarosa transformada, en tanto que la mutante Y429F transfiere aproximadamente 15 %. Y429 es un residuo que coordina una red de agua en el sitio activo que involucra indirectamente a los subsitios -1 y +1 (Figura 6D). Por el contrario, con la mutante S164A se obtuvo un aumento en la transfructosilación de aproximadamente 15 % probablemente no como resultado del aumento en la afinidad por algún subsitio, sino como resultado de un aumento en la hidrofobicidad del ambiente que rodea al nucleófilo D86. Con la mutante S164T se restauró la polaridad del ambiente y la relación H/T fue prácticamente la misma que para la de la LS silvestre (55/45 y 53/47 respectivamente).

Para analizar directamente el efecto de las mutaciones en el subsitio +1, se utilizó xilosa como aceptor modelo en presencia de sacarosa como donador de fructosa. De manera general se observó que la presencia de moléculas aceptoras diferentes a la sacarosa o al polímero aumentó la transfructosilación en todos los casos, de acuerdo con los cambios observados en la relación H/T en presencia sólo de sacarosa. De las dos moléculas aceptoras probadas, se encontró que la xilosa es el mejor aceptor del residuo fructosilo, como se deduce de los resultados reportados en la Figura 8B. Debido a que se trata de un monómero, se propone que la xilosa ocupa el subsitio +1 cuando se libera el residuo de glucosa en el primer paso de la reacción y por tanto la transferencia se favorece sobre éste azúcar al ser independiente de la afinidad por subsitios posteriores. De los resultados con xilosa (Figura 11B) se desprende que solo las mutantes H243L, R360K/S y Y429N mostraron un cambio en la afinidad del subsitio +1, dado que el

resto de las mutantes transfirieron fructosa a la molécula de xilosa tan eficientemente como la LS silvestre.

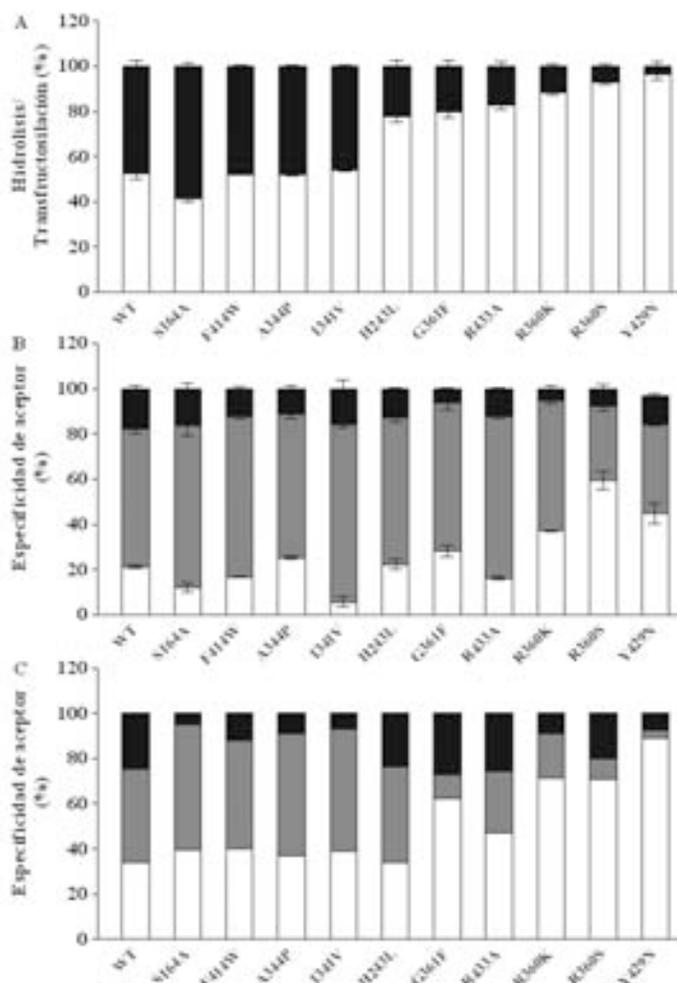


Figura 11. Hidrólisis, transfructosilación y reacciones de aceptor de la LS silvestre de *B. subtilis* y sus mutantes. Las reacciones fueron realizadas con: A) sacarosa; B) sacarosa/xilosa y C) sacarosa/maltosa, a una concentración de 120 g/L. La transferencia de fructosa hacia sacarosa, oligosacáridos o levana (negro), xilosa o maltosa (gris) y agua (blanco), fue analizado a una conversión de sacarosa de 80 %.

En cuanto a la actividad de transferencia hacia maltosa, que involucra a los subsitios +1 y +2, las mutantes S164A, I341V, A344P y F414W fueron más eficientes en la síntesis del maltosil-fructósido que la LS silvestre, en tanto que nuevamente las mutantes R360K/S y Y429N mostraron una disminución notable en la transferencia a disacáridos (Figure 11C). La baja transferencia a disacáridos que muestran las mutantes G361F y R433A permite suponer que la afinidad del subsitio +2 pudo verse alterada con estas mutaciones, dado que en presencia de xilosa, que ocuparía solamente el subsitio +1, la transferencia es igual que la de la LS

silvestre. En el caso de las mutantes R360K/S y Y429N que también transfieren de manera deficiente a disacáridos, con la información que se tiene hasta el momento con xilosa y maltosa como aceptores, no es posible discernir si la baja transferencia a maltosa y a sacarosa es el resultado de alteraciones en el subsitio +2 o bien la disminución en el subsitio +1 que se observó con xilosa es suficiente para disminuir la transferencia a moléculas de mayor peso molecular.

4.1.5 Efecto de activación por sustrato

Se observó que la LS silvestre hidroliza el sustrato en una etapa temprana de la reacción, aumentando la transfructosilación de manera gradual a medida que la reacción procede y alcanzando un mínimo en la relación H/T cuando la conversión de sacarosa está cerca del 90 % (Figura 12).

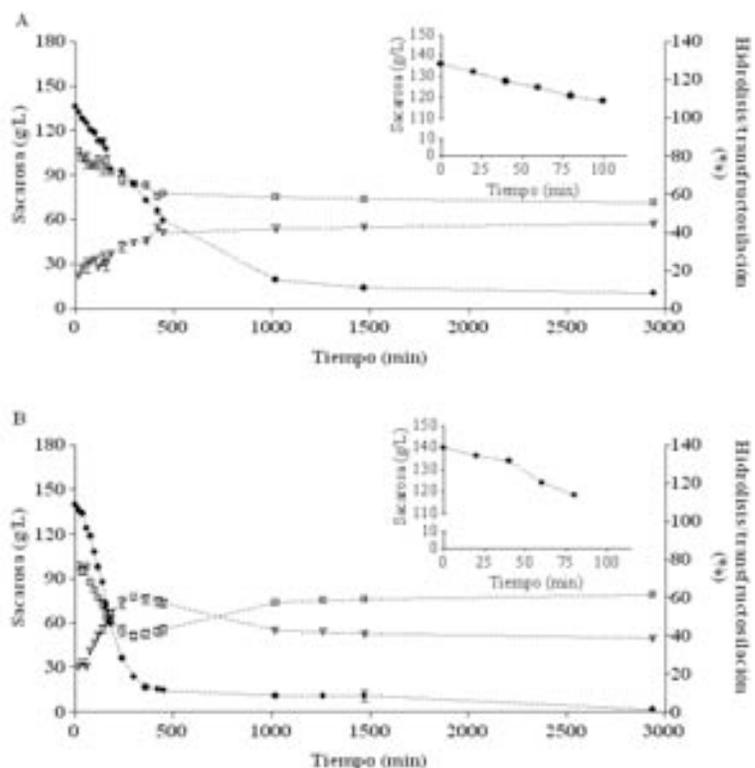


Figura 12. Cinética de conversión de sacarosa de: **A)** LS silvestre y **B)** variante S164A. La conversión de sacarosa (●), hidrólisis (□) y transfructosilación (V), se midieron en reacciones realizadas con 0.5 U/mL de actividad enzimática.

Asimismo se observó una disminución en la velocidad de reacción como producto tanto de la concentración cada vez menor de sacarosa como de la inhibición por producto (Figura

12A). Este comportamiento fue exhibido por todas las mutantes, excepto por S164A, la cual mantuvo la velocidad de consumo inicial de sacarosa casi constante a lo largo de la reacción, alcanzando el 90 % de conversión más rápido que la LS silvestre, partiendo de la misma actividad inicial (0.5 U/mL) (Figura 12B). En la misma figura puede observarse que después de alcanzar el mínimo en la relación H/T y una concentración de sacarosa menor a 15 %, la variante S164A empieza a hidrolizar el polímero.

Como se muestra en la Figura 12B, se observó un probable efecto de activación en la reacción de la mutante S164A después de los primeros minutos de reacción con sacarosa,. La activación por levana a concentraciones de polímero menores a 5 mM ha sido reportada previamente para la LS de *B. subtilis* (Chambert et al. 1974). Tal efecto solo ha sido observado con levana de grado de polimerización mayor a 10 y concentraciones menores de 5 g/L (Tanaka et al. 1981). En este trabajo se observó que la actividad de S164A es levana-dependiente hasta una concentración de polímero de 15 g/L (Figura 13). De acuerdo a lo esperado, la levana no tuvo efecto en la actividad de la mutante Y429N, ya que, como se mencionó anteriormente, esta mutante perdió la capacidad de sintetizar polímero.

Además, se observó que la activación es dependiente de la temperatura, ya que se obtuvo un aumento en la actividad de la mutante S164A en presencia de levana de 5.4, 4.1, 3.7 y 2.5 veces a 20, 30, 40 y 50 °C respectivamente (Figura 14). Sangiliyandi et al. (1999) y Jang et al. (2001) reportaron para la LS de *Z. mobilis* que la reacción de hidrólisis se ve favorecida sobre la reacción de transferencia al aumentar la temperatura, por lo que es probable que las cadenas de levana adicionadas al medio de reacción tengan un efecto menor sobre la reacción de transfructosilación de la mutante S164A a medida que la temperatura se incrementa.

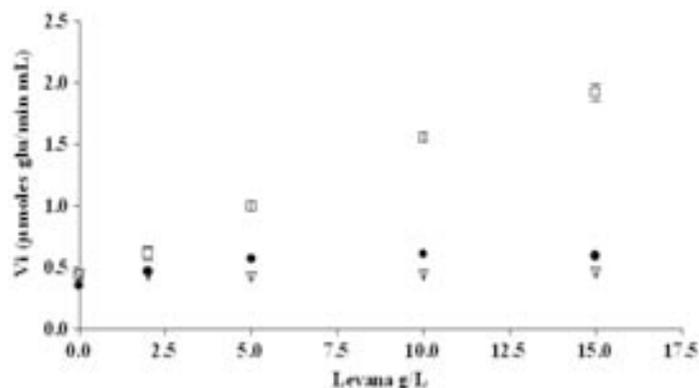


Figura13. Influencia de la concentración de levana en la actividad de la LS silvestre (●), S164A (□) y Y429N (▽).

Con el objetivo de analizar si la diferencia observada en la activación por levana entre la LS silvestre de *B. subtilis* y la mutante S164A radica en el cambio de las interacciones de la enzima con el polímero a nivel de sitio activo, se construyeron las mutantes nulas E342A y S164A/E342A. Ambas mutantes serán cristalizadas en ausencia y en presencia de 6-kestosa, que corresponde a la unidad más pequeña de levana. Se requiere de mutantes nulas para evitar que la enzima reaccione con el polímero distorsionando el arreglo cristalino. Previamente se reportó que la mutación en la posición E342E anula la actividad de la LS de *B. subtilis* sin inducir cambios estructurales significativos respecto a la enzima silvestre (Meng y Futterer 2003), por lo que la resolución de las estructuras cristalográficas antes señaladas permitirá analizar la interacción de 6-kestosa con ambas mutantes y probablemente aportará información relevante respecto al efecto de activación por levana.

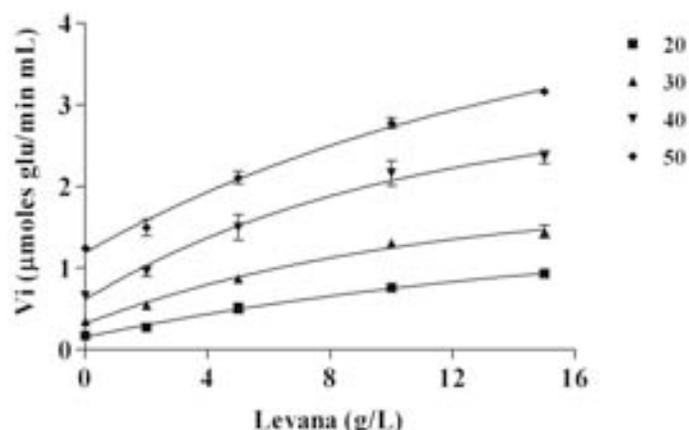


Figura 14. Influencia de la temperatura en la activación por levana en la mutante S164A. Se midieron velocidades iniciales a diferentes temperaturas empleando 0.5 U/mL de actividad enzimática y diferentes concentraciones de levana.

4.1.6 Conclusiones sobre los resultados obtenidos de las mutaciones sitio-dirigidas en la LS de *B. subtilis*

Por medio de mutagénesis sitio-dirigida se obtuvieron mutantes con diferentes propiedades, entre las que destacan S164A y Y429N. Se encontró que el residuo Y429 se encuentra involucrado indirectamente en la catálisis, ya que coordina la posición de la sacarosa por medio de una red de interacciones que incluye a dos moléculas de agua y además tiene un papel importante en la especificidad de aceptor. Se demostró que S164 mantiene al nucleófilo D86 en la posición adecuada respecto a la molécula de sacarosa. De acuerdo con la estructura cristalográfica, la pérdida de actividad de la mutante S164A es el resultado del desplazamiento del nucleófilo con relación al sustrato. Adicionalmente, se encontró que la mutante S164A es 12

veces más estable que la LS silvestre y presenta activación por levana que aumenta la velocidad de reacción de esta variante casi 400 %. Por otro lado, el perfil de productos fue modificado con las mutantes R360S, Y429N y R433A, las cuales solo sintetizan oligosacáridos. Este trabajo fue publicado en Protein Engineering, Design and Selection con el título “Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties”.

4.2 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOCATALIZADORES PARA REACCIONES DE TRANSFRUCTOSILACIÓN.

Del estudio de la relación estructura-función de la LS de *B. subtilis*, se continuó con el diseño de biocatalizadores a partir de la enzima silvestre y de las mutantes R360K/S y Y429N. La selección de las mutantes para la obtención de biocatalizadores se basó en la especificidad de producto de las mismas. Se eligieron mutantes que de manera preferencial sintetizan oligosacáridos con el objetivo de reducir las restricciones difusionales generadas por la síntesis de polímero. Se seleccionó la xilosa como modelo para reacciones de aceptor, dado que en presencia de éste monosacárido la reacción de transfructosilación se ve favorecida sobre la de hidrólisis, además de que la molécula de xilosa es mejor aceptor del residuo fructosilo que la sacarosa o las cadenas de polímero en crecimiento, lo cual adquiere relevancia desde el punto de vista difusional.

4.2.1 Análisis de la red cristalina de la LS silvestre de *B. subtilis* y obtención de CLECs

Previo a la obtención de CLECs, se realizó un análisis de la red cristalina de la LS silvestre con base en su estructura cristalográfica (acceso PDB 1OYG) con la finalidad de observar la distribución y diámetro de los canales ocupados por solvente en el arreglo proteico, disponibles para la difusión de sustratos y productos en el biocatalizador. Aún cuando ha sido reportado que el diámetro de los canales en un cristal puede variar de 20 a 100 Å (Vilenchik et al. 1998), la LS silvestre de *B. subtilis* muestra un arreglo empacado donde los canales están prácticamente ausentes, lo que representa un pésimo escenario para la biocatálisis, especialmente si involucra la síntesis de polímeros (Figura 15). De acuerdo con lo descrito en la literatura, el arreglo cristalino y por tanto de los canales disponibles para la difusión dependen del arreglo de las moléculas de proteína en un grupo espacial particular (Margolin y Navia 2001). En un intento por modificar el arreglo cristalino, se alteraron algunas condiciones de cristalización para la LS silvestre y las mutantes R360K/S respecto a las reportadas por Meng y Futterer (2003) para la LS silvestre. Entre los parámetros modificados se incluye la

concentración de proteína y el medio de cristalización, teniendo como antecedente el polimorfismo cristalino reportado para la albúmina sérica humana como resultado de modificaciones en las condiciones de cristalización (Vilenchik et al. 1998; Carter et al. 1994). Sin embargo, cuando se difractaron cristales de la LS silvestre de *B. subtilis* obtenidos bajo condiciones diferentes de cristalización, se encontró el mismo grupo espacial y prácticamente la misma celda unitaria para la LS silvestre cristalizada en este trabajo ($a=54.48 \text{ \AA}$, $b=62.25 \text{ \AA}$, $c=123.42 \text{ \AA}$) y la reportada previamente ($a=51.11 \text{ \AA}$, $b=67.01 \text{ \AA}$, $c=123.68 \text{ \AA}$), por lo que se asume el mismo tipo de arreglo.

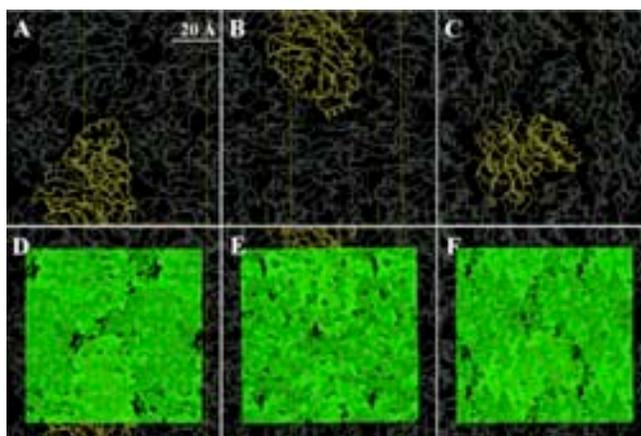


Figura 15. Arreglo cristalino de la LS silvestre de *B. subtilis*. El arreglo de la LS (PDB 1oyg, grupo espacial $P2_12_12_1$) está caracterizado por la ausencia de canales internos, lo cual es visible claramente en los planos BC (A and D), AC (D and E) y AB (C and F). La densidad del empacamiento del cristal y la ausencia de canales destaca cuando se muestra la densidad electrónica (Paneles D, E y F en verde).

Se obtuvieron cristales de la LS silvestre de *B. subtilis* y de las mutantes R360K/S (Figura 16) y se entrecruzaron con glutaraldehído para la obtención de CLECs. A pesar de que se esperaba actividad proveniente de las moléculas de la superficie accesibles al sustrato (localizadas en los planos cristalográficos ac y bc), la actividad observada en los CLECs tanto en presencia de sacarosa como de la molécula aceptora xilosa fue despreciable. Cabe mencionar que los CLECs pierden el arreglo cristalino, por lo que no difractan después de reaccionar con sacarosa.



Figura 16. Cristales de A) LS silvestre de *B. subtilis*; B) R360K y C) R360S.

Aunque diferentes condiciones de cristalización pueden ser exploradas, así como mutagénesis en la superficie de la proteína para modificar el grupo espacial y el arreglo cristalino, se puede concluir que los cristales catalíticos entrecruzados no son una opción adecuada para la obtención de biocatalizadores con alta actividad específica a partir de la LS de *B. subtilis*.

4.2.2 Obtención de CLEAs

Se diseñaron agregados entrecruzados a partir de la LS silvestre y las mutantes para obtener una arreglo proteico con una estructura tal que permita la difusión sin restricciones de sustratos y productos. Después de explorar diferentes concentraciones de agente precipitante, agente entrecruzante y proteína, los agregados de mayor actividad se obtuvieron con 60 % de sulfato de amonio, 0.2 % de glutaraldehído y 4 mg/mL de proteína.

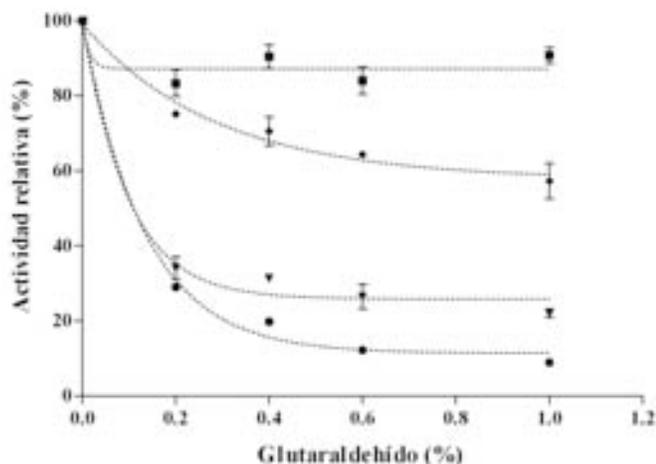


Figure 17. Efecto de la concentración de glutaraldehído en la actividad de la LS silvestre (●) y las mutantes R360K (▼), R360S (◆) y Y429N (■).

De los elementos evaluados, el más crítico en la actividad fue el glutaraldehído, cuyo efecto se muestra en la figura 17. Se observó una pérdida drástica de actividad con los CLEAs de la LS silvestre y la mutante R360K cuando se entrecruzan con 0.2 % de glutaraldehído, pero un efecto menor sobre la actividad enzimática aún a concentraciones mayores para las mutantes R360S y Y429N. En general la pérdida de actividad correlaciona de manera directa con los parámetros cinéticos de las cuatro enzimas estudiadas, ya que a mayor k_{cat} y afinidad por el sustrato, mayor es la pérdida de actividad del agregado con respecto a las enzimas en solución. Los valores de k_{cat} y K_m de la LS silvestre y las mutantes R360K, R360S y Y429N son 165/8,

170/30, 14/154 y 6/320 s⁻¹/mM respectivamente (Ortiz-Soto et al. 2008). De acuerdo con estos resultados, es probable que en el caso de la LS silvestre y de la mutante R360K la pérdida de actividad aún a bajas concentraciones de glutaraldehído no sea resultado de una desactivación de la enzima, sino de problema difusionales, mismos que podrían reducirse al disminuir el tamaño de partícula del biocatalizador.

Como se muestra en la Tabla III, los CLEAs de R360K presentaron la actividad específica más alta, seguidos por los derivados de la LS silvestre y de Y429N, aunque la actividad específica de los agregados obtenidos con esta última mutante es el 80 % respecto a la enzima en solución. Aunque la actividad específica de los CLEAs de la LS silvestre y de R360K es aun baja respecto al máximo teórico, la actividad reportada para éstos biocatalizadores es la más alta reportada hasta el momento para un biocatalizador con actividad FTF o glucosiltransferasas (GTF), ya que la concentración de glutaraldehído es insignificante y el catalizador resultante está constituido básicamente de proteína.

Migneault et al. (2004) y Wine et al. (2007) reportaron que alrededor de pH neutro el glutaraldehído reacciona rápidamente con los grupos amino y que polimeriza bajo condiciones ácidas o alcalinas. En un análisis de accesibilidad del solvente se encontró que los grupos ε-amino de las 40 lisinas que contiene la LS silvestre están expuestos, incluidos los de K114, K185 y K363 que se ubican en el límite del sitio activo. Es probable, como ya se señaló, que la pérdida de actividad observada después del entrecruzamiento pueda implicar restricciones difusionales o inactivación de las enzimas como resultado de un entrecruzamiento excesivo, por lo que nuevas condiciones de entrecruzamiento deben ser exploradas, así como el uso de diferentes agentes entrecruzantes.

Tabla III. Caracterización de CLEAs de la LS silvestre y las mutantes R360K y Y429N.

Enzima	Actividad recuperada en CLEAs (%)	U/mg CLEAs
LS silvestre	28	44.9
Y429N	80	1.2
R360K	33	56.5

En la preparación de los CLEAs se emplearon 4 mg de enzima, mismos que se incorporaron totalmente al agregado correspondiente.

4.2.3 Inmovilización sobre Eupergit C®

La inmovilización tanto de GTF como de FTF sobre diferentes soportes como Eupergit C®, hidroxiapatita y alginatos ha sido reportada para la síntesis de polímero y oligosacáridos (Baciu et al. 2005; Berensmeier et al. 2004; Chambert and Petit-Glatron 1993; Gómez de Segura et al. 2004; Steinberg et al. 2002b). Durante este trabajo se inmovilizaron sobre Eupergit C® la LS silvestre y las mutantes antes descritas con la finalidad de comparar la estabilidad térmica y operacional de los biocatalizadores obtenidos por este método de inmovilización tradicional y los CLEAs. Se optimizaron las condiciones de inmovilización en Eupergit C® para la mutante R360K, modificando la concentración de proteína, el pH y el tiempo de inmovilización (Tabla VI). Se observó una diferencia drástica entre la actividad específica mostrada por los biocatalizadores convencionales y la que presentan los CLEAs (Tablas III y IV).

Tabla IV. Caracterización de la LS silvestre y las mutantes R360K y Y429N inmovilizadas sobre Eupergit C®.

Enzima	mg LS inmovilizada/g Eupergit C®	Actividad recuperada en el soporte (%)	U/mg biocatalizador seco
LS silvestre ^a	6.8	59	0.644
Y429N ^a	7.8	55	0.006
R360K ^a	7.1	60	0.735
R360K ^b	9.3	58	0.928
R360K ^c	18.8	51	1.640

Se emplearon 10 mg de enzima pura por gramo de Eupergit C® en todos los casos excepto para C, en que se emplearon 20 mg. ^a inmovilización a pH 6.0, durante 38 h. ^b inmovilización a pH 7.0, durante 38 h. ^c inmovilización a pH 7.0, durante 72 h.

4.2.4 Actividad de CLEAs

Se midió la actividad de los biocatalizadores libres de soporte en la síntesis de levana, observando una pérdida casi total de la actividad en los derivados de la LS silvestre y R360K después de los primeros minutos de reacción (Figura 18A). A pesar de la baja producción de polímero por la mutante R360K, es probable que la acumulación de levana formada dentro del biocatalizador haya inducido restricciones difusionales definitivas. Los CLEAs de la variante Y429N fueron los únicos en los que se mantuvo constante la conversión de sacarosa durante el tiempo de reacción ensayado ya que, como se reportó previamente, ésta mutante no sintetiza polímero (Ortiz-Soto et al. 2008). Seibel et al. (2006) reportaron que la xilosa es un buen aceptor del residuo fructosilo en la reacción catalizada por la LS de *B. subtilis* NCIMB 11871,

llevando a la formación de un β -D-fructofuranosil- α -D-xilopiranosido. Dado el antecedente anterior, y a que la transferencia sobre sacarosa es reducida drásticamente en presencia de esta molécula aceptora (Ortiz-Soto et al. 2008), la xilosa fue elegida como modelo de estudio para las reacciones de transfructosilación. La producción del xilósido se realizó de manera eficiente tanto con las enzimas en solución como con los CLEAs de la LS silvestre, R360K y Y429N (Figura 18B), demostrando la funcionalidad de los CLEAs en reacciones de aceptor con moléculas pequeñas, en condiciones de eliminación de síntesis de polímero.

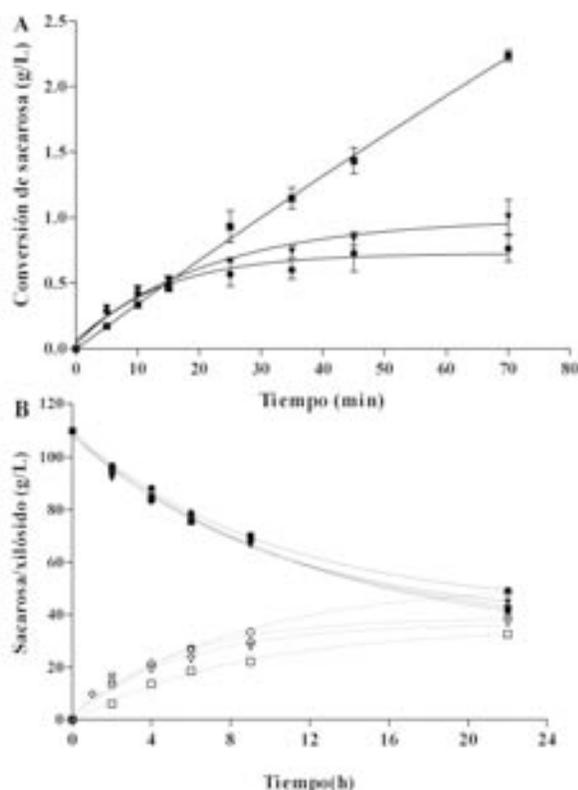


Figura 18. Actividad de CLEAs de la LS silvestre y las mutantes en reacciones de síntesis de levana (A) y xilósido (B). \blacklozenge) R360K en solución, \bullet) LS silvestre-CLEAs, \blacktriangledown) R360K-CLEAs y \blacksquare) Y429N-CLEAs. En la figura 13B Los símbolos cerrados indican la transformación de sacarosa, en tanto que los símbolos abiertos representan la síntesis del fructósido.

4.2.5 Efecto del método de inmovilización en la estabilidad del biocatalizador.

Con el objetivo de analizar la influencia del método de inmovilización en la estabilidad, se midió la actividad residual de las enzimas en solución, inmovilizadas en Eupergit C[®] y de los CLEAs después de 1 h de incubación a diferentes temperaturas. Se observó que los CLEAs son tan estables como los biocatalizadores obtenidos por inmovilización covalente sobre Eupergit

C[®]. Se obtuvo un incremento de aproximadamente 20 % en la estabilidad de ambos tipos de biocatalizador respecto a las enzimas en solución a 40 °C, en tanto que a 50 y 60 °C éstas últimas se inactivan completamente, en tanto que los biocatalizadores inmovilizados retienen alrededor de 35 y 8 % de actividad respectivamente (Figura 19).

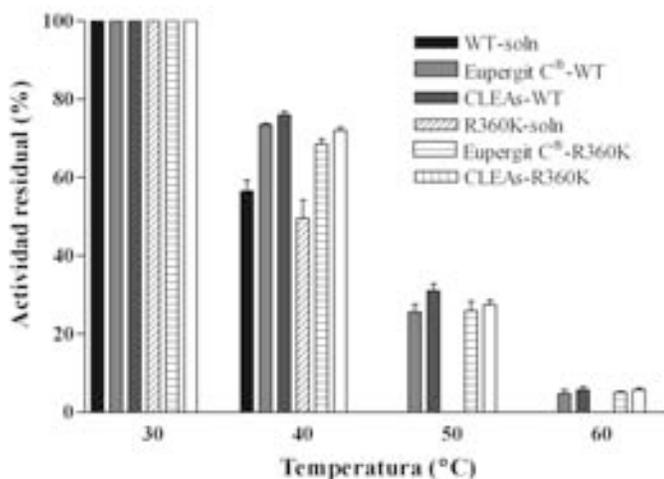


Figura 19. Efecto del método de inmovilización en la actividad residual después de una hora de incubación a diferentes temperaturas.

4.2.6 Estabilidad operacional de las enzimas inmovilizadas

La estabilidad operacional de las enzimas inmovilizadas sobre Eupergit C[®] y los CLEAs en la síntesis del xilósido fue evaluada midiendo la conversión de sacarosa después de cada ciclo de reacción de 3 horas. Los CLEAs de las mutantes R360K y Y429N mostraron mayor estabilidad operacional que la LS silvestre (Figura 20A). Además, se observó que los derivados de Eupergit C[®] fueron más estables que los CLEAs, ya que la mutante R360K inmovilizada en Eupergit C[®] conserva aproximadamente 80 % de actividad después de 10 ciclos de reacción, en tanto que los CLEAs de esta mutante retienen 40 % de actividad. Sin embargo, la pérdida de actividad en los CLEAs de R360K es menor durante los últimos ciclos, lo que puede ser el resultado de alcanzar una estructura constituida por el biocatalizador y el polímero que ya no presenta restricciones difusionales, permaneciendo estable en ciclos subsecuentes (Figura 20B). La estabilidad operacional de los CLEAs de R360K es equiparable a la que presenta la LS silvestre inmovilizada en Eupergit C[®].

La aparente inactivación de los CLEAs después de cada ciclo puede entonces ser atribuida a la acumulación de producto dentro del biocatalizador, como se demostró por la presencia de fructosa al hidrolizar los agregados (datos no mostrados). Los problemas difusionales afectaron en mayor medida a los CLEAs de las enzimas con una relación H/T

menor, por lo que la pérdida de actividad probablemente involucre la acumulación de oligosacáridos, aunada al entrecruzamiento excesivo.

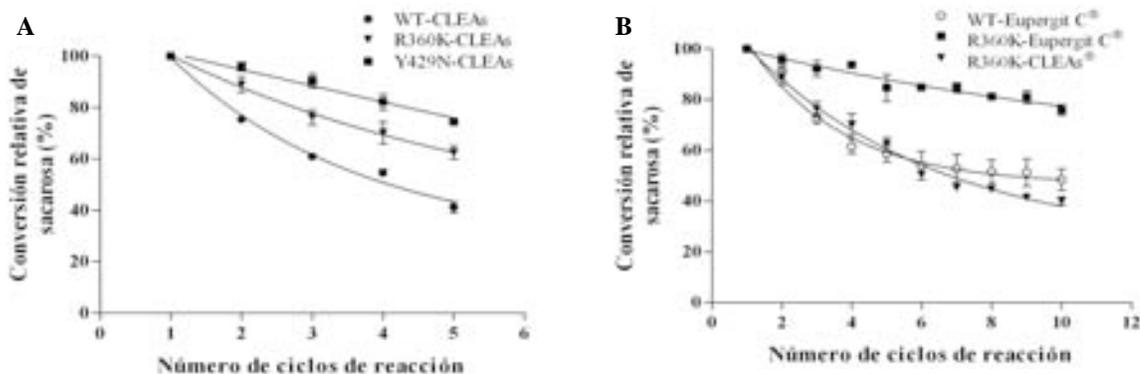


Figura 20. Estabilidad operacional de las LS inmovilizadas. A) Comparación de la LS silvestre y R360K inmovilizadas sobre Eupergit C con CLEAs de R360K. B) Comparación de la estabilidad de CLEAs de la LS silvestre, R360K y Y429N. Se midió la conversión de sacarosa después de 3 h de reacción usando una actividad inicial 4 U/mL. La conversión de sacarosa después del primer ciclo de reacción fue de 81 % (± 7.3) para todos los biocatalizadores.

4.2.7 Conclusiones sobre los biocatalizadores libres de soporte obtenidos a partir de la LS silvestre de *B. subtilis* y sus mutantes.

Este es el primer reporte de agregados entrecruzados a partir de glicosiltransferasas. Se demostró que los CLEAs obtenidos a partir de la LS silvestre y las mutantes R360K y Y429N pueden realizar la síntesis de fructósidos tan eficientemente como las enzimas en solución y presentan una estabilidad a la temperatura comparable con los biocatalizadores obtenidos por inmovilización covalente sobre Eupergit C[®]. Adicionalmente, las actividades reportadas para los CLEAs son las mayores obtenidas hasta el momento para FTF y GTF inmovilizadas. Es importante señalar que biocatalizadores libres de soporte permiten reducir el volumen operacional de reactores, incluso trabajando con enzimas de baja actividad específica, como es el caso de la mutante Y429N. La actividad específica del biocatalizador R360K-Eupergit C[®] es también la más alta reportada para estas enzimas empleando resinas epóxicas. Aún cuando se demostró que los CLEAs obtenidos son adecuados para la síntesis de fructósidos, es posible mejorar la actividad resultante reduciendo el tamaño de partícula y empleando diferentes agentes entrecruzantes. Este trabajo se encuentra sometido al Journal of Biotechnology bajo el título de “Evaluation of cross-linked crystals and aggregates of *Bacillus subtilis* levansucrase and mutants for transfructosylation reactions”.

5. CONCLUSIONES GENERALES

Por medio de mutagénesis sitio-dirigida se obtuvieron mutantes de la LS de *Bacillus subtilis* y se determinó el papel que desempeñan nueve residuos cercanos al sitio activo, que con excepción de R360 no interactúan directamente con el sustrato, en la especificidad, propiedades cinéticas y estabilidad térmica de la enzima. Entre los elementos que destacan se encuentra la modificación en el perfil de productos con las mutantes R360S, Y429N y R433A, las cuales solo sintetizan oligosacáridos y el estudio del papel que desempeñan las posiciones S164 y Y429N en la posición del nucleófilo D86 y en la unión de sacarosa en el sitio activo respectivamente. En general, este trabajo aporta información relevante para el conocimiento de la relación estructura-función de la LS de *B. subtilis*, enfocada en el desarrollo en un futuro de biocatalizadores con características predeterminadas.

Asimismo, los biocatalizadores libres de soporte obtenidos a partir de la LS silvestre y las mutantes R360K y Y429N son los biocatalizadores de FTF y GTF con mayor actividad específica reportados hasta la fecha, con lo que se generó una opción innovadora en la glicosilación de azúcares que puede ser aplicada en la glicosilación de compuestos de interés en el área farmacológica y de alimentos.

PERSPECTIVAS

- ❖ **Determinar el mecanismo de activación de la LS silvestre y de la mutante S164A.** Una primera aproximación para elucidar el mecanismo de activación es el análisis del efecto de la levana de diferente peso molecular en las actividades de hidrólisis y de transferencia de las dos enzimas. Con la determinación de los parámetros cinéticos de ambas reacciones en presencia del activador se busca establecer el tipo de activación que promueve la levana.
- ❖ **Elucidar el papel que desempeña el polímero analizando la elongación de la levana de bajo peso molecular mediante el uso de sacarosa marcada.** Dado que existe controversia sobre el mecanismo de activación por levana, se busca determinar si este fenómeno resulta de una mayor afinidad del polímero como molécula aceptora del residuo fructosilo, en detrimento de la sacarosa y el agua. En este caso la levana agregada al medio como activador sería elongada, actuando a manera de *primer* y acelerando la reacción.
- ❖ **Cristalizar las mutantes S164A, S164T y la LS silvestre con levana de bajo peso molecular.** El estudio cristalográfico tiene como objetivo analizar la interacción de la LS silvestre y de las mutantes S164A/T con la molécula más pequeña del polímero (6-kestosa), para lo que se construyeron las mutantes nulas E342A y S164A/E342A. Se espera que la información estructural y bioquímica nos permita elucidar un fenómeno que hasta la fecha no ha sido estudiado.
- ❖ **Obtener mutantes hidrolíticas con mayor actividad específica para ser utilizadas en la síntesis de fructósidos de interés comercial.** Con mutantes hidrolíticas de elevada actividad específica se busca aumentar la eficiencia en reacciones de transfructosilación a moléculasceptoras diferentes a la sacarosa, así como la estabilidad operacional de los biocatalizadores libres de soporte reportados en este trabajo.
- ❖ **Optimizar las condiciones de entrecruzamiento con glutaraldehído y explorar diferentes agentes entrecruzantes.** Entre las condiciones a optimizar con glutaraldehído se encuentran el tiempo y la temperatura de entrecruzamiento en la obtención de CLEAs para reducir las restricciones difusionales que presentan éstos biocatalizadores, así como modular el tamaño de las cadenas de glutaraldehído adicionando lisina. El uso de otros agentes entrecruzantes.
- ❖ **Analizar la especificidad de transferencia de las mutantes obtenidas en este trabajo hacia compuestos antioxidantes.** Se busca analizar la especificidad de transferencia de las mutantes generadas en la fructosilación de compuestos antioxidantes de interés comercial.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad S, Gromiha M, Fawareh H, Sarai A. 2004 ASAView: database and tool for solvent accessibility representation in proteins. *BMC Bioinformatics*. 5:51.
- Anwar MA, Kralj S, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L. 2008. The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. *Appl Environ Microbiol*. 74(11):3426-3433.
- Baciu IE, Jordening HJ, Seibel J, Buchholz K. 2005. Investigations of the transfructosylation reaction by fructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 for the synthesis of the sucrose analogue galactosyl-fructoside. *J Biotechnol*. 116(4):347-57.
- Batista FR, Hernández L, Fernández JR, Arrieta J, Menéndez C, Gómez R, Támara Y, Pons T. 1999. Substitution of Asp-309 by Asn in the Arg-Asp-Pro (RDP) motif of *Acetobacter diazotrophicus* levansucrase affects sucrose hydrolysis, but not enzyme specificity. *Biochem J*. 337 (Pt 3):503-6.
- Berensmeier S, Ergezinger M, Bohnet M, Buchholz K. 2004. Design of immobilised dextranucrase for fluidised bed application. *J Biotechnol*. 114:255-267.
- Berman HM, Bhat TN, Bourne PE, Feng Z, Gilliland G, Weissig H, Westbrook J. 2000a. The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nat Struct Biol*. 7 Suppl:957-9.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. 2000b. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 28(1):235-42.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.
- Brünger AT, Adams PD, Clore GM, Delano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges N, Pannu NS and others. 1998. Crystallography & NMR system: A new software for macromolecular structure determination. *Acta Cryst D*. 54(905-921).
- Cao L, Langen L, Sheldon RA. 2003. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr Opin Biotechnol*. 14(4):387-394.
- Cao L, van Rantwijk F, Sheldon RA. 2000. Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Org Lett*. 2(10):1361-1364.
- Carter DC, Chang B, Ho JX, Keeling K, Krishnasami Z. 1994. Preliminary crystallographic studies of four crystal forms of serum albumin. *Eur J Biochem*. 226:1049-1052.
- Chambert R, Gonzy-Treboul G, Dedonder R. 1974. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem*. 41(2):285-300.
- Chambert R, Petit-Glatron MF. 1991. Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *Biochem J*. 279 (Pt 1):35-41.
- Chambert R, Petit-Glatron MF. 1993. Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. *Carbohydr Res*. 244 129-36.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31(13):3497-500.
- Clamp M, Cuff J, Searle SM, Barton GJ. 2004. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*. 20 (3):426-427.
- Collaborative Computational Project N. 1994. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst D*. 50:760-763.
- Das S, Rosazza JPN. 2006. Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. *J Nat Prod*. 69(3):499-508.
- Davies GJ, Wilson KS, Henrissat B. 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J*. 321:557-559.
- de Roode BM, Franssen MC, van der Padt A, Boom RM. 2003. Perspectives for the industrial enzymatic production of glycosides. *Biotechnol Prog*. 19:1391-1402.
- Emsley P, Cowtan K. 2004. Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. *Acta Cryst D*. 60:2126-2132.
- French AD, Waterhouse AL. 1993. Science and technology of Fructans: CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Gibson GR. 1998. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *Br J Nutr*. 80(4):S209-S212.

- Gómez de Segura A, Alcalde M, Yates M, Rojas-Cervantes ML, López-Cortés N, Ballesteros A, Plou FJ. 2004. Immobilization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on Eupergit C supports. *Biotechnol Prog.* 20(5):1414-1420.
- Govardhan CP. 1999. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. *Curr Opin. Biotechnol* 10(4):331-335.
- Häring D, Schreier P. 1999. Cross-linked enzyme crystals. *Curr Opin Chem Biol.* (3):35-38.
- Homann A, Biedendieck R, Gotze S, Jahn D, Seibel J. 2007. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis - mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J.* 407(2):189-98.
- Jang KH, Song KB, Kim JS, Kim CH, Chung BH, Rhee SK. 2000. Production of levan using recombinant levansucrase immobilized on hydroxyapatite. *Bioprocess Eng.* 23(1):89-93.
- Jang KH, Song KB, Park BS, Kim CH, Chung BH, Choue RW, Lee KS, Lee C, Chun UH, Rhee SK. 2001. Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite. *Process Biochem.* 37(4):339-343.
- Katchalski-Katzir E, Kraemer DM. 2000. Eupergit C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J Mol Catal B:Enzym.* 10:157-176.
- Kim KH, Chung CB, Kim YH, Kim KS, Han CS, Kim CH. 2005. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J Cosm Sci.* 56(6):395-406.
- Kim MG, Kim CH, Lee JS, Song KB, Rhee SK. 2000. Synthesis of methyl β -D-fructoside catalyzed by levansucrase from *Rahnella aquatilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 27:646-651.
- Kleywegt GJ, Zou JY, Divne C, Davies GJ, Sinning I, Ståhlberg J, Reinikainen T, Srisodsuk M, Teeri TT, Jones TA. 1997. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. *J Mol Biol.* 272(3):383-397.
- Lagaert S, Van Campenhout S, Pollet A, Bourgois TM, Delcour JA, Courtin CM, Volckaert G. 2007. Recombinant expression and characterization of a reducing-end xylose-releasing exo-oligoxylanase from *Bifidobacterium adolescentis*. *Appl Environ Microbiol.* 16(73):5374-5377.
- Laue H, Schenk A, Li H, Lambertsen L, Neu TR, Molin S, Ullrich MS. 2006. Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiol.* 152:2909-2918.
- Lenoir-Wijnkoop I, Sanders ME, Cabana MD, Caglar E, Corthier G, Rayes N, Sherman PM, Timmerman HM, Vanechoutte M, Van Loo J and others. 2007. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutr Rev.* 65(11):469-489.
- Leslie AGW. 1992. Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography 26.
- Margolin AL. 1996. Novel crystalline catalysts. *Trends Biotechnol.* 14:219-259.
- Margolin AL, Navia MA. 2001. Protein crystals as novel catalytic materials. *Angew Chem Int Ed Engl.* 40:2204-2222.
- Martinez-Fleites C, Ortiz-Lombardia M, Pons T, Tarbouriech N, Taylor EJ, Arrieta JG, Hernandez L, Davies GJ. 2005. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J.* 390(Pt 1):19-27.
- Meng G, Fütterer K. 2003. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struct Biol.* 10(11):935-41.
- Meng G, Fütterer K. 2008. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct Biol.* 8(16).
- Michel G, Chantalat L, Duee E, Barbeyron T, Henrissat B, Kloareg B, Dideberg O. 2001. The κ -carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: a novel insight in the evolution of Clan-B glycoside hydrolases *Structure.* 9(6):513-525.
- Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron K. 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques.* 37(5):790-802.
- Morales-Arrieta S, Rodriguez ME, Segovia L, Lopez-Munguia A, Olvera-Carranza C. 2006. Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene.* 376(1):59-67.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum likelihood method. *Acta Cryst D.* 53:240-255.

- Olivares-Illana V, Wachter-Rodarte C, Le Borgne S, Lopez-Munguia 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(2):112-117.
- Ortiz-Soto ME, Rivera M, Rudiño-Piñera E, Olvera C, López-Munguía A. 2008. Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Eng Des Sel.* 21:589-595.
- Ozimek LK, Kralj S, Kaper T, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L. 2006a. Single amino acid residue changes in subsite -1 of inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 strongly influence the size of products synthesized. *Febs J.* 273(17):4104-13.
- Ozimek LK, Kralj S, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L. 2006b. The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology.* 152(Pt 4):1187-96.
- Ritsema T, Smekens S. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr Opin Plant Biol.* 6:223-230.
- Roberfroid MB. 1999. Nutritional and health benefits of inulin and oligofructose. Caloric value of inulin and oligofructose. *J Nutr.* 129:1436S-1437S.
- Roberfroid MB. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr.* 71(6 Suppl):1682S-7S; discussion 1688S-90S.
- Roberfroid MB. 2007. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr.* 137(3 Suppl 2):830S-7S.
- Sangilyandi G, Raj KC, Gunasekaran P. 1999. Elevated temperature and chemical modification selectively abolishes levan forming activity of levansucrase of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 21(2):179-182.
- Schoevaart R, Wolbers MW, Golubovic M, Ottens M, Kieboom APG, van Rantwijk F, van der Wielen LAM, R.A. S. 2004. Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol Bioeng.* 87(6):754-762.
- Tischer W, Kasche V. 1999. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol.* 17(8):326-335.
- Seibel J, Moraru R, Gotze S, Buchholz K, Na'amnieh S, Pawlowski A, Hecht HJ. 2006. Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydr Res.* 341(14):2335-2349.
- Steinberg D, Bachrach G, Gedalia I, Abu-Ata S, Rozen R. 2002a. Effects of various antiplaque agents on fructosyltransferase activity in solution and immobilized onto hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci.* 110(5):374-9.
- Steinberg D, Rozen R, Bromshteym M, Zaks B, Gedalia I, Bachrach G. 2002b. Regulation of fructosyltransferase activity by carbohydrates, in solution and immobilized on hydroxyapatite surfaces. *Carbohydr Res.* 337(8):701-10.
- Tanaka T, Yamamoto S, Oi S, Yamamoto T. 1981. Structures of heterooligosaccharides synthesized by levansucrase. *J Biochem. (Tokyo)* 90(2):521-526.
- Vagin A, Teplyakov A. 1997. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.* 30:1022-1025.
- van Hijum S, van Geel-Schutten GH, Rahaoui H, van der Maarel M, Dijkhuizen L. 2002. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol.* 68(9):4390-4398.
- van Hijum SA, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L, van Geel-Schutten IG. 2006. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70(1):157-76.
- Vilenchik LZ, Griffith JP, St. Clair N, Navia MA, Margolin AL. 1998. Protein Crystals as Novel Microporous Materials. *J Am Chem. Soc* 120:4290-4294.
- Wine Y, Cohen-Hadar N, Freeman A, Frolow F. 2007. Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis. *Biotechnol Bioeng.* 98(3):711-718.
- Yamamoto Y, Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S, Yamaguchi H. 1999. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J Nutr Biochem.* 10(1):13-8.
- Zhang Z, Schaffer AA, Miller W, Madden TL, Lipman DJ, Koonin EV, Altschul SF. 1998. Protein sequence similarity searches using patterns as seeds. *Nucleic Acids Res.* 26(17):3986-90.

8 APÉNDICE

ABREVIATURAS

CLEAs	Cross-linked enzyme aggregates
CLECs	Cross-linked enzyme crystals
DNS	Ácido 3,5-dinitro-
FOS	Fructooligosacáridos
FOS	Fructooligosacáridos
FTF	Fructosiltransferasa
GH	Glicosil-hidrolasas
GH68	Familia 68 de las glicosil-hidrolasas
GTF	Glucosiltransferasa
IS	Inulosacarasa
LAB	Lactic acid bacteria
LS	Levansacarasa
PDB	Protein data Bank

Manuscript Number:

Title: EVALUATION OF CROSS-LINKED CRYSTALS AND AGGREGATES OF *Bacillus subtilis* LEVANSUCRASE AND MUTANTS FOR TRANSFRUCTOSYLATION REACTIONS

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Biochemical Engineering / Bioprocess Engineering

Keywords: Levansucrase, *Bacillus subtilis*, CLECs, CLEAs, Eupergit C

Corresponding Author: Dr Agustin Lopez-Munguia, PhD

Corresponding Author's Institution: Instituto de Biotecnologia, UNAM

First Author: Maria E Ortiz-Soto, M.S.

Order of Authors: Maria E Ortiz-Soto, M.S.; Enrique Rudiño-Piñera, PhD; Manuel Rivera, PhD; Agustin Lopez-Munguia, PhD

Abstract: In this paper the carrier free immobilization of *B. subtilis* wild type levansucrase as well as R360K/S and Y429N mutants and their application for fructoside synthesis using xylose as a model acceptor are studied. For this purpose, the purified enzymes were either crystallized or aggregated and cross-linked with glutaraldehyde or subjected to traditional immobilization on Eupergit C® as a control biocatalyst. While cross-linked levansucrase crystals were inactive, cross-linked levansucrase aggregates were able to catalyze the synthesis of fructosides as efficiently as the soluble enzymes. The specific activity of wild type levansucrase, R360K and Y429N mutants was around 70, 40 and 200-fold higher respectively when compared to the equivalent Eupergit C® derivatives. Although the thermal stability of biocatalysts was similar, the cross-linked aggregates operational stability was affected by levan synthesis so that levansucrase mutants with restricted polymer synthesis activity were used.

INTRODUCTION

Bacillus subtilis levansucrase (LS) is a fructosyltransferase (FTF) synthesizing levan, a high molecular weight fructose polymer, using sucrose as donor and acceptor of the transferred fructosyl moiety (transfructosylation reaction). In general FTFs can also transfer the fructose residue either to water (hydrolysis reaction) or to an acceptor molecule different from sucrose or fructan, added to the reaction medium (acceptor reaction) (Chambert et al., 1974). Although several applications have been developed for levan such as anti-inflammatory agent against skin irritation and as cell-proliferative agent (Kim et al., 2005), current attention has been focused in inulin and levan-type oligosaccharides, including fructosides containing also xylose, galactose, glucose and mannose due to both, their prebiotic properties (Gibson, 1998, Lagaert et al., 2007) as well as their potential applications as alternative low caloric value sweeteners (Seibel et al., 2006). An additional application of FTFs is derived from its potential to fructosylate a wide variety of molecules of industrial interest, particularly for food and pharmaceutical applications (de Roode et al., 2003, Kim et al., 2000, Das and Rosazza, 2006). Considering their wide reaction specificity, for this type of applications FTFs with reduced levan synthesis activity are required.

One of the main challenges in industrial biocatalyst development is the design of highly active and robust derivatives stable over a broad range of operational pH and temperatures, a requirement which is strongly related to the immobilization method (Sheldon, 2007). Carrier-bound enzymes have been for decades the first option for biocatalyst development, even when the inert supports often account for the majority of the biocatalyst mass, with the concomitant reduction in specific activity resulting in low volumetric and space-time yields when applied in continuous reactors (Schoevaart *et al.*, 2004). In this context a major achievement in biocatalysis is the development of cross-linked enzyme crystals (CLECs[®]) and cross-linked enzyme aggregates (CLEAs), biocatalysts which combine the features of pure protein preparations in terms of specific activity and the behavior of biocatalysts particles (Margolin, 1996, Margolin and Navia, 2001) Cao et al. 2000; (Cao et al., 2000, Cao et al., 2003, Sheldon, 2007). CLECs[®] and CLEAs have been shown to be an option for the development of biocatalysts based on a wide variety of enzymes, including, hydrolases, lyases and oxidoreductases (Margolin and Navia, 2001, Sheldon, 2007). Although CLECs[®] elaboration requires the crystallization of the enzyme prior to cross-linking, CLEAs preparation from preformed aggregates of purified enzymes could constitute a simple method with specific activities comparable to CLECs[®] (Cao et al., 2000). LSs are an interesting option to explore the feasibility of developing carrier-free biocatalysts due to their wide reaction specificity and feasibility for purification and crystallization.

In this work, we explore the xylose transfructosylation from *B. subtilis* LS as a model of acceptor reactions using carrier free biocatalysts. For this purpose, purified wild type (WT) LS, R360K/S and Y429N mutants were crystallized, aggregated or subjected to traditional immobilization onto Eupergit C[®] as support. The properties of WT LS and these mutants have been previously reported (Ortiz-Soto et al., 2008, Chambert and Petit-Glatron, 1991) and are summarized in Table 1. We have previously demonstrated that the synthesis of levan displayed by WT LS and R360K/S variants can be considerably reduced in the presence of high affinity acceptors such as xylose and maltose, reducing also their hydrolytic activity (Ortiz-Soto et al., 2008). Additionally, Y429N has been reported as a non-levan synthesizing mutant with a 50 % reduction in its hydrolytic activity in acceptor reactions. Therefore, the appropriate enzyme and reaction conditions can be defined for fructosylation reactions with reduced polymer synthesis as well as hydrolysis, far from eventual diffusional limitations by levan.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Sugars and invertase (β -fructofuranosidase, EC 3.2.1.26, Grade VII from baker's yeast) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). The electrophoresis reagents were from Bio-Rad Laboratories (CA). All buffer salts were from JT Baker Co. (Phillipsburg, NJ, USA). Eupergit C[®] was purchased from Röhm Pharma (Darmstadt, Germany) and glutaraldehyde (50%) was from Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, PA, USA).

Bacterial strain, growth conditions and LS purification. *E. coli* BL21 [*E. coli* F ompT *hdsB*_(r_B-m_B) *gal dcm* (DE3)] transformants were grown, recovered and broken as previously reported (Ortiz-Soto et al., 2008). WT LS and mutants were purified by ion exchange chromatography as described by Meng and Futterer (2003).

Protein determination. Protein concentration was determined by the method of Bradford (Bio-Rad protein assay) using bovine serum albumin (Albumin fraction V, Sigma Chemical, St. Louis, MO) as protein standard.

Enzyme Assay. Initial levansucrase reaction rates were measured by following the reducing power released from 120 g/L of sucrose in pH 6.0, 50 mM sodium phosphate buffer at 37 °C, using the 3,5-dinitro-salicylic acid method (DNS). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme releasing one μ mol of glucose equivalents per min. The measured activity corresponds to the global LS activity, as it includes released reducing sugars both by transfructosylation (glucose) and hydrolysis (fructose and glucose) activities. Hydrolysis and transfructosylation ratios were determined by specific quantification of glucose and fructose.

CLECs[®] preparation. Crystals from WT and R360K/S LS mutants were obtained after 12 days of micro-dialysis of the purified protein (8 g/L) against deionized water. Crystals were cross-linked with 1.5 % of glutaraldehyde in a solution containing 2 M sodium sulfate as precipitant agent and pH 7.0, 50 mM sodium phosphate buffer at 28 °C during 1 h. Afterwards, cross-linked crystals were recovered by centrifugation (4000 rpm) and washed with pH 6.0, 50 mM sodium phosphate.

CLEAs preparation. Cross-linking optimization reactions were carried out in ammonium sulfate precipitated proteins (60 % w/v), pH 7.0, 0.1 M sodium phosphate buffer and 1mg/mL of the purified enzyme, varying glutaraldehyde concentration from 0.2 to 1 % in a total volume of 100 mL; protein concentration was varied from 1 to 6 mg protein/mL and cross-linked with 0.2 % of glutaraldehyde. Enzymes were precipitated during 30 minutes and finally cross-linked during 30 minutes at 15 °C; afterwards the mixture was quenched with 900 μ L of pH 6.0, 50 mM sodium phosphate buffer.

Quenched samples were assayed for enzyme activity before and after centrifugation. The difference between the activity of the cross-linking medium containing both CLEAs and residual free enzyme and the activity of the supernatant obtained after centrifugation, corresponds to the CLEAs activity (Schoevaart et al., 2004).

Reactions using sucrose both as donor and as acceptor were carried out using an enzymatic activity of 0.1 U/mL in a medium containing 120 g/L of sucrose in pH 6.0, 50 mM sodium phosphate at 37 °C.

Immobilization of WT LS and R360K and Y429N mutants onto Eupergit C[®]. One g dry weight of Eupergit C[®] (average particle size distribution 100-200 μ m, approximate pore diameter 0.1-2.5 μ m and specific surface 10-20 m²/g) and 10 or 20 mg of purified enzymes were mixed and shaken for 38 or 72 h respectively at 20 °C at pH 6.0 or 7.0, in 1 M sodium phosphate buffer. The beads were recovered by filtration and washed with pH 6.0, 50 mM sodium phosphate buffer (6 x 10 mL). The recovered Eupergit C[®] derivatives as well as their supernatants were assayed for activity. Unbound protein was also determined by the Bradford method.

Xyloside production. The xyloside synthesis was carried out adjusting enzyme or biocatalysts concentration to obtain 0.5 U/mL activity in reactions containing 120 g/L of sucrose and 120 g/L of xylose at pH 6.0 and 37 °C. Xylose, fructose, glucose and sucrose were quantified by HPLC in a Waters 600E system controller (Waters Corp. Milford, MA) equipped with a refractive index detector (Waters 410), and a Carbohydrate (4.6 x 250 mm) column kept at 35 °C, using acetonitrile/water (75:25) as the mobile phase at 1.2 mL/min.

Assays of biocatalysts stability. 2 mg/mL of purified protein or biocatalysts including Eupergit C[®] derivatives were incubated at 30, 40, 50 and 60 °C in pH 6.0, 50 mM sodium phosphate buffer. Samples were withdrawn after 1 h incubation and assayed for residual activity.

Biocatalyst reutilization. In order to analyze the biocatalyst reutilization (LS-CLEAs and LS-Eupergit C[®]), 1 mL reactions were carried out with a total enzymatic activity of 4 U/mL using WT LS and R360K and Y429N mutants in reactions containing 120 g/L of sucrose and 120 g/L of xylose in pH 6.0, 50 mM sodium phosphate buffer at 37 °C under agitation at 1100 rpm. After 3 h, the reaction medium was centrifuged and the biocatalysts resuspended in fresh reaction mixture to perform another reaction cycle. Sucrose conversion was determined after each batch reaction.

RESULTS AND DISCUSSION

LS CLECs[®] preparation. Four major factors in CLECs[®] development must be taken into account in order to control enzymatic activity in the crystalline state: size of the crystal, size of the substrate, inter-protein free volume and conformation of the enzyme in the crystal (Margolin and Navia, 2001). As the *B. subtilis* LS crystallographic structure is available, it was possible to perform a protein crystalline network analysis in order to analyze the available porous structure for substrate and product diffusion through the crystal lattice. It has been reported that protein crystals represent a distinct and unique class of molecular sieves, with a pore-size ranging from 20 to more than 100 Å in diameter (Vilenchik et al., 1998). Unfortunately, a tightened packing arrangement was observed in WT LS crystals, with almost an absence of solvent channels, which represents a pessimist scenario for biocatalysts, particularly for an enzyme involved in polymer biosynthesis. Figure 1 shows the WT LS ordered arrangement into the crystal as determined from the crystal structures of *B. subtilis* LS (PDB accession code 1OYG) (Meng and Futterer, 2003). In this work, crystallization conditions were slightly modified from the protocol previously reported by (Meng and Futterer, 2003) (see materials and methods), as identical proteins have demonstrated crystalline polymorphism in response to the crystallization conditions employed, leading to different pore size and structure (Vilenchik et al., 1998). Nevertheless, the same space group and practically the same unit cell were found for both, the WT LS crystallized during this work (a=54.48 Å, b=62.25 Å, c=123.42Å) and the LS structure already reported (a=51.11 Å, b=67.01 Å, c=123.68 Å), both therefore having the same enzyme tightened packing. In spite of this closed arrangement of the enzyme molecules in the crystal, some activity resulting from the solvent accessible active sites located in the crystallographic *ac* and *bc* planes was expected. However, the detected activity with WT LS as well as with R360K/S mutants cross-linked crystals assayed with sucrose was negligible, even when attempting fructosylation with xylose as the acceptor molecule. Nevertheless, it was obvious that the enzymes remained active as the crystal structure collapsed after several hours of incubation giving rise to amorphous, larger and non-diffracting structures.

Although other crystallization as well as mutagenesis conditions can be explored in order to modify the crystal space group and packing, it was concluded that cross-linked LS crystals are not a suitable option for the preparation of high specific activity biocatalysts from *B. subtilis* LS and its variants.

LS CLEAs[®] preparation. In order to obtain a constrained but larger protein arrangement allowing substrate and product diffusion and therefore an effective biocatalytic conversion, LS cross-linked aggregates were designed. For this purpose aggregation under several ammonium sulfate, glutaraldehyde and protein concentrations were explored. As shown in Figure 2, the highest activity was obtained in all LS-CLEAs when a protein:glutaraldehyde molar ratio of 1:263 (0.2 % v/v glutaraldehyde) was used. A drastic loss of activity was observed for WT LS and R360K at 0.2 % glutaraldehyde, with a concomitant loss with increasing cross-linker concentration. Interestingly a high glutaraldehyde concentration seems to have no effect on Y429N-CLEAs activity, which retained around 90 % of the soluble enzyme activity. Actually, it was found that the higher the *k_{cat}* and sucrose affinity, the higher the activity loss during aggregation. The reported *k_{cat}*/*K_m* values for soluble WT LS and R360K, R360S and Y429N mutants are 165/8, 170/30, 14/154 and 6/320 s⁻¹/mM respectively (Ortiz-Soto et al., 2008). According to these results it is obvious that WT LS- and R360K/S-CLEAs may undergo diffusional limitations, which could be overcome by reducing particle size as reported for trypsin-CLEAs (Chen et al., 2006), where 90 % of free trypsin activity was recovered after decreasing the biocatalyst size. As shown in Table 2, the highest specific activity was achieved with R360K-CLEAs, followed by WT and Y429N-CLEAs when CLEAs were prepared with 60% ammonium sulfate, 2 % glutaraldehyde and 4 g protein/mL.

In the case of WT- and R360K-CLEAs the recovered activity was low (28 and 33 % respectively) when compared to the soluble enzymes and still far from the theoretical maximum. Nevertheless, the specific activities of the LSs-CLEAs are the highest reported up to now for an immobilized glucosyltransferase (GTF) or FTF, since the amount of glutaraldehyde is insignificant and the resulting CLEAs are basically protein.

LS immobilization on Eupergit C[®]. Immobilization of FTFs and GTFs on various supports as Eupergit[®], hydroxyapatite and alginates has been previously reported either for oligosaccharides or polymer synthesis (Baciu et al., 2005, Gómez de Segura et al., 2004, Chambert and Petit-Glatron, 1993, Berensmeier et al., 2004, Steinberg et al., 2002). In order to evaluate the properties and the operation of biocatalysts obtained by traditional immobilization and carrier-free biocatalysts, WT LS and its mutants

were also immobilized on Eupergit C[®]. Immobilization conditions such as protein concentration, pH and immobilization time were varied for the R360K mutant, which displayed the highest specific activity. More protein was loaded at pH 7.0 than at pH 6.0 after 38 h of immobilization time. In addition, the highest R360K-Eupergit C[®] specific activity was found at a protein/support ratio of 20/1 (mg protein/g support). A summary of the immobilization procedure on Eupergit C[®] and results is shown in Table 3. The biocatalyst specific activity of R360K-CLEAs was the highest here as well as in previous reports for FTFs or GTFs immobilized on this support. Nevertheless, it is of particular interest the remarkable difference between the specific activities of LS biocatalysts prepared using inert supports and those obtained as CLEAs (Tables 2 and 3), the latter being also about 70, 200 and 40-fold higher for WT LS, Y429N and R360K respectively than the corresponding Eupergit C[®] derivatives.

Activity of CLEAs in transfructosylation reactions. CLEAs activity was assayed for both, levan and acceptor reactions performed in the presence of sucrose and sucrose/xylose respectively. As expected, WT-CLEAs activity drastically decreases after a few minutes of reaction when sucrose acts both as donor and acceptor of the fructosyl moiety. It is clear that as the enzyme catalyzes the synthesis of levan, the polymer formed inside the biocatalyst introduces increasing diffusional restrictions as demonstrated by the sudden reduction of sucrose conversion during the reaction (Figure 3a). Although R360K was first reported as a non polymer producing mutant (Chambert and Petit-Glatron, 1991), a slight residual polymer synthesizing activity is retained according to our observations (Ortiz-Soto et al., 2008). It is therefore likely that the low amount of high molecular weight levan synthesized by this mutant is enough to introduce internal diffusional barriers in the biocatalyst after a certain operation time. In the same figure, it is shown that, contrary to the other cases, sucrose conversion by Y429N (a non-levan synthesizing mutant) continued to increase during the course of the experiment.

Seibel et al. (2006) reported that D-xylose was a good acceptor to form β -D-fructofuranosyl- α -D-xylopyranoside when using LS from *B. subtilis* NCIMB 11871. Therefore xylose was chosen as a model molecule for transfructosylation reactions, as we have also observed that transfer onto sucrose (levan production) is nearly avoided when this acceptor is added to the reaction medium (Ortiz-Soto et al., 2008). It was found that unlike levan synthesis reactions, all LSs-CLEAs catalyzed the xyloside production as efficiently as the soluble enzymes. The xyloside production from soluble R360K and WT/R360K/Y429N-CLEAs is shown in Figure 3b. Eupergit C[®] LS derivatives were also able to catalyze the xyloside synthesis as soluble free enzymes (data not shown).

Effect of immobilization on CLEAs and Eupergit C[®]-LSs stability. In order to analyze the thermal stability of CLEAs and compare them to that shown by traditional biocatalysts, residual activity after 1 h incubation without substrate at different temperatures was performed with soluble WT LS and R360K mutant, as well as CLEAs and Eupergit C[®] preparations. Significant differences in stability were not detected between the enzyme derivatives obtained by any of the two immobilization systems, demonstrating that CLEAs display the same thermal stability as covalent LSs immobilized on Eupergit C[®] (Figure 4).

Operational stability of immobilized LSs. The operational stability of WT LS-CLEAs, R360K-CLEAs and Eupergit C[®] biocatalysts was evaluated by measuring sucrose conversion after consecutive 3 h batch-cycles. These results are shown in Figure 5A where it may be observed that after 5 reaction cycles the R360K-CLEAs and Y429N-CLEAs are more stable than WT LS-CLEAs.

The apparent deactivation after each reaction cycle is most probably due to product retention inside the biocatalyst, as demonstrated by the presence of fructose after acid hydrolysis of partially deactivated CLEAs (results not shown). As Y429N-CLEAs was the more stable biocatalyst, it may be concluded that a total inhibition of polymer synthesis is required in order to improve the biocatalyst operational stability. Thus, invertase from baker's yeast was analyzed for the xyloside synthesis; however, neither fructans nor xyloside production was observed.

Although the activity loss in R360K-CLEAs was about 60 % after 10 reaction cycles while Eupergit C[®]-R360K retained about 80 %, it may be observed that the activity loss reduction after each reaction cycle, reaches a nearly constant sucrose conversion in the last 5 cycles, indicating that the residual enzyme is not subject to mass diffusional restrictions and remains stable in subsequent reactions (Figure 5B). A drastic loss of activity can also be observed for WT LS-Eupergit C[®], probably also as a consequence of the accumulation of levan or oligosaccharides after several syntheses. Nevertheless, even considering the R360K-CLEAs activity loss after 10 reaction cycles, the specific activity cycles is still higher than that of the R360K-Eupergit C[®] preparation.

CONCLUSIONS

This is the first report of cross-linked glycosyltransferases aggregates. We have demonstrated that CLEAs are able to catalyze the synthesis of fructosides as efficiently as soluble enzymes and display a thermal stability comparable to covalent immobilized enzymes on inert supports. To our knowledge, the LS-CLEAs specific activity reported here is the highest reported for FTFs and GTFs, and the R360K-Eupergit C[®] specific activity is also the highest compared to other FTFs and GTFs immobilized on this support. These biocatalysts are particularly suitable for fructoside synthesis, here demonstrated for xylose-fructose production. Reduction of particle size as well as alternative cross-linking conditions should be explored in order to further reduce CLEAs diffusional limitations.

ACKNOWLEDGEMENTS.

This project was financed by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, no. 165334 and no. 53115) and by UNAM (PAPIIT No. IN228006-3). We thank Fernando González and Ma. Elena Rodríguez for technical assistance.

REFERENCES

- Baciu, I. E., Jordening, H. J., Seibel, J. and Buchholz, K. (2005) Investigations of the transfructosylation reaction by fructosyltransferase from *B. subtilis* NCIMB 11871 for the synthesis of the sucrose analogue galactosyl-fructoside. *J. Biotechnol.* 116, 347-57.
- Berensmeier, S., Ergezinger, M., Bohnet, M. and Buchholz, K. (2004) Design of immobilised dextranucrase for fluidised bed application. *J. Biotechnol.* 114, 255-267.
- Cao, L., Langen, L. and Sheldon, R. A. (2003) Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 387-394.
- Cao, L., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A. (2000) Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organic. Letters.* 2, 1361-1364.
- Chambert, R., Gonzy-Treboul, G. and Dedonder, R. (1974) Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 41, 285-300.
- 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 (Pt 1), 35-41.
- Chambert, R. and Petit-Glatron, M. F. (1993) Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. *Carbohydrate Research.* 244 129-36.
- Chen, J., Zhang, J., Han, B., Li, Z., Li, J. and Feng, X. (2006) Synthesis of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in CO₂-expanded micellar solutions. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 48, 72-76.
- Das, S. and Rosazza, J. P. N. (2006) Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. *J. Nat. Prod.* 69, 499-508.
- De Roode, B. M., Franssen, M. C., Van Der Padt, A. and Boom, R. M. (2003) Perspectives for the industrial enzymatic production of glycosides. *Biotechnol. Prog.* 19, 1391-1402.
- Gibson, G. R. (1998) Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *Br. J. Nutr.* 80, S209-S212.
- Gómez De Segura, A., Alcalde, M., Yates, M., Rojas-Cervantes, M. L., López-Cortés, N., Ballesteros, A. and Plou, F. J. (2004) Immobilization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on Eupergit C supports. *Biotechnol. Prog.* 20, 1414-1420.
- Kim, K. H., Chung, C. B., Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S. and Kim, C. H. (2005) Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J. Cosm. Sci.* 56, 395-406.
- Kim, M. G., Kim, C. H., Lee, J. S., Song, K. B. and Rhee, S. K. (2000) Synthesis of methyl β-D-fructoside catalyzed by levansucrase from *Rahnella aquatilis*. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 646-651.
- Lagaert, S., Van Campenhout, S., Pollet, A., Bourgois, T. M., Delcour, J. A., Courtin, C. M. and Volckaert, G. (2007) Recombinant expression and characterization of a reducing-end xylose-releasing exo-oligoxyranase from *Bifidobacterium adolescentis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 16, 5374-5377.
- Margolin, A. L. (1996) Novel crystalline catalysts. *Trends Biotechnol.* 14, 219-259.
- Margolin, A. L. and Navia, M. A. (2001) Protein crystals as novel catalytic materials. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40, 2204-2222.
- Meng, G. and Futterer, K. (2003) Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat. Struct. Biol.* 10, 935-41.

- Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñera, E., Olvera, C. and López-Munguía, A. (2008) Selected mutations in bacillus subtilis levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Eng Des Sel.* doi:10.1093/protein/gzn036.
- Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P. G., Van Rantwijk, F., Van Der Wielen, L. A. M. and R.A., S. (2004) Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol. Bioeng.* 87, 754-762.
- Seibel, J., Moraru, R., Gotze, S., Buchholz, K., Na'amnieh, S., Pawlowski, A. and Hecht, H. J. (2006) Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of Bacillus subtilis fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydrate Research.* 341, 2335-2349.
- Sheldon, R. A. (2007) Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1583-1587.
- Steinberg, D., Rozen, R., Bromshteym, M., Zaks, B., Gedalia, I. and Bachrach, G. (2002) Regulation of fructosyltransferase activity by carbohydrates, in solution and immobilized on hydroxyapatite surfaces. *Carbohydr. Res.* 337, 701-10.
- Vilenchik, L. Z., Griffith, J. P., St. Clair, N., Navia, M. A. and Margolin, A. L. (1998) Protein Crystals as Novel Microporous Materials. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 4290-4294.

LEGENDS OF FIGURES AND ILLUSTRATIONS

Figure 1. The crystalline packing found in *B. subtilis* levansucrase (PDB entry 1oyg, space group P2₁2₁2₁) is characterized by the absence of internal channels. This is clearly visible when crystal planes BC (Panels A and D), AC (Panels D and E) and AB (Panels C and F) are visualized. The density of crystal packing and absence of internal channels is further highlighted when 2fo-fc electron density is shown (Panels D, E and F; map contoured at 1 σ , green).

Figure 2. Effect of glutaraldehyde concentration on the relative activity of CLEAs. ●) WT-CLEAs, ▼) R360K-CLEAs, ◆) R360S-CLEAs and ■) Y429N-CLEAs.

Figure 3. Reaction evolution during levan (A) and xyloside (B) synthesis reaction. ◆) Free R360K, ●) WT-CLEAs, ▼) R360K-CLEAs and ■) Y429N-CLEAs. Close symbols indicate sucrose consumption, while open symbols represent the xyloside synthesis. Reactions for levan and xyloside synthesis were carried out with 0.1 and 0.5 U/mL of enzymatic activity respectively.

Figure 4. Stability of soluble enzymes and biocatalysts at several temperatures. Residual activity was measured after incubation of 2mg/mL of either soluble enzymes or biocatalysts for one hour.

Figure 5. Operational stability of LSS-CLEAs (A) and Eupergit C[®] derivatives (B). ●) WT-CLEAs, ○) WT LS-Eupergit C[®], ▼) R360K-CLEAs, ▽) R360K-Eupergit C[®] and ■) Y429N-CLEAs. Sucrose conversion in reactions containing 4 U/mL of initial enzymatic activity, 120 g/L of sucrose and 120 g/L of xylose was measured after each 3 h batch-reaction cycle. Sucrose conversion after the first cycle was around 81 % (\pm 7.3) for all CLEAs.

TABLES

Table 1. Specific activity and reaction specificity of *B. subtilis* WT LS and selected mutants (Ortiz-Soto et al., 2008).

Enzyme	Specific activity (U/mg protein)	Hydrolysis/transfructosylation ratio ^a	Transfer to xylose (%) ^b	Transfructosylation product ^c
WT LS	160.5 (± 6.0)	52.5/47.5	62.6	Levan with bimodal distribution
R360K	171.2 (± 7.0)	88.3/11.7	57.7	Oligosaccharides and low amounts of high molecular weight levan
R360S	10.1 (± 1.2)	93.0/7.0	32.4	Oligosaccharides
Y429N	1.5 (± 0.9)	97.3/2.7	40.5	Oligosaccharides
Invertase	878.3 (± 6.8)	98.6/1.4	0.0	-

^a Ratio of sucrose hydrolyzed to sucrose used for transfructosylation determined in reactions from 120 g/L sucrose. ^b Percentage of fructose transferred to xylose in reactions containing 120 g/L of sucrose and 120 g/L of xylose as acceptor. ^c Products synthesized in reactions from 120 g/L sucrose.

Table 2. Characterization of Levansucrases-CLEAs.

Enzyme	Aggregation yield ^a (%)	U/mg LS-CLEAs
WT LS	28	44.9
Y429N	80	1.2
R360K	33	56.5

Table 3. Characterization of WT, R360K and Y429N LSs immobilized on Eupergit C[®].

Enzyme	mg LS/g Eupergit C [®] bound	Immobilization yield (%)	U/mg dry weight
WT LS ^a	6.8	59	0.644
Y429N ^a	7.8	55	0.006
R360K ^a	7.1	60	0.735
R360K ^b	9.3	58	0.928
R360K ^c	18.8	51	1.640

^a Immobilization at pH 6.0, during 38 h. ^b Immobilization at pH 7.0, during 38 h. ^c Immobilization at pH 7.0, during 72 h. In all cases 10 mg of enzyme were contacted per g of Eupergit C[®], except for (c), where 20 mg were used.

Figure 1

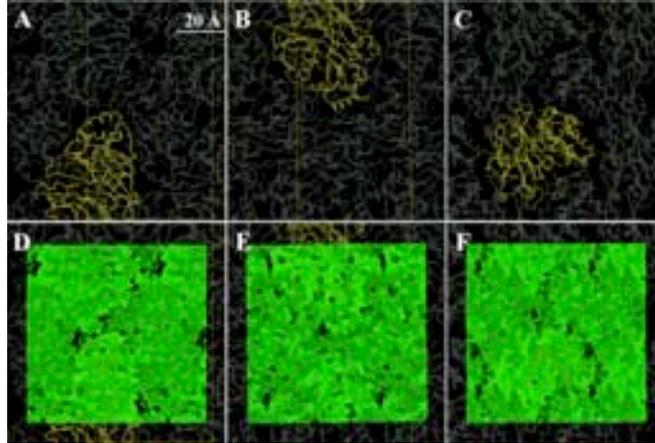


Figure 2

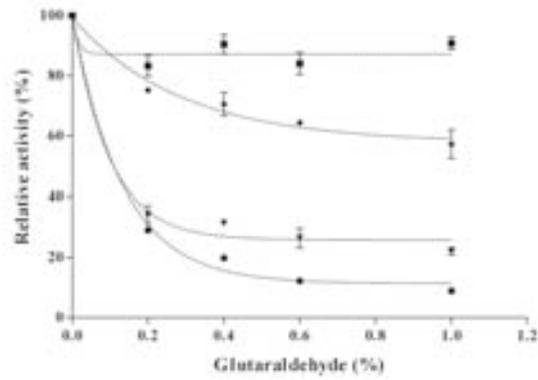


Figure 3

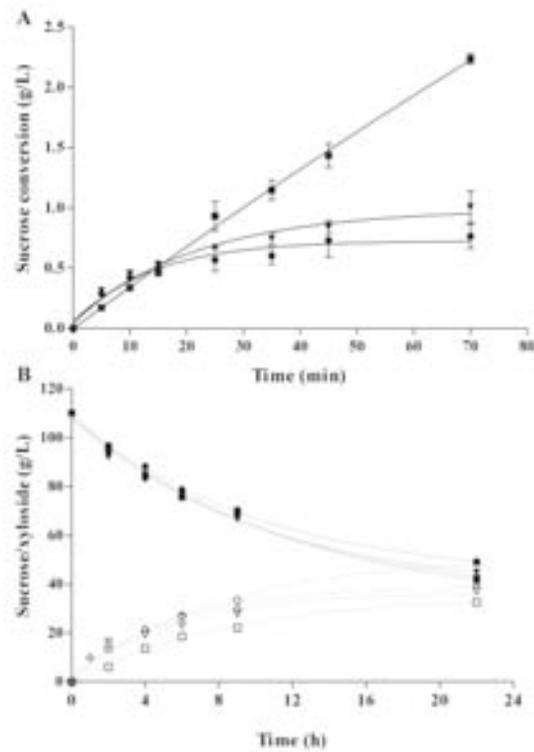


Figure 4

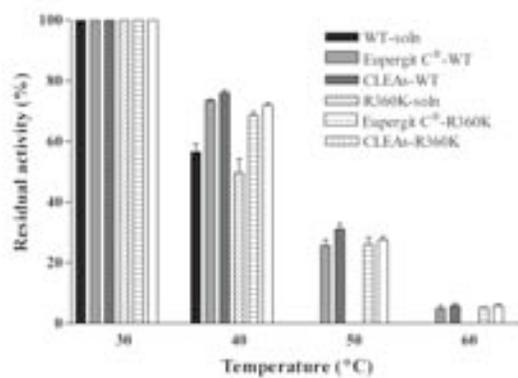


Figure 5

