



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATALISIS**

**AISLAMIENTO Y EXPRESION DEL ADNc QUE CODIFICA PARA LA
SACAROSA:SACAROSA 1-FRUCTOSILTRANSFERASA DE *Agave
tequilana* Weber var. azul Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA
RECOMBINANTE.**

TESIS

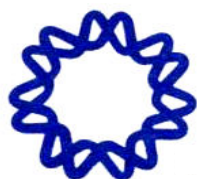
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN
CIENCIAS**

PRESENTA:

Ángela Ávila Fernández

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Agustín López-Munguía Canales

Cuernavaca, Morelos. Marzo 2009.





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 laboratorio de Tecnología enzimática del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante la beca CONACyT no. 181094 y por la UNAM con el proyecto PAPIIT no. IN228006-3.

También agradecemos al proyecto FOMIXMOR-2007-CO1-80360 por el apoyo en la última etapa del desarrollo de este trabajo.

Dedicatoria

A Dios, por iluminar mi camino y alentar mi corazón.

A mis padres, por la dicha de ser su hija, por el apoyo, el amor y los cuidados que me han prodigado siempre, por ser un ejemplo,

A mi hermano, por ser parte importante de mi vida.

A mis abuelos, por todos esos años de paciencia y atención que no tengo como pagarles.

A Pável, por su compañía, su apoyo en las buenas y en las malas y por tantos gratos momentos que hemos vivido juntos.

A mis amigos, por tolerarme y hacerme partícipe de sus vidas, por todos los ratos de alegría, por sus consejos en los momentos difíciles, por estar conmigo a pesar de la distancia.

A mis compañeros de la carrera, por el grato recuerdo de los años que compartimos.

A mis profesores, por contribuir eficazmente a mi formación.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer el ambiente agradable para trabajar.

A Sandra y a Erika, por aquellos tiempos que estuvimos juntas y por la amistad que aún perdura.

A Male, María, Arlete y Anabel, por ser partícipes de la historia de terminar este trabajo, por las constructivas y no tan constructivas charlas, por las comidas, el café, etc.

A todos los que de alguna forma han contribuido a mi formación académica y a mi crecimiento personal.

Agradecimientos

Al Dr. Agustín López por haber asesorado este trabajo, por su compromiso y apoyo durante el proyecto.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Amelia Farrés, Dra. Helena Porta, Dra. Clarita Olvera y Dra. Gladys Cassab, por sus valiosas contribuciones para la realización de este proyecto.

A los integrantes del jurado: Dr. Miguel Lara, Dr. Adelfo Escalante, Dr. Enrique Rudiño y Dr. Jesús Caballero por sus comentarios y aportaciones durante la revisión de esta tesis.

A la Dra. Clarita Olvera y el Dr. Edmundo Castillo, por compartir sus conocimientos y enriquecer de esa forma este trabajo.

A la MC. Rosario Luján, por el apoyo técnico proporcionado para el análisis de la biblioteca de ADNc.

A la MC. María Elena Rodríguez por el apoyo en el desarrollo de las técnicas cromatográficas.

Al Dr. Paul Gaytan, al QI Santiago Becerra, al MC Eugenio López y al Q. Jorge Yáñez por su apoyo en la síntesis de oligonucleótidos y la secuenciación de ADN.

A Fernando González y Aurelia Ocampo por el apoyo técnico.

| ÍNDICE | Página |
|--|---------------|
| Índice de figuras | IV |
| Índice de tablas | VI |
| Abreviaturas | VII |
| Resumen | IX |
| Summary | X |
| | |
| Introducción | 1 |
| | |
| 1. Antecedentes | 3 |
| 1.1 Fructanas y fructooligosacáridos (FOS) | 3 |
| 1.1.1 Definición, distribución y función fisiológica | 3 |
| 1.1.2 Estructuras de las fructanas | 5 |
| 1.1.3 Aplicaciones | 7 |
| 1.2 Fructosiltransferasas | 9 |
| 1.2.1 Bacterianas y fúngicas | 9 |
| 1.2.2 Vegetales | 10 |
| 1.2.3 Estructura y mecanismo de reacción | 11 |
| 1.2.4 Propiedades de las Fructosiltransferasas vegetales. El caso de la 1-SST | 13 |
| 1.2.5 Expresión heteróloga de las FTF vegetales. | 13 |
| 1.2.6 Usos de las fructosiltransferasas | 14 |
| 1.3 Obtención de fructooligosacáridos | 15 |
| 1.4 Agave | 16 |
| 1.4.1 Importancia del cultivo | 16 |
| 1.4.2 Fructanas y fructosiltransferasas de agave | 17 |
| | |
| 2. Hipótesis | 19 |
| | |
| 3. Objetivos | 19 |
| 3.1 General | 19 |
| 3.2 Específicos | 19 |
| | |
| 4. Materiales y métodos | 20 |
| 4.1 Métodos generales de análisis de ADN y ARN | 20 |
| 4.1.1 Análisis de ADN en gel de agarosa | 20 |
| 4.1.2 Análisis de ARN en gel de agarosa | 20 |
| 4.1.3 Ligaciones | 20 |
| 4.1.4 Transformaciones en <i>E. coli</i> | 20 |
| 4.1.5 Transformaciones en <i>P. pastoris</i> | 20 |
| 4.1.6 Reacciones de amplificación (PCR) | 20 |
| 4.1.7 Secuenciación | 21 |
| 4.2 Métodos generales de análisis de proteínas | 21 |
| 4.2.1 Cuantificación de proteína | 21 |
| 4.2.2 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) | 21 |
| 4.2.3 Inmunodetección | 21 |
| 4.3 Obtención de ARN total | 21 |

| | |
|---|----|
| 4.4 Construcción de una biblioteca de ADNc | 22 |
| 4.5 Aislamiento y clonación del ADNc | 22 |
| 4.5.1 RT-PCR y 3'RACE | 22 |
| 4.5.2 Amplificación del extremo 5' | 22 |
| 4.5.3 Clonación de la región codificante completa | 22 |
| 4.5.4 Clonación de MSSTAG en <i>P. pastoris</i> | 23 |
| 4.5.5 Análisis de transformantes | 23 |
| 4.6 Expresión de proteínas en <i>P. pastoris</i> | 23 |
| 4.6.1 Expresión de MSSTAG | 23 |
| 4.6.2 Expresión de pPicZ α C-F2 | 23 |
| 4.7 Análisis de expresión de MSSTAG e identificación de los productos de reacción | 24 |
| 4.8 Obtención del extracto enzimático | 24 |
| 4.8.1 MSSTAG | 24 |
| 4.8.2 pPicZ α C-F2 | 24 |
| 4.9 Fraccionamiento del extracto enzimático mediante filtración en gel | 24 |
| 4.10 Caracterización enzimática de MSSTAG y pPICZ α C-F2 | 25 |
| 4.10.1 Ensayo estándar de actividad | 25 |
| 4.10.1.1 MSSTAG | 25 |
| 4.10.1.2 pPICZ α C-F2 | 25 |
| 4.10.2 Efecto de diferentes parámetros de cultivo | 25 |
| 4.10.3 Efecto de la temperatura y pH | 25 |
| 4.10.4 Estabilidad térmica | 26 |
| 4.10.5 Propiedades cinéticas | 26 |
| 4.10.6 Especificidad | 26 |
| 4.10.7 Ensayo a tiempos largos de reacción | 26 |
| 4.10.8 Reacciones de aceptor | 26 |
| 4.11 Materiales | 26 |
| 4.11.1 Material vegetal | 26 |
| 4.11.2 Oligonucleótidos | 26 |
| 4.11.3 Plásmidos y cepas | 27 |
| 4.11.4 Enzimas y anticuerpos | 27 |
| 4.12 Programas, servidores y bases de datos | 27 |
| 5. Resultados y discusión | |
| 5.1 Aislamiento del ADNc que codifica para la 1-SST de <i>A. tequilana</i> Weber var. azul | 29 |
| 5.2 Análisis de la secuencia de ADNc | 30 |
| 5.3 Modelo tridimensional de SSTAg | 30 |
| 5.4 Expresión de MSSTAG en <i>P. pastoris</i> e identificación de los productos de reacción | 36 |
| 5.5 Efecto de diversos parámetros de cultivo en la producción de MSSTAG en <i>P. pastoris</i> | 38 |
| 5.6 Identificación de la proteína | 39 |
| 5.7 Caracterización bioquímica del extracto enzimático | 40 |
| 5.7.1 Temperatura y pH óptimos y estabilidad a la temperatura | 41 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 5.7.2 | Parámetros cinéticos | 42 |
| 5.7.3 | Especificidad | 42 |
| 5.7.4 | Ensayos a tiempos largos de reacción | 43 |
| 5.7.5 | Ensayos de aceptor con MSSTAG | 44 |
| 5.8 | Expresión de MSSTAG en <i>E. coli</i> . | 45 |
| 5.9 | Expresión y caracterización de la 1-SST de <i>F. arundinacea</i> | 45 |
| | en <i>P. pastoris</i> | |
| 5.9.1 | Producción de la enzima | 45 |
| 5.9.2 | Precipitación de pPicZ α C-F2 a partir del medio de cultivo | 46 |
| 5.9.3 | Temperatura y pH óptimos | 47 |
| 5.9.4 | Reacciones de aceptor | 47 |
| 6. | Conclusiones | 49 |
| 7. | Perspectivas | 50 |
| 8. | Referencias | 51 |
| Anexo | | 58 |
| | Artículo | |

INTRODUCCION

El creciente interés en la producción de FOS y de compuestos glicosilados, por su alta demanda en la industria alimentaria y farmacéutica, ha hecho que se exploren diferentes alternativas para su obtención entre las que destacan el uso de herramientas enzimáticas. En este contexto, nuestro grupo de trabajo estudia desde hace varios años las propiedades de diferentes enzimas con actividad glucosil y fructosiltransferasa, así como su capacidad para glicosilar diferentes sustratos.

En un inicio, estudios bioquímicos fueron enfocados a la búsqueda y a la caracterización bioquímica de enzimas de origen bacteriano con actividad glucosil y fructosiltransferasa, tal es el caso de la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* y la levansacarasa de *Bacillus subtilis*. Por otro lado, a lo largo de los últimos años se ha estudiado el diseño y la optimización de procesos para su aplicación en la síntesis de oligosacáridos, así como su capacidad para llevar a cabo reacciones de aceptor. Con este fin se aislaron enzimas de diversas fuentes incluida la caña de azúcar, el pulque y el pozol.

Desde hace diez años, nuestro grupo incorporó métodos de biología molecular e inició el aislamiento y la caracterización de los genes responsables de la producción de glucosil y fructosiltransferasas con el objetivo de llevar a cabo estudios de estructura-función que nos permitieran comprender los elementos estructurales responsables de la especificidad hacia azúcares, enlaces, actividad hidrolítica y actividad transferasa, así como la capacidad para llevar a cabo reacciones de síntesis de polímeros o de transferencia a aceptores.

Hasta este momento las enzimas de tipo fructosiltransferasa estudiadas se han caracterizado por producir fructanas de cadena larga, por lo que su uso para la producción de FOS implicaría llevar a cabo en una segunda etapa la hidrólisis parcial de las fructanas. Estas enzimas, al ser utilizadas en la glicosilación de otros compuestos pueden producir un perfil de productos de diferente tamaño, es decir, un perfil de productos glicosilados con un número variable de residuos, cuando lo deseable es la síntesis específica de un solo producto.

En la búsqueda de enzimas con una especificidad diferente hacia la producción de FOS o con la capacidad de transferir un solo residuo glicosilo a diferentes aceptores, hemos puesto nuestra atención en la fructosiltransferasa vegetal denominada sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST), ya que este tipo de enzima produce el trisacárido 1-kestosa al transferir de manera predominante un residuo fructosilo de una sacarosa a otra y es probable que esta propiedad pueda

ser utilizada para la glicosilación específica de otros sustratos que actúen como aceptores. Hasta el momento se han aislado algunas enzimas de tipo 1-SST de diferentes especies de plantas, sin embargo, no se ha caracterizado su capacidad para funcionar a altas concentraciones de sacarosa ni para transferir fructosa a sustratos distintos de la sacarosa, pues la mayor parte de los estudios han sido enfocados a comprender la fisiología de síntesis de fructanas en las plantas.

El aislamiento y la caracterización molecular del gen que codifica para la 1-SST de *Agave tequilana* Weber var. azul además de proporcionarnos la materia prima para el desarrollo de este trabajo contribuirá al conocimiento básico de una planta de interés comercial en nuestro país. Por otro lado, su análisis permitirá establecer comparaciones estructurales con otras fructosiltransferasas con el objetivo a futuro de diseñar estudios de relación estructura-función que permitan describir los elementos estructurales que explican la alta especificidad de esta enzima.

Resumen

Se aisló, clonó y caracterizó el ADNc que codifica para una fructosiltransferasa de *Agave tequilana* Weber var. azul. La secuencia nucleotídica con un marco de lectura abierto de 1863 pares de bases codifica para una proteína de 621 aminoácidos con un peso molecular teórico de 69 799 Da. El análisis de la secuencia primaria mostró identidad con diferentes fructosiltransferasas e invertasas de plantas, lo que la clasifica dentro de la familia 32 de las Glicósido Hidrolasas (GH32). También se observó la presencia de un péptido señal de 61 aminoácidos. Con la finalidad de identificar los probables residuos involucrados en el sitio activo se construyó un modelo tridimensional utilizando la fructan 1-exohidrolasa IIa de *Cichorium intybus* (código PDB 1st8) como templado, lo que mostró entre otras cosas la presencia de un puente disulfuro en la enzima. La proteína heteróloga (MSSTAG) expresada en *Pichia pastoris* y secretada al medio de cultivo con un peso molecular aproximado de 100 kDa exhibe las propiedades típicas de las enzimas vegetales de tipo sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST), ya que en presencia de sacarosa produce en forma mayoritaria 1-kestosa, tiene una ligera actividad fructan exohidrolasa sobre la 1-kestosa y produce una baja concentración de nistosa. La enzima tiene una temperatura óptima de entre 25 y 30°C y un pH óptimo de 5.5 y al analizar la influencia de la concentración de sacarosa sobre la velocidad de reacción no se observó saturación por sustrato. El consumo de sacarosa estudiado a lo largo del tiempo en reacciones con 36 g/L de sacarosa mostró un decremento considerable en la velocidad de reacción después del 80% de conversión cuando es alcanzada la máxima producción de FOS; a partir de ese momento la 1-kestosa comienza a ser principalmente hidrolizada. Se analizó la capacidad de MSSTAG, así como de la 1-SST de *Festuca arundinacea* para llevar a cabo reacciones de fructosilación a moléculas aceptoras, demostrando la alta especificidad que las enzimas de tipo 1-SST tienen hacia la producción de 1-kestosa y su poca afinidad por moléculas como la xilosa y la maltosa para ser utilizadas como aceptoras en la formación de otros productos.

Summary

A full-length cDNA encoding for 1-SST in *Agave tequilana* Weber var. azul was isolated, cloned and expressed in *Pichia pastoris*. The nucleotide sequence with an ORF of 1863 base pairs encodes for a 621 amino acids protein with a theoretical molecular mass of 69 799 Da. Based on sequence analysis we found a 61 amino acids putative signal peptide and identity with plant fructosyltransferases and invertases, classified into the Glycoside Hydrolases family 32 (GH32). In order to identify the probable residues involved in the active site, a three-dimensional model was built using the Fructan 1-exohydrolase IIa from *Cichorium intybus* (PDB entry 1st8) as template. Among other structural features the model shows the existence of a disulphide bridge in the enzyme. The heterologous protein (MSSTAG) expressed in *Pichia pastoris* and secreted into the culture medium, with a molecular mass of around 100 kDa, shows the typical sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) properties: high specificity towards 1-kestose synthesis and low nystose production using sucrose as substrate as well as low fructan exohydrolase activity towards 1-kestose. The enzyme has an optimum pH and temperature of 5.5 and 25-30°C, respectively. When analyzing the influence of sucrose concentration on enzymatic activity MSSTAG did not exhibit a substrate saturation behaviour. Sucrose consumption studied in a long term reaction in a 36 g/L initial concentration reaction showed that the reaction rate decreases considerably after 80% conversion, when a maximum FOS production is reached and 1-kestose begins to be consumed. Acceptor reactions carried out with MSSTAG and the *Festuca arundinacea* 1-SST also produced in *P. pastoris* corroborated the high specificity of 1-SST enzymes to use sucrose to produce 1-kestose and its poor affinity towards xilose and maltose as acceptor molecules to produce another kind of oligosaccharides.

1. Antecedentes

1.1 Fructanas y fructooligosacáridos (FOS).

1.1.1 Definición, distribución y función fisiológica.

Las fructanas son polímeros compuestos por unidades de fructosa unidas mediante enlaces de tipo $\beta(2-1)$ llamados de manera general inulinas o por enlaces de tipo $\beta(2-6)$ denominados levanas. Normalmente tienen una unidad de glucosa en el extremo, por lo que pueden ser consideradas como moléculas de sacarosa que han sido extendidas mediante la adición de unidades de fructosa. Las fructanas de cadena corta con un grado de polimerización (DP) menor a 10 son comúnmente llamadas fructooligosacáridos (FOS). Las fructanas están ampliamente distribuidas en la naturaleza; están presentes en algunos géneros de bacterias, hongos, algas y plantas [1] donde cumplen diferentes funciones.

La síntesis de fructanas ha sido ampliamente reportada en bacterias gram positivas, entre ellas las ácido lácticas *Leuconostoc mesenteroides* [2], *Lactobacillus reuteri* [3] y *Streptococcus mutans* [4], así como en algunas especies del género *Bacillus*, como son: *B. subtilis* [5] y *B. licheniformis* [6]. De igual forma, están presentes en bacterias gram-negativas, como son: *Zymomonas mobilis* [7], *Gluconacetobacter diazotrophicus* [8] y algunas especies del género *Pseudomonas* [9]. Las fructanas bacterianas pueden estar constituidas por más de 10 000 unidades de fructosa, y se ha postulado que están involucradas en una gran variedad de procesos, como son: la supervivencia de las bacterias en el suelo, la fitopatogenicidad y la simbiosis [10]. La presencia de polisacáridos extracelulares (EPSs) es necesaria para que algunos patógenos de plantas causen síntomas de daño como es el caso del marchitamiento. Además, existe evidencia de que la acumulación de EPSs y polisacáridos asociados a células promueven la colonización y aumentan la supervivencia de algunas bacterias dentro del tejido huésped [11]. En el caso de *Paenibacillus polymyxa* la levana está involucrada en la agregación del suelo alrededor de las raíces de trigo, lo que resulta un factor importante para el crecimiento y nutrición de las plantas [12]. También se ha reportado que en *S. mutans*, un organismo que se aloja en la cavidad bucal, la habilidad de producir inulina le permite capturar una gran cantidad de sacarosa de la dieta humana y convertirla en un polisacárido de reserva extracelular el cual puede ser catabolizado y aprovechado por el microorganismo cuando las fuentes exógenas de carbohidratos escasean [13]. Asimismo, la producción de levana por *Actinomyces naeslundii*, otro microorganismo oral, se ha asociado a la virulencia del microorganismo, ya que estos polisacáridos pueden desencadenar la respuesta

inflamatoria y estimular la proliferación de las células B [14]. Debido a que las levanas provocan una alta viscosidad en soluciones acuosas se presume como una de sus funciones el proteger a las células de la desecación y permitirles la adherencia a superficies [15]. Por otro lado, la presencia de FOS en la cianobacteria *Anabaena sp*, ha sido asociada al estrés salino [16].

En hongos, hay evidencia de la síntesis de fructanas de tipo inulina en especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* [1], en algunas de las cuales se han encontrado fructanas de bajo peso molecular, tal es el caso de *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Aureobasidium pullulans* [1, 15, 17] mientras que en otros se han reportado fructanas de alto peso molecular, como el polímero de *Penicillium chrysogenum* [18] con un peso aproximado de 217,000 Da y el de *Aspergillus sydowii* IAM 2544 cuyos conidios producen en presencia de sacarosa un polímero de 30×10^6 Da, tamaño comparable al de las levanas bacterianas [15, 19]. Cabe destacar que el micelio liofilizado y rehidratado de *A. sydowii* IAM 2544 produce una mezcla de oligosacáridos con un DP entre 3 y 13 y no produce fructana de alto peso molecular, sin embargo, no es claro si esta discrepancia se debe al uso de diferentes tejidos [15]. A pesar de que existen abundantes reportes relacionados con las enzimas que producen fructanas en los hongos, aún no se conoce cual es su función fisiológica en estos organismos.

Por otro lado, también se ha reportado la presencia de fructanas en algunos géneros de algas verdes como son: *Dasycladus*, *Cymopolia*, *Batophora*, *Acetabularia*, *Cladophora* y *Rhizoclonium* [1], en las cuales podrían constituir una reserva de carbohidratos, aunque al igual que en los hongos su función fisiológica no ha sido estudiada.

En el caso de las plantas, las fructanas están presentes en aproximadamente el 15% de las plantas que producen flores, es decir, alrededor de unas 40,000 especies [1]. Entre las plantas que acumulan fructanas hay muchos cultivos de interés agroindustrial como son algunos pastos para forraje (*Lolium* y *Festuca*), diferentes cereales (trigo, avena, cebada), hortalizas (achicoria, cebolla, lechuga), plantas ornamentales (dalia, tulipán) así como el agave, utilizado para producir bebidas destiladas en México. Las fructanas vegetales son sintetizadas y almacenadas en las vacuolas en órganos especializados como la raíz principal de la planta de achicoria, los tubérculos de dalia y los bulbos del tulipán y la cebolla. Tienen un tamaño mucho menor al de las fructanas bacterianas, ya que alcanzan un máximo de 200 unidades de fructosa. Al igual que el almidón, las fructanas sirven a las plantas como reserva de carbohidratos y podrían estar controlando la concentración de sacarosa en la vacuola y la célula [20]. Se ha observado que en algunos casos las plantas almacenan tanto almidón como fructanas [21], por lo que se piensa que las fructanas

podrían estar proporcionando alguna ventaja adicional a estas plantas. Algunos reportes demuestran que las fructanas son utilizadas para el crecimiento de las hojas después de la defoliación y para promover la germinación así como la expansión de las flores [22]. Por otro lado, las plantas que sintetizan fructanas tienen mayor resistencia a varios tipos de estrés. Su función se ha asociado a la osmoprotección y crioprotección en periodos de sequía, frío y salinidad mediante el control de la presión osmótica dentro de la célula, lo que evita la pérdida de agua en temporada de sequía y el congelamiento en temporada de frío. El mecanismo molecular por el cual se incrementa la resistencia a estos tipos de estrés no es claro pero se propone que las fructanas pueden prevenir el daño a las membranas, el cual es una amenaza para la integridad celular [20, 22]. Ensayos de interacción entre monocapas lipídicas e inulina de achicoria y dalia, sugieren que las fructanas juegan un papel importante en la estabilización de las membranas durante el congelamiento y la desecación [23], se cree que las fructanas protegen la bicapa lipídica y de esta forma previenen el daño a las membranas celulares.

1.1.2 Estructura de las fructanas.

Como hemos mencionado, existen 2 tipos principales de fructanas que se distinguen por el tipo de enlace que une las fructosas: la inulina, en la cual las fructosas están unidas mediante enlaces de tipo $\beta(2-1)$ y la levana, cuyos enlaces son de tipo $\beta(2-6)$.

En el caso de las bacterias, tanto levana como inulina son estructuras en mayor o menor grado ramificadas que pueden llegar a tener muy altos pesos moleculares ($20-100 \times 10^6$ Da). En la inulina, las ramificaciones se presentan mediante enlaces tipo $\beta(2-6)$ mientras que en la levana el enlace de las ramificaciones es de tipo $\beta(2-1)$.

Por otro lado, en plantas se han observado estructuras más complejas, por lo que las fructanas vegetales se han clasificado en 5 grupos (Figura 1):

- 1) *Inulina*, molécula lineal con enlaces de tipo $\beta(2-1)$ entre las fructosas, siendo la 1-kestosa la más pequeña del grupo.
- 2) *Levana o fleina*, molécula lineal con enlaces de tipo $\beta(2-6)$ entre las fructosas, la más pequeña se denomina 6-kestosa.
- 3) *Neoserie de inulina*, molécula con enlaces de tipo $\beta(2-1)$ que consta de 2 cadenas de fructosa, una unida a la fructosa de la sacarosa inicial y otra unida al C6 de la molécula de glucosa que forma la

sacarosa. El trisacárido a partir del cual se elongan las cadenas de fructosa se conoce como neo-kestosa.

4) *Neoserie de levana*, molécula con enlaces de tipo $\beta(2-6)$ que consta de 2 cadenas de fructosa, una unida a la fructosa de la sacarosa inicial y otra unida al C6 de la molécula de glucosa que forma la sacarosa. Al igual que en las neo-series de inulina el trisacárido neo-kestosa da origen a este grupo.

5) *Fructana mezclada o graminana*, molécula formada por enlaces de tipo $\beta(2-6)$ con ramificaciones elongadas en $\beta(2-1)$, aunque pueden ser mas complejas e incluir estructuras en las cuales se combinen neo-azúcares con cadenas ramificadas de fructana. La unidad más pequeña del grupo es la bifurcosa.



Figura 1. Estructura de diferentes tipos de fructanas vegetales. 1)Inulina, 2)Levana, 3)Neoserie de inulina, 4) Neoserie de levana, 5) Fructana mezclada. Se muestran las enzimas que forman cada enlace y sombreados los trisacaridos y el tetrasacárido que son la base de la serie. 1) 1-kestosa, 2) 6-kestosa, 3 y 4) Neo-kestosa, 5) Bifurcosa. Modificado de Ritsema y cols. 2003 [22].

1.1.3 Aplicaciones.

Las fructanas de origen vegetal han formado parte de la dieta humana incluso antes de que comenzaran a ser estudiadas, dada su presencia en numerosas plantas comestibles, entre ellas la cebolla, la lechuga, el puerro, los cereales, el ajo y algunas frutas (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de fructanas en plantas comestibles [24].

| Fuente | Contenido de inulina (% peso fresco) |
|------------------------|---|
| Cebolla | 1.1 - 7.5 |
| Alcachofa de Jerusalén | 17.0 - 20.5 |
| Achicoria | 15.2 - 20.5 |
| Puerro | 2.9 - 10 |
| Ajo | 12.98 |
| Plátano | 0.3 - 0.7 |
| Centeno | 0.6 |
| Cebada | 1.1 |
| Agave | 26* |

*Calculado de Waleckx y cols. 2008 [25].

Por el tipo de enlace glicosídico que une a las fructosas que forman a las fructanas estas no pueden ser hidrolizadas en el tracto digestivo, por lo que son consideradas como fibra soluble y al llegar al colon solo algunas bacterias pueden aprovecharlas (Figura 2) [26]. Así, las fructanas son consideradas prebióticos por ser ingredientes alimenticios no digeribles que provocan la modificación en la composición de la microflora del colon, estimulando de forma selectiva el crecimiento de bifidobacterias y bacterias lácticas y en consecuencia reduciendo el crecimiento de bacterias patógenas, lo que ocasiona efectos benéficos para el hospedero [26]. Se ha comprobado que las fructanas estimulan la función inmunológica y la síntesis de ciertas vitaminas, contribuyen a reducir el desarrollo de trastornos digestivos, mejoran el tránsito intestinal y disminuyen los niveles séricos de fosfolípidos y triglicéridos [20, 27-29]. Su capacidad para disminuir el colesterol [30], así como su efecto sobre la absorción de calcio y la mineralización de los huesos [31] ha sido demostrada. Por otro lado, los productos de fermentación derivados de la inulina enriquecida con oligofructosa modulan favorablemente la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de xenobióticos en las células primarias del colon humano [32]. También se ha observado que uno de los mayores efectos fisiológicos de los FOS es la inmunomodulación intestinal y es por ello que se han identificado mediante microarreglos algunos genes marcadores de los efectos fisiológicos de los FOS en el intestino delgado [33]. Por

todo lo anterior, las fructanas al igual que los FOS son utilizados ampliamente en el desarrollo de alimentos funcionales.

El grado de polimerización confiere a las fructanas diferentes propiedades físicas y químicas que son aprovechadas por la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica.

Las levanas pueden ser utilizadas como goma industrial, como sustituto de plasma sanguíneo y como edulcorante. También se han propuesto otras aplicaciones potenciales como emulsificante, estabilizante, espesante, agente encapsulante y acarreador de sabores y fragancias. Sin embargo, el uso de levana ha sido limitado por la carencia de procesos factibles de producción a escala industrial [34]. Por otro lado, se ha propuesto que la producción de levana a partir de *B. licheniformis* podría ser útil como sellador biológico de suelos altamente permeables, reduciendo considerablemente la conductividad hidráulica [6].

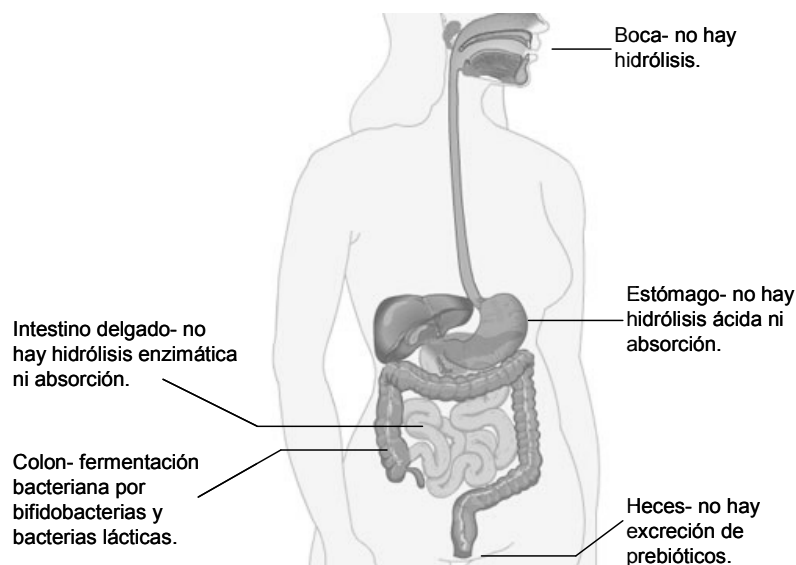


Figura 2. Comportamiento de la inulina y la oligofructosa, como prebióticos, en el tracto digestivo [27].

La inulina de achicoria es utilizada como sustituto de grasas, ya que forma un gel con el agua que tiene textura similar a la de las grasas pero con mucho menor valor calórico, proporciona estabilidad a las emulsiones y es útil en la preparación de postres como helados, jaleas y yogurt, así como productos de panadería (galletas, panes, pastas) [28, 35].

Los FOS son utilizados como edulcorantes de bajo índice glucémico en el desarrollo de alimentos funcionales, ya que proporcionan baja dulzura (aproximadamente 1/3 comparada con la sacarosa), bajo aporte energético, no son cariogénicos, son altamente solubles y sus propiedades tecnológicas están estrechamente relacionadas con las del azúcar y las de los jarabes

de glucosa, además de que son estables y de fácil manejo [35]. Frecuentemente son utilizados junto con intensificadores de dulzura como aspartame o acesulfame K ya que proveen un sabor sostenido, reducen el resabio amargo, mejoran la estabilidad y ejercen sinergismo del poder edulcorante en estas mezclas [35].

Dentro de los FOS, la 1-kestosa y la nistosa (DP 3 y 4) han demostrado tener la mayor actividad prebiótica [36]. Su dulzura relativa comparada con la de una solución de sacarosa al 10% es del 31% para la 1-kestosa y del 22% para la 1-nistosa, lo que los hace muy atractivos en el desarrollo de productos para diabéticos.

Por sus propiedades, la demanda de FOS para el desarrollo de alimentos funcionales va en aumento, lo que ha estimulado el interés por buscar formas alternativas para la producción selectiva de estos compuestos.

1.2 Fructosiltransferasas.

1.2.1 Bacterianas y fúngicas.

Las fructanas son producidas por enzimas denominadas fructosiltransferasas (FTF), las cuales catalizan la transferencia del residuo fructosilo de una molécula de sacarosa a otra o a una cadena de fructosa en crecimiento.

En bacterias una sola FTF es capaz de producir fructanas de cadena larga ramificadas generando tanto enlaces de tipo $\beta(2-1)$ como $\beta(2-6)$. Aquellas que producen inulina son llamadas inulosacarasas y las que producen levana se denominan levansacarasas. En general su peso molecular oscila entre los 45 y 75 kDa, aunque algunas del género *Leuconostoc* pueden llegar a pesar hasta 170 kDa [37]. Se ha detectado la presencia de FOS en las reacciones de producción de polímero llevadas a cabo con FTF bacterianas, aunque generalmente son utilizados como iniciadores en la formación de cadenas mas largas y es por ello que no se acumulan durante la reacción [38]. Las FTF que producen FOS en bacterias son muy raras por lo que destaca la enzima aislada de *Bacillus macerans* que produce FOS con un DP de 6 y 7 [39].

Al igual que en las bacterias, en los hongos una sola FTF produce las fructanas observadas en cultivos de estos organismos. Sin embargo, dentro de las FTF fúngicas son mas abundantes las enzimas productoras de FOS y han sido ampliamente estudiadas por su potencial aplicación industrial (Tabla 2). El peso de estas enzimas es variable debido a la glicosilación que presentan y a la formación de multímeros. Se ha reportado un peso promedio de 125 kDa para la subunidad

de la FTF de *A. niger* AS0023 [40], de 116.3 kDa para la FTF de *Aspergillus oryzae* CFR 202 [42] y de 51 kDa para la FTF de *A. oryzae* GX0011 [43].

Tabla 2. Rendimiento de FOS obtenido al utilizar FTF de diferentes microorganismos [44].

| Fuente | Sustrato (sacarosa g/L) | Rendimiento (%) |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------|
| <i>Aspergillus niger</i> AS 0023 | 500 | 54 |
| <i>Penicillium citrinum</i> | 700 | 55 |
| <i>Aspergillus japonicus</i> | 400 | 61 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> CFR 202 | 600 | 58 |
| <i>Aerobasidium pullulans</i> CFR 77 | 550 | 60 |
| <i>Bacillus macerans</i> EG-6 | 500 | 33 |
| <i>Zymomonas mobilis</i> | 500-600 | 24-32 |

En general, las enzimas derivadas de microorganismos funcionan bien a altas concentraciones de sustrato (Tabla 2), lo que las hace convenientes para uso industrial ya que las reacciones para la producción de FOS se realizan a concentraciones altas de sacarosa (700-850 g/l) y de esta forma la operación puede conducirse sin riesgo considerable de contaminación [17].

1.2.2 Vegetales.

En el caso de las plantas, la síntesis de fructanas requiere la intervención de varias FTF. La sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST), inicia la síntesis de fructanas catalizando la transferencia del residuo fructosilo de una molécula de sacarosa a otra formando entre las fructosas un enlace de tipo $\beta(2-1)$ y resultando en la formación del trisacárido 1-kestosa [45, 46], la fructana más pequeña de tipo inulina; la fructan:fructan 1-fructosiltransferasa (1-FFT), elonga la cadena de fructosa transfiriendo un residuo fructosilo de una fructana a otra mediante la formación de un enlace de tipo $\beta(2-1)$ [47, 48]; la fructan:fructan 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT), transfiere un residuo fructosilo de una fructana a la glucosa de otra fructana o de una sacarosa formando un enlace de tipo $\beta(2-6)$ [49] y la sacarosa:fructan 6-fructosiltransferasa (6-SFT) cataliza la transferencia del residuo fructosilo de una sacarosa a la fructosa de otra sacarosa o a la de una fructana formando un enlace de tipo $\beta(2-6)$ [50].

Mediante la acción concertada de 2 o más de estas enzimas se producen los diferentes tipos de fructanas (Figura 3). Cabe destacar que algunas de estas enzimas han presentado *in vitro* más de una actividad, sin embargo, las mencionadas anteriormente son las actividades predominantes en cada caso.

En general estas enzimas tienen un tamaño aproximado de 650 aminoácidos. Atendiendo a su estructura primaria el polipéptido presenta un péptido señal, ya que estas enzimas son de localización vacuolar, y está seguido de dos dominios, el dominio N-terminal donde se localizan los residuos catalíticos y el dominio C-terminal cuya función se desconoce. Su peso molecular es de aproximadamente 70 y 80 kDa.

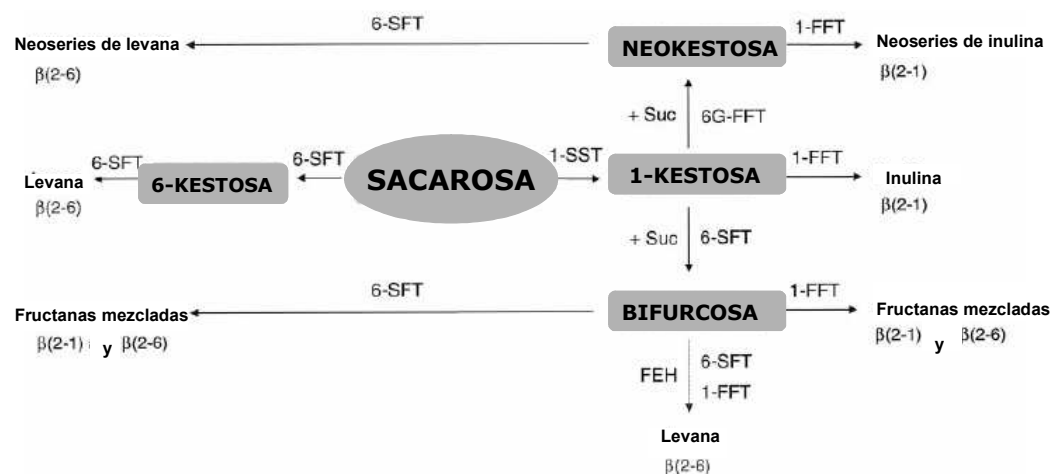


Figura 3. Modelo de la biosíntesis de fructanas en plantas [20].

1.2.3 Estructura y mecanismo de reacción.

De acuerdo a la clasificación de Henrissat y Davies [51] (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>), las fructosiltransferasas de plantas y hongos al igual que las enzimas que hidrolizan fructanas y sacarosa como son: levanasas, inulinasas e invertasas pertenecen a la familia 32 de las glicósido hidrolasas (GH32) [52]. De los miembros de esta familia se conoce la estructura cristalográfica de 4 de ellas; la exoinulinasa de *Aspergillus awamori* (código PDB 1y4w) [53], la invertasa de *Thermotoga maritima* [54], la fructan exohidrolasa (FEH) IIa de *Cichorium intybus* (código PDB 1st8) [55] y la invertasa de pared celular de *Arabidopsis thaliana* (código PDB 2ac1) [56]. Estas enzimas comparten además, identidad estructural con las levansacarasas de *B. subtilis* (código PDB 1oyg) [57] (Figura 4) y de *G. diazotrophicus* (código PDB 1w18) [58], clasificadas en la familia 68 de las glicósido hidrolasas (GH68). Ambas familias, pertenecen al clan GH-J caracterizado por la presencia de 3 residuos ácidos, a los cuales se atribuye la actividad catalítica. Las enzimas de estas familias están constituidas por 2 dominios: el dominio N-terminal con un plegamiento de tipo β -propela de 5 hojas y el dominio C-terminal con plegamiento de tipo β -sandwich. El sitio catalítico localizado en el dominio β -propela está constituido por 2 residuos aspárticos y un residuo

glutámico. Cabe destacar que a excepción de las levansacarasa de *B. subtilis* y *G. diazotrophicus* cuya actividad es la producción de polímero, las demás estructuras pertenecen a enzimas que hidrolizan fructanas o sacarosa.

Se propone que este tipo de enzimas cataliza la reacción de transfructosilación mediante el mecanismo cinético de doble desplazamiento (ping-pong) con retención de la configuración anomérica que fue determinado para la levansacarasa de *B. subtilis* [59, 60] (Figura 4). En una primera etapa, la reacción involucra la escisión del enlace glicosídico de la sacarosa, la liberación del residuo de glucosa y la formación de un complejo intermediario transitorio enzima-fructosilo unido covalentemente. En una segunda etapa, el residuo de fructosa es transferido a una molécula aceptora formando el segundo producto de la reacción y liberándose la enzima. En el caso de las enzimas que hidrolizan fructanas o sacarosa el intermediario enzima-fructosilo es hidrolizado liberándose fructosa y la enzima libre [55].

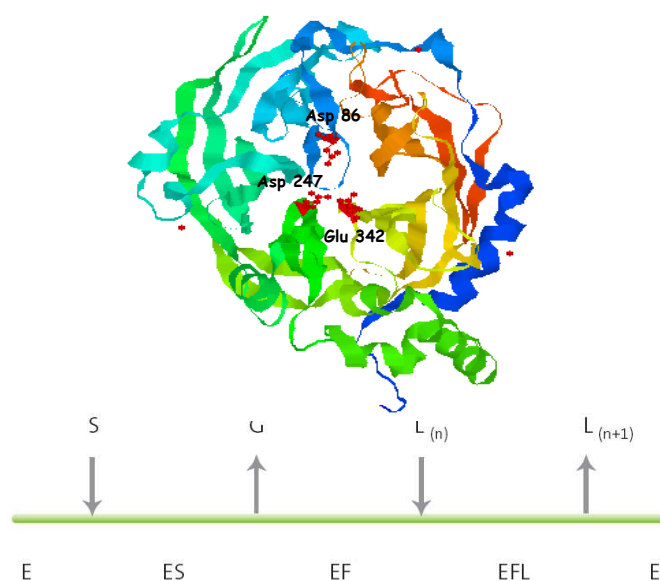


Figura 4. Representación de la estructura tridimensional de la levansacarasa de *B. subtilis* (SACB; código PDB 1oyg), los residuos catalíticos se muestran en rojo. Modelo del mecanismo de reacción de tipo Ping-pong Bi-bi propuesto para SACB en notación de Cleland. S, sacarosa; E, enzima; G, glucosa; L, levana.

Aún con el conocimiento generado con la estructura cristalográfica de dos enzimas que hidrolizan sacarosa, una que produce levana y dos más que hidrolizan inulina no ha sido posible establecer el mecanismo mediante el cual estas enzimas son capaces de producir o degradar polímero, utilizar o no la sacarosa como sustrato, transferir de manera limitada un cierto número

de unidades de fructosa, etc. En el caso de la FEH IIa de *C. intybus*, los autores sugieren la existencia de un sitio de unión a inulina en el canal formado entre ambos dominios [55], pero aún se requiere de más información para corroborar esta hipótesis.

1.2.4 Propiedades de las fructosiltransferasas vegetales. El caso de la 1-SST.

Para el estudio de las FTF vegetales se ha llevado a cabo la purificación de la enzima a partir de diferentes especies de plantas. En algunos casos los extractos resultan en mezclas de enzimas (1-SST y 6G-FFT [46]) difíciles de separar y caracterizar debido a su gran parecido estructural y funcional. Por ello, el aislamiento del ADNc que codifica para este tipo de enzimas y su expresión heteróloga han constituido una alternativa para su producción y caracterización.

La mayor parte de los estudios de las FTF vegetales han sido enfocados a conocer su papel fisiológico y es por ello que poco se conoce sobre las condiciones óptimas de operación de las 1-SST. Para el estudio de sus propiedades son utilizadas en su mayoría a una temperatura entre 25 y 28°C y a un pH alrededor de 5.5. Se han establecido como propiedades típicas de estas enzimas: la alta producción de 1-kestosa (GFF) cuando se emplea sacarosa (GF) como sustrato (Figura 5A), una baja actividad fructan exohidrolasa sobre la 1-kestosa (Figura 5B) y una baja producción de nistosa (GFFF) (Figura 5C). Además, ha sido reportado que estas enzimas no son saturadas por el sustrato [61]. Aunque muchas FTF pueden utilizarse a altas concentraciones de sacarosa [44], en el caso de las FTF vegetales la actividad tiende a estudiarse a bajas concentraciones de sacarosa (50 a 300 mM), por lo que no se ha determinado la viabilidad de estas enzimas para ser utilizadas en procesos industriales de producción de FOS.

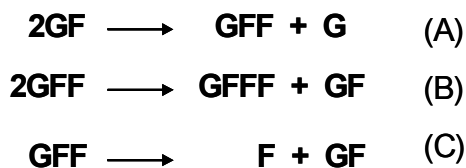


Figura 5. Reacciones típicas llevadas a cabo por las FTF de tipo 1-SST. GF: Sacarosa, GFF: 1-kestosa, G: Glucosa, GFFF: nistosa, F: Fructosa.

1.2.5 Expresión heteróloga de las FTF vegetales.

La levadura *Pichia pastoris* ha sido ampliamente utilizada en la producción de diversas proteínas heterólogas [62]. Debido a que no secreta enzimas que metabolizan sacarosa como es el caso de las invertasas, es idónea para estudiar las enzimas vegetales que utilizan sacarosa como

sustrato. Por otro lado, se cree que la glicosilación realizada por esta levadura es mas cercana a la que realizan las plantas en comparación con la glicosilación que produce *Saccharomyces cerevisiae* [63]. Para la expresión de proteínas en *P. pastoris* se han desarrollado vectores de expresión en los que la proteína de interés es fusionada inmediatamente después del factor α de *S. cerevisiae*, un péptido que provoca que la proteína de interés sea secretada al medio de cultivo.

Utilizando este sistema se ha estudiado la funcionalidad de los ADNc que codifican diversas enzimas involucradas en la biosíntesis de fructanas, lo que ha permitido su caracterización *in vitro*. Hochstrasser en 1998 fue el primero en expresar una FTF vegetal en *P. pastoris*, la 6-SFT de *Hordeum vulgare* [64]. Posteriormente se expresaron otro tipo de FTF vegetales como son: las 1-SST de *Festuca arundinacea* [61], *Triticum aestivum* [65] y *Lolium perenne* [66], la 6-SFT de *T. aestivum* [65], la 1-FFT de *T. aestivum*, *Viguiera discolor* y *Echinops ritro* [48, 67, 68] y la 6G-FFT de *A. officinalis* [69].

Por otro lado, se han utilizado diferentes sistemas vegetales para la expresión heteróloga como son los protoplastos de tabaco y plantas con alto contenido de sacarosa que no acumulan fructanas como la papa y la remolacha, lo que ha permitido corroborar *in vivo* las propiedades atribuidas a estas enzimas, así como entender su rol fisiológico y las posibles ventajas que proporcionan a las plantas [20, 70, 71]. El uso de estos sistemas consume mas tiempo, sin embargo, dada su naturaleza vegetal se espera que las modificaciones postraduccionales sean mas parecidas a aquellas de las enzimas nativas.

1.2.6 Usos de las fructosiltransferasas.

Aunque la mayor parte de las investigaciones con FTF ha sido enfocada a la síntesis de fructanas y FOS y a comprender la fisiología de la biosíntesis de fructanas en las plantas, existen reportes exitosos del uso de estas enzimas en la producción de nuevos oligosacáridos. Tal es el caso de la levansacarasa de *B. subtilis* NCIMB 11871 en la producción del análogo de sacarosa galactosil-fructósido [72] y de la 1-FFT de *Asparagus officinalis* en la producción de dos nuevos tetra y pentasacáridos que han demostrado una capacidad prebiótica similar a la del fructooligosacárido 1-nistosa [73]. En este sentido, las FTF vegetales de tipo 1-SST podrían constituir una alternativa ya que utilizan un sustrato donador disponible (sacarosa) en comparación con las enzimas de tipo 1-FFT (1-kestosa). Sin embargo, hasta el momento se desconoce si estas enzimas son capaces de transferir fructosa a un aceptor diferente de la sacarosa.

Por otro lado, una línea de investigación paralela al estudio de las FTF en nuestro laboratorio es su aplicación para glicosilar compuestos de interés biológico e industrial. En este sentido, la capacidad de las FTF vegetales no ha sido probada en la glicosilación de sustratos diferentes de los azúcares. Se ha estudiado el uso de algunas glucosiltransferasas (dextrantransferasas, alternansacarasa) de *L. mesenteroides* en la glicosilación de análogos de salicina y los derivados glicosilados han demostrado un mayor efecto anticoagulante que la salicina o el alcohol salicílico de los cuales provienen [74]. Sin embargo, la actividad polimerasa de la enzima generó un número variable de productos, ya que el aceptor es glicosilado una vez y después la enzima polimeriza el residuo glicosilo con una cantidad variable de residuos glicosilo. Con la finalidad de contar con un perfil de productos más estrecho, sería interesante probar enzimas que transfieran exclusivamente un residuo glicosilo al aceptor, con el fin de obtener un solo producto glicosilado.

1.3 Obtención de fructooligosacáridos.

Si bien se ha demostrado en animales el efecto inmunoestimulante e hipocolesterolémico de la levana [75, 76], aún siguen siendo las fructanas y los FOS de tipo inulina los que son utilizados en la alimentación humana. Los FOS son producidos por dos métodos: la hidrólisis enzimática parcial de la inulina de la planta de achicoria (utilizando una endoinulinasa) que da como resultado una serie de oligómeros de fructosa de diferentes tamaños (Figura 6A) [35] y la síntesis enzimática a partir de la sacarosa llevada a cabo con fructosiltransferasas de origen fúngico, principalmente del género *Aspergillus* (Figura 6B) [17, 44].

Para la síntesis de FOS a partir de sacarosa se utilizan enzimas termoestables (entre 50 y 60°C) que permiten que la reacción se lleve a cabo a altas temperaturas, favoreciendo la solubilización de altas concentraciones de sacarosa en el medio de reacción. Durante la reacción se acumula glucosa en el medio, la cual actúa como inhibidor competitivo limitando la conversión entre un 55 y 60% [41].

El creciente interés por el uso de estos compuestos en la formulación de alimentos funcionales ha motivado la búsqueda de nuevas enzimas capaces de sintetizar FOS, especialmente aquellos con menor DP como son el caso de la 1-kestosa y la nistosa, por las ventajas que estos representan (Ver 1.1.3). De esta forma, la producción selectiva de estos

compuestos en un sistema que utilice FTF vegetales de tipo 1-SST y sacarosa como sustrato podría ser ventajoso con respecto a procesos no específicos tales como la hidrólisis de la inulina.

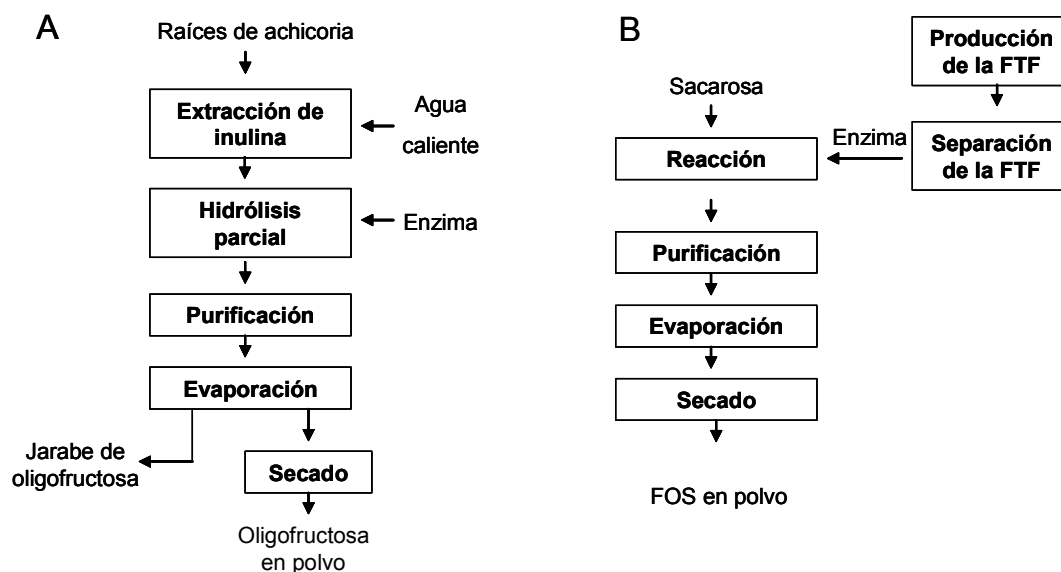


Figura 6. Proceso industrial de producción de oligofruktosa de achicoria (A) [35]. Producción de FOS mediante el uso de FTF (B).

1.4 Agave

1.4.1 Importancia del cultivo

Entre las plantas industrialmente importantes debido a su alto contenido de fructanas, la achicoria (*C. intybus*) y la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*) han sido las más estudiadas. En nuestro país, el agave es una planta particularmente importante ya que numerosas bebidas destiladas son obtenidas a partir de una amplia variedad de especies. En el agave las fructanas se encuentran almacenadas en la base del tallo lo que se conoce comúnmente como la piña (Figura 7) y constituyen aproximadamente el 25% de su peso (Tabla 1) [25].

En el proceso de elaboración de bebidas, las fructanas contenidas en la piña de agave son hidrolizadas y con los mostos obtenidos se lleva a cabo la fermentación y la destilación [77]. Entre estas bebidas, el *tequila* ha tenido gran aceptación internacional incluso antes de obtener la certificación de origen otorgada por la WIPO (World Intellectual Property Organization) en 1978. El *tequila* es producido a partir del jugo de *Agave tequilana* Weber var. azul, sin embargo, bebidas como *mezcal*, *bacanora* y *raicilla* son obtenidas de otras especies de agaves.

Aunque la fructosa proveniente de las fructanas de agave ha sido tradicionalmente utilizada como sustrato para fermentación, recientemente ha proliferado su comercialización en forma de jarabe de fructosa [78].

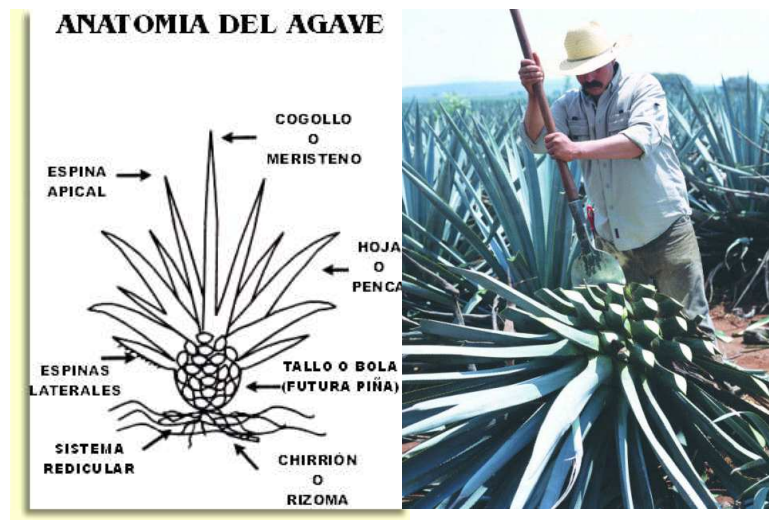


Figura 7. Anatomía del agave y proceso de remoción de las hojas de alrededor de la piña (jima). Tomado de www.acamextequila.com.mx y www.omni-bus.com/n7/agave/15.jpg

1.4.2 Fructanas y fructosiltransferasas de agave

Las fructanas presentes en *A. tequilana* están formadas por enlaces de tipo $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$ y son polímeros ramificados con un grado de polimerización (DP) entre 3 y 29 [79]. De acuerdo con su estructura, estas fructanas pueden clasificarse dentro del grupo de las fructanas mezcladas. Un estudio reciente, muestra que las fructanas contenidas en el agave son una mezcla de neo-fructanas (agavinas) por la presencia de una glucosa interna en su estructura y graminanas donde la glucosa terminal está libre (Figura 8) [80]. En el caso del agave, es probable que las fructanas estén contribuyendo a que la planta pueda desarrollarse en ambientes secos además de ser una importante reserva de carbohidratos.

Por la estructura de las fructanas de agave se puede inferir la presencia de al menos 3 tipos diferentes de fructosiltransferasas, la 1-SST, la 6G-FFT y la 6-SFT. Hasta el momento no se han reportado los genes que codifican para estas enzimas; sin embargo, existen algunos reportes que describen las propiedades de FTF purificadas a partir de piñas de agave, tal es el caso de la FTF de *Agave veracruz* que se caracteriza por producir principalmente 1-kestosa y cuyas condiciones óptimas de operación son 37°C y pH 5.5. También se observó que esta enzima es capaz de

transferir fructosa a la xilosa [81]. Por otro lado, la FTF de *Agave americana* produce oligosacáridos a partir de la sacarosa que pueden llegar a tener 10 unidades de fructosa, su temperatura y pH óptimos son 37°C y 5.5 y puede transferir fructosa a ribosa, manosa, xilosa y arabinosa [82].

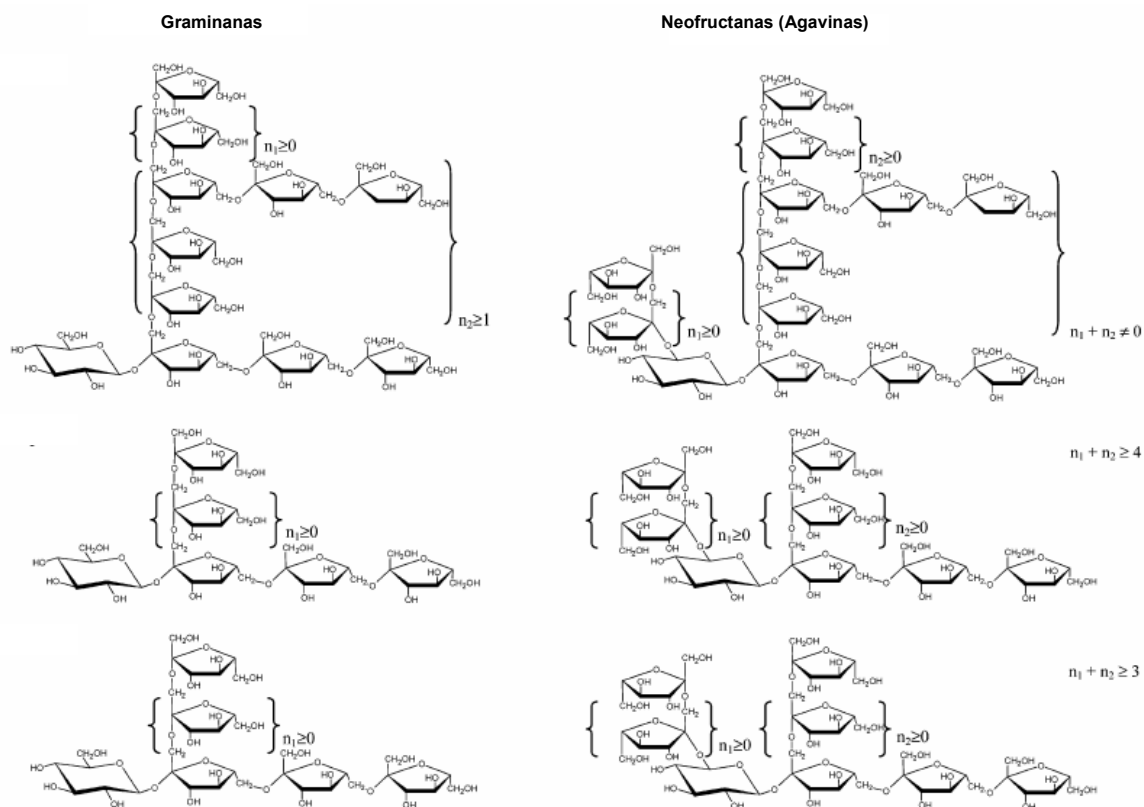


Figura 8. Estructuras propuestas para las fructanas de agave [80].

2. Hipótesis

La 1-SST recombinante de *A. tequilana* Weber var. azul puede ser utilizada bajo las condiciones generales de elaboración industrial de FOS produciendo de manera preferencial 1-kestosa. Por otro lado, la especificidad de la enzima para transferir preferentemente un residuo de fructosa puede ser utilizada para glicosilar aceptores diferentes a la sacarosa con un solo residuo fructosilo.

3. Objetivos

3.1 General

Obtener la sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa de *A. tequilana* Weber var. azul recombinante, caracterizarla y estudiar su capacidad para fructosilar diferentes aceptores.

3.2 Específicos

- Aislar el ADNc que codifica para la 1-SST de *A. tequilana* Weber var. azul.
- Realizar la caracterización molecular de la enzima y compararla con otras fructosiltransferasas.
- Producir la enzima en el sistema de expresión heterólogo *P. pastoris*.
- Determinar las propiedades bioquímicas y estudiar el comportamiento catalítico de la enzima.
- Estudiar la capacidad de la enzima para fructosilar diferentes aceptores.

4. Materiales y métodos.

4.1 Métodos generales de análisis de ADN y ARN.

4.1.1 Análisis de ADN en gel de agarosa. Se prepararon geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 0.5X. Se mezclaron entre 1-5 μ l de las soluciones que contenían ADN con 2 μ l del amortiguador de carga y posteriormente se colocaron en los pozos del gel. La electroforesis se desarrolló en amortiguador TAE 0.5X a 100 mV durante 40 minutos. Los geles se tiñeron en solución de bromuro de etidio 0.02% durante 30 segundos y se destiñeron en agua durante 20 minutos.

4.1.2 Análisis de ARN en gel de agarosa. Se prepararon geles de agarosa al 1% en amortiguador MOPS 1X con formaldehído 0.7M. Se mezcló 1 μ l de la muestra con 1 μ l de agua y 2 μ l de 2X Loading Dye Solution for RNA electrophoresis (Fermentas). La mezcla se desnaturizó durante 5 minutos a 94°C y la electroforesis se desarrolló a 40 mV durante 40 minutos. El gel se destiñó en agua durante 20 minutos.

4.1.3 Ligaciones. Las ligaciones se realizaron con la enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando una relación inserto:vector 5:1 e incubando la ligación a 16°C durante 16 horas.

4.1.4 Transformaciones en *E. coli*. Las transformaciones se llevaron a cabo con 10 μ l de la ligación o con 0.5 μ l de plásmido superenrollado en células DH5 α electrocompetentes. Estas se recuperaron en 500 μ l de medio SOC durante 1 hora a 37°C y se seleccionaron en placas de LB con ampicilina 100 μ g/mL.

4.1.5 Transformaciones en *P. pastoris*. Se mezclaron 5 μ g del plásmido linearizado con 50 μ l de células X-33 químicocompetentes preparadas con el sistema *Pichia* EasyComp kit y se siguió el procedimiento recomendado en el manual. La selección de transformantes se realizó en placas de YPD con 100 μ g/mL de Zeocina.

4.1.6 Reacciones de amplificación (PCR). Las amplificaciones se desarrollaron con la enzima Expand High Fidelity (Roche) bajo las siguientes condiciones generales: Desnaturalización inicial: 3 min a 94°C; Hibridación de 35 ciclos: 30 seg a 94°C, 30 seg a 56°C y 1 min por kb a 68°C; Extensión final: 7 min a 68°C.

4.1.7 Secuenciación. La secuencia nucleotídica de los fragmentos de interés fue determinada en un secuenciador automático Applied Biosystem 3100 en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

4.2 Métodos generales de análisis de proteínas.

4.2.1 Cuantificación de proteína. La proteína total del extracto enzimático fue medida mediante el sistema Protein Assay (Bio-Rad) basado en el método de Bradford y utilizando una curva de seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.

4.2.2 Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). La proteína analizada por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida al 8% fue previamente mezclada con amortiguador de carga con 10% de β -mercaptoetanol y calentada a 94°C durante 5 minutos. La electroforesis se desarrolló a 10 mA durante aproximadamente 1 hora y media. Los geles fueron teñidos con solución de azul de Coomassie 0.125% y desteñidos durante toda la noche en la solución desteñidora I (Ac. Acético 10%, Metanol 50%). Se terminaron de desteñir con la solución desteñidora II (Ac. Acético 7%, Metanol 5%) por 2 h.

4.2.3 Inmunodetección. La proteína fue transferida a partir de un gel de poliacrilamida al 8% a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences) utilizando la cámara de transferencia semi-seca TE-70 (Amersham Biosciences) operada a 150 mA durante 2 horas. La membrana fue bloqueada durante una hora en solución PBS 1X con 0.5% de leche Svelty (w/v) y lavada 2 veces con PBS 1X durante 10 minutos. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo Penta-His HRP Conjugate (Quiagen) diluido 1:5000 en PBST (PBS 1X con Tween 80 0.05%) durante 2 horas a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados de diez minutos con PBST y 2 con PBS 1X. Para revelar se agregaron a la membrana 4 mL del reactivo TMB (Zymed) y se agitó hasta ver la aparición de las bandas. Como control positivo se utilizó el marcador BenchMark Protein Ladder (Invitrogen).

4.3 Obtención de ARN total. Las hojas de plantas con aproximadamente 30 cm de altura se removieron de alrededor de la piña y esta se cortó en trozos pequeños que se sumergieron en una solución estéril de sacarosa al 5% donde se mantuvieron bajo iluminación durante 14 horas para inducir la expresión de las fructosiltransferasas. El tejido fue enjuagado en agua tratada con DEPC al 0.1%, congelado en nitrógeno líquido y macerado. El ARN total fue aislado con el sistema Aurum Total RNA Mini kit (Bio-Rad).

4.4 Construcción de una biblioteca de ADNc. La biblioteca se construyó utilizando hojas de plantas que se sometieron a choque térmico por 4 horas a 40°C en una cámara iluminada de crecimiento. El ARN total fue aislado siguiendo el método de Rochester y colaboradores [83]. El ARN poliadenilado se purificó utilizando el sistema poly tract mRNA isolation systems (Promega). Para construir la biblioteca se utilizó el sistema Smart cDNA library construction system (Clontech). La primera cadena de ADNc fue sintetizada utilizando 1 µg de ARN poliadenilado y la enzima Powerscript reverse transcriptase (Clontech). La amplificación del ADNc se llevó a cabo mediante LD PCR. El ADNc fue digerido con la enzima de restricción SfiI y fraccionado por tamaño con una columna Chroma spin 400. El ADNc fue ligado al vector λ-TripIEx2 y empacado con el sistema Zap cDNA Gigapack III (Stratagene).

4.5 Aislamiento y clonación del ADNc.

4.5.1 RT-PCR y 3'RACE. El ADNc fue sintetizado a partir de 2 µg de ARN total utilizando el adaptador 3'RACE del sistema FirstChoice RLM-RACE (Ambion) y la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). La amplificación (PCR) se llevó a cabo con el oligonucleótido directo DC- (CCA TGG TTC CTG ACC ATT GGT ACG) y el oligonucleótido reverso 2- (TCG GTC TCN CCA ACR TAN SCC CA, donde N=A, C, G o T; R= A o G y S=C o G). Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con el sistema Expand High Fidelity (Roche). El extremo 3' fue amplificado por PCR anidada utilizando el sistema FirstChoice RLM-RACE (Ambion) y los oligonucleótidos directos *GSP3'ou-*(ATC GAC GTT GGG GTT GGA TTG AGG) y *GSP3'in-* (CTA CGA TCA GGA GAA GCA TAG GCG).

4.5.2 Amplificación del extremo 5'. El extremo 5' fue obtenido analizando la biblioteca de ADNc de *Agave tequilana* mediante PCR utilizando los oligonucleótidos reversos *GSP5'ou-*(GTG TAC AAC ACC ACA ATC CGA CCG) y *GSP5'in-* (AAC GTG GAG TAG CCC GAC CAG ACG) en combinación con un oligonucleótido directo específico del vector *5'Trip-* (TCC GAG ATC TGG ACG AGC).

4.5.3 Clonación de la región codificante completa. A partir de la biblioteca de ADNc se amplificó la región codificante del ADNc mediante PCR con los oligonucleótidos específicos *Againi-* (ATC GAC GTT GGG GTT GGA TTG AGG) y *Agafin-* (CTA CGA TCA GGA GAA GCA TAG GCG). El producto de PCR fue clonado en el vector pBAD/TOPO ThioFusion, transformado y conservado en la cepa de *E. coli* DH5α.

4.5.4 Clonación de MSSTAG en *P. pastoris*. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar la 1-SST madura putativa (MSSTAG) introduciendo un sitio de restricción EcoRI en el oligonucleótido directo *PromadpPicZaA*- (CCG GAA TTC ATG AGA TTG AGA GAG AAC G) y un sitio Xba I en el oligonucleótido reverso *AgafinpPicZaA*- (GCT CTA GAG GAG CCA CCA AGC CAG GG). El producto de la amplificación fue purificado con el sistema High Pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics), digerido con las enzimas de restricción Eco RI (New England Biolabs) y Xba I (Roche Biochemical) y ligado con T4 DNA ligase (New England Biolabs) al vector de expresión y secreción pPICZ α A del sistema EasySelect *Pichia* expresión kit (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se prepararon células quimicompetentes de la cepa *P. pastoris* X-33 con el sistema *Pichia* EasyComp kit y se transformaron con 5 μ g del vector linealizado con Sac I (BioLabs); las transformantes fueron seleccionadas en placas de YPD con Zeocina (100 mg/L).

4.5.5 Análisis de transformantes. Para verificar la integración del gen de interés en el genoma de la levadura se extrajo ADN genómico de las transformantes siguiendo las instrucciones del manual del sistema *Pichia* EasyComp kit. Se realizó una amplificación con los oligonucleótidos α -Factor y AOX3' específicos del vector y el producto de amplificación fue posteriormente secuenciado.

4.6 Expresión de proteínas en *P. pastoris*.

4.6.1 Expresión de MSSTAG. Para producir la enzima recombinante una transformante de *P. pastoris* (X-33) fue inoculada en 20 mL de medio BMGY en un matraz de 150 mL e incubada a 29°C y 180 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 5.0. Las células fueron cosechadas por centrifugación y resuspendidas en 100 mL del medio de inducción BMMY (OD₆₀₀ = 1) en un matraz de 500 mL. Se incubaron durante 110 horas bajo las condiciones ya mencionadas. Cada 24 horas fue añadido 0.5% (v/v) de metanol. Para analizar el efecto de una segunda fuente de carbono se adicionó glucosa al 0.1% al medio de inducción y se añadió de igual forma que el metanol cada 24 horas.

4.6.2 Expresión de pPICZ α C-F2. Una colonia de pPicZ α C-F2 fue inoculada en 50 mL de medio BMGY e incubada a 27°C y 180 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 5. Las células fueron cosechadas por centrifugación y resuspendidas a una OD₆₀₀ = 1 en el medio de inducción BMMY con diferentes concentraciones de metanol (0.5, 0.75, 1 y 1.5%) y cuando fue necesario con 0.1% de glucosa. La incubación se desarrolló por 24 horas bajo las condiciones mencionadas.

4.7 Análisis de la expresión de MSSTAG e identificación de los productos de reacción. Se centrifugó 1 mL de medio de cultivo inducido con 0.1% de glucosa y 0.5% de metanol durante 5 días y se separó el sobrenadante. Al paquete celular se agregaron 200 µl de perlas de vidrio de 400 a 500 micrómetros de diámetro así como 100 µl de amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5. Las células se sometieron a agitación vigorosa durante 30 segundos y se incubaron en hielo otros 30 segundos. La operación se repitió 8 veces. El extracto intracelular se separó mediante centrifugación de los restos celulares. La proteína del medio de cultivo, del extracto intracelular y de los restos celulares fue analizada mediante SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 8% y la producción de 1-kestosa se cuantificó mediante cromatografía de líquidos (HPLC-IR) a partir de reacciones con sacarosa 300 mM incubadas a 25°C durante 20 h.

4.8 Obtención del extracto enzimático.

4.8.1 MSSTAG. Después de 110 horas de incubación el medio de cultivo de *P. pastoris* se centrifugó y 50 mL del sobrenadante se concentraron 60 veces, se desalaron y equilibraron con amortiguador MES 50 mM pH 5.5, amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 o amortiguador de fosfatos 50 mM pH 5.5 mediante filtración en concentradores Amicon ULTRA-4 30 000 MWCO (Millipore).

4.8.2 pPicZαC-F2. Después de 24 horas de incubación el medio de cultivo fue centrifugado y 250 mL del sobrenadante fueron precipitados con sulfato de amonio al 70% en un baño agitado a 0°C. Una vez disuelto el sulfato de amonio la incubación se mantuvo 30 minutos. La proteína se recuperó por centrifugación y se dializó contra amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5.

4.9 Fraccionamiento del extracto enzimático de MSSTAG mediante filtración en gel.

Las proteínas del extracto enzimático se fraccionaron mediante una columna de exclusión molecular (Sephacryl S-200) utilizando el sistema FPLC (ÄKTAprime) a temperatura ambiente. El extracto enzimático fue cargado en la columna previamente equilibrada en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 6.0) con cloruro de sodio 150 mM. La separación se desarrolló a un flujo de 2 mL/min y se colectaron fracciones de 4 mL que fueron concentradas 30 veces por filtración en concentradores Amicon ULTRA-4 de corte 30 000 kDa.

4.10 Caracterización enzimática de MSSTAG y pPicZ α C-F2.

4.10.1 Ensayo estándar de actividad.

4.10.1.1 MSSTAG. La actividad 1-SST fue determinada a pH 5.5 en amortiguador MES 50 mM y amortiguador de acetatos 50 mM a 30°C, midiendo la velocidad de producción de 1-kestosa a partir de soluciones de sacarosa 300 mM en reacciones de 90 μ l utilizando 30 μ l del extracto enzimático. Se tomaron muestras cada 3 horas y se calentaron a 94°C durante 7 minutos para inactivar la enzima. Para medir la 1-kestosa, las muestras se centrifugaron y analizaron mediante cromatografía de líquidos (HPLC) en un equipo Waters 510 equipado con un detector de índice de refracción (IR) (Waters 410) y utilizando una columna para análisis de carbohidratos Prevail Carbohydrate ES (Part. No. 35101 Alltech) a 32°C, utilizando como eluyente una mezcla de acetonitrilo:agua 68:32 a un flujo de 1.0 mL/min. Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de 1-kestosa por minuto.

4.10.1.2 pPicZ α C-F2. La actividad de pPicZ α C-F2 fue determinada a pH 5.5 en amortiguador de acetatos 50 mM a 35°C midiendo la velocidad de liberación de azúcares reductores a partir de soluciones de sacarosa 300 mM en reacciones de 300 μ l utilizando 20 μ l del extracto enzimático. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima capaz de producir un μ mol de azúcares reductores medidos por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) [84].

4.10.2 Efecto de diferentes parámetros de cultivo. Para analizar el efecto de los diferentes parámetros en la producción de MSSTAG se midió la actividad enzimática en el medio de cultivo después de 5 días de inducción. Para ello se cuantificó mediante HPLC-IR la producción de 1-kestosa a partir de soluciones de sacarosa 300 mM en reacciones de 300 μ l utilizando 200 μ l del medio de cultivo las cuales fueron incubadas durante 20 horas. En el caso de pPicZ α C-F2 las reacciones se prepararon de la misma forma utilizando el medio de cultivo inducido durante 24 horas y la actividad se determinó como la aparición de azúcares reductores medidas por DNS.

4.10.3 Efecto de la temperatura y pH. El efecto de la temperatura sobre la actividad fue evaluado con el ensayo de actividad estándar a pH 5.5 y a diferentes temperaturas en el rango de 20 a 45°C para MSSTAG y de 15 a 55°C para pPicZ α C-F2, mientras que el efecto del pH fue determinado a 30 y 35°C en amortiguador de citratos 50 mM con valores de pH en el rango de 4.0 a 7.0 para MSSTAG y de 3.5 a 7.5 para pPicZ α C-F2. Las reacciones fueron preparadas de igual forma que en el ensayo de actividad estándar.

4.10.4 Estabilidad térmica. La estabilidad térmica de MSSTAG fue evaluada incubando la enzima a pH 5.5 en amortiguador de acetatos 50 mM a 25, 30 y 35°C. Se tomaron muestras de 100 µl del extracto enzimático después de 4 horas de incubación para determinar la actividad residual utilizando el ensayo de actividad estándar.

4.10.5 Propiedades cinéticas. Los parámetros cinéticos (K_M y V_{max}) de MSSTAG fueron determinados a partir de mediciones de velocidad utilizando concentraciones de sacarosa en el rango de 50 mM a 1333 mM. Los datos fueron procesados en un gráfico de Lineweaver-Burk.

4.10.6 Especificidad. La especificidad de MSSTAG hacia sustrato fue determinada por comparación de las velocidades de reacción obtenidas utilizando sacarosa y 1-kestosa 150 mM como sustratos bajo las condiciones del ensayo de actividad estándar. Los productos fueron analizados por HPLC-IR.

4.10.7 Ensayo a tiempos largos de reacción. Se llevaron a cabo reacciones con 20 mU/mL de actividad enzimática (MSSTAG) en soluciones de sacarosa 36 g/L en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 5.5 a 30°C durante 73 horas y se analizó el perfil de productos a lo largo del tiempo mediante HPLC-IR.

4.10.8 Reacciones de aceptor. El ensayo de transferencia a diferentes moléculasceptoras se llevó a cabo con 70 mU/mL de MSSTAG y con 0.5U/mL de pPicZ α C-F2 bajo las condiciones de actividad estándar. Los aceptores ensayados fueron maltosa 300 mM, xilosa 300 mM y xilosa 600 mM en presencia de Sacarosa 300 mM. Los productos de reacción fueron analizados por HPLC-IR.

A excepción del ensayo a tiempos largos de reacción todas las mediciones fueron realizadas por duplicado.

4.11 Materiales.

4.11.1 Material vegetal. Las plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul de aproximadamente dos años y medio de edad fueron cultivadas en invernadero y proporcionadas por la empresa Allied Domecq México.

4.11.2 Oligonucleótidos.

DC- (CCA TGG TTC CTG ACC ATT GGT ACG)

2- (TCG GTC TCN CCA ACR TAN SCC CA, donde N=A, C, G o T; R= A o G y S=C o G)

GSP3'ou-(ATC GAC GTT GGG GTT GGA TTG AGG)

GSP3'in- (CTA CGA TCA GGA GAA GCA TAG GCG)

GSP5'ou-(GTG TAC AAC ACC ACA ATC CGA CCG)

GSP5'in- (AAC GTG GAG TAG CCC GAC CAG ACG)

5'Trip- (TCC GAG ATC TGG ACG AGC)

Againi- (ATC GAC GTT GGG GTT GGA TTG AGG)

Agafin- (CTA CGA TCA GGA GAA GCA TAG GCG)

PromadpPicZaA- (CCG **GAA TTC** ATG AGA TTG AGA GAG AAC G)

AgafinpPicZaA- (GCT **CTA GAG** GAG CCA CCA AGC CAG GG)

α -Factor- (TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC)

AOX3'- (GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC)

4.11.3 Plásmidos y cepas.

pBAD/TOPO ThioFusion (Invitrogen, CA)

pPICZ α A (Invitrogen, CA)

E. coli DH5 α .

P. pastoris X-33 (Invitrogen, CA).

4.11.4 Enzimas, anticuerpos y marcadores.

Expand High Fidelity PCR System (Roche)

M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen)

Eco RI y SAC I (New England Biolabs)

Xba I (Roche Biochemical)

T4 DNA Ligase (New England Biolabs)

Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas)

Penta-His HRP Conjugate (Quiagen)

BenchMark Protein Ladder (Invitrogen)

PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas)

RNA Ladder High Range, ready-to-use (Fermentas)

4.12 Programas, servidores y bases de datos.

DNASTAR (Software para biología molecular)

GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)

CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)

PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

CPHmodels 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>)

PROCHECK (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html>)

SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

BioEdit (Editor de alineamientos de secuencias biológicas)

Resultados y discusión

5.1 Aislamiento del ADNc que codifica para la 1-SST de *A. tequilana* Weber var. azul.

Mediante el uso de diferentes técnicas de biología molecular se aisló el ADNc completo que codifica para la 1-SST de *A. tequilana* Weber var. azul (Figura 9). Un primer fragmento de 662 pares de bases fue amplificado a partir de ARN total aislado de plantas jóvenes mediante RT-PCR utilizando un oligonucleótido conservado (DC) y un oligonucleótido degenerado (2) diseñados a partir de las regiones conservadas observadas en un alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas de la 1-SST de *Allium cepa*, *Allium sativum*, *Cynara scolymus*, *C. intybus*, *F. arundinacea*, *H. tuberosus*, *L. perenne*, *Taraxacum officinale* y *T. aestivum* (Números de acceso a GenBank: CAA06838, AAM21931, CAA70855, AAB58909, CAC05261, AJ009757, AAO86693, CAB60153, BAB82470). El fragmento mostró identidad con diferentes fructosiltransferasas e invertasas de plantas y fue utilizado para diseñar oligonucleótidos específicos divergentes para obtener los extremos 3' (*GSP3'ou*, *GSP3'in*) y 5' (*GSP5'ou*, *GSP5'in*). El extremo 3' fue obtenido con la técnica de 3'RACE y el fragmento de 1047 pares de bases estuvo constituido por 787 pares de bases correspondientes a la región codificante y 260 pares de bases que conforman la región no codificante 3'.

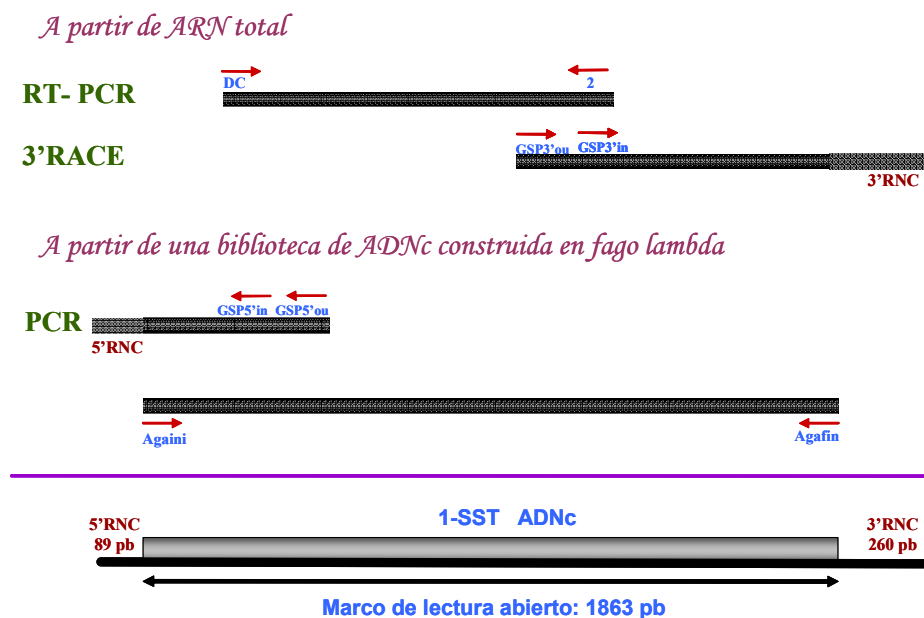


Figura 9. Estrategia utilizada para el aislamiento del ADNc que codifica para la sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa de *A. tequilana* Weber var. azul.

Por otro lado, el extremo 5' fue obtenido a partir de una biblioteca de ADNc de *A. tequilana* Weber var. azul construida en fago lambda, la cual fue analizada mediante PCR anidada utilizando oligonucleótidos específicos del gen de interés y del vector (*5'Trip*) en el que se construyó la biblioteca. El fragmento obtenido estuvo constituido por una región no codificante de 89 pares de bases y el extremo 5' de 479 pares de bases. Finalmente se amplificó la región codificante completa a partir de la biblioteca de ADNc utilizando oligonucleótidos específicos (*Againi*, *Agafin*). El producto de la amplificación fue clonado en el vector pBAD/TOPO ThioFusion, transformado y conservado en la cepa de *Escherichia coli* DH5 α . El plásmido pBad-SST fue secuenciado para obtener la secuencia completa de la región codificante de ADNc.

5.2 Análisis de la secuencia de ADNc.

La secuencia completa de ADNc (SSTAg) tiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 621 aminoácidos (Figura 10) con un peso molecular teórico de 69 799 Da y un punto isoeléctrico de 5.83. Su análisis en BLASTP mostró identidad con diferentes FTF e invertasas de plantas [1-SST de *A. cepa* (70%), 1-SST de *A. sativum* (68%), 6-GFT de *A. officinalis* (59%), 6-GFT de *A. cepa* (59%), invertasa de *A. cepa* (66%) e invertasa de *A. officinalis* (59%)]. SSTAg fue clasificada dentro de la familia 32 de las Glicósido Hidrolasas (GH32) por el programa NCBI Conserved Domain Search y en la secuencia primaria se identificaron siete sitios probables de N-glicosilación (NXT/S). Por otro lado, en el alineamiento múltiple con diferentes FTF, invertasas y fructan exohidrolasas de plantas se identificaron las 6 regiones conservadas ya descritas para las FTF de plantas y hongos (Figura 11), así como los residuos catalíticos más probables (Asp94, Asp219 y Glu276), una cisteína posiblemente involucrada en el mecanismo de reacción (Asp219 y Cys277) y dos cisteínas (Cys471 y Cys519) formando un puente disulfuro. La región amino terminal fue comparada con la secuencia de las proteínas maduras de tipo 1-SST conocidas (1-3) y el análisis sugirió la presencia de un péptido señal de aproximadamente 61 aminoácidos (nucleótidos 1 al 183).

5.3 Modelo tridimensional de SSTAg.

Un modelo computacional de la estructura tridimensional de SSTAg fue construido en el servidor CPHmodels 2.0 (Figura 12A), utilizando como template la estructura cristalográfica de

| | | |
|------------|--|------------|
| 1 | <u>atg gco tca tcg aca aag gat qtg gag gct cot oca act ttg gac</u> | 45 |
| 1 | <u>m a s s t k d v e a p p t l d</u> | 15 |
| 46 | <u>goc cot oto oto ggg tot got goc oag ogg ago agg tta agg gto</u> | 90 |
| 16 | <u>a p l l g s a a p r s r l r v</u> | 30 |
| 91 | <u>goc goc gto tcc oto tog gto atg gog ttt ott otg gtg goc ato</u> | 135 |
| 31 | <u>a a v s l s v m a f l l v a i</u> | 45 |
| 136 | <u>gog gog gog gtt oto tac tac aac ooc ggc ggc gto goc tca aat</u> | 180 |
| 46 | <u>a a a v l y y n p g g v a s n</u> | 60 |
| 181 | <u>otg atg aga ttg aga gag aac gat tac ccg tgg acc aac gac atg</u> | 225 |
| 61 | <u>l m r l r e n d y p w t n d m</u> | 75 |
| 226 | <u>ctg agg tgg caq cgc act gga ttc cat ttc caq cca gag aaa aat</u> | 270 |
| 76 | <u>l r w q r t g f h f q p e k n</u> | 90 |
| 271 | <u>ttc caq gct gat ccc aat gct gcc atg ttc tac aag ggc tgg tat</u> | 315 |
| 91 | <u>f q a <u>D P N</u> a a m f y k g w y</u> | 105 |
| 316 | <u>cat ttc ttc tac caq tac aat ccg aca ggt gta gcc tgg gac tat</u> | 360 |
| 106 | <u>h f f y q y <u>N P T</u> g v a w d y</u> | 120 |
| 361 | <u>aca att tca tgg ggc cac gcc gtt tct aag gat ctc ctc cat tgg</u> | 405 |
| 121 | <u>t i s w g h a v s k d l l h w</u> | 135 |
| 406 | <u>aac tac ctc ccc atg gct ctg agg ccg gac cac tgg tac gac agg</u> | 450 |
| 136 | <u>n y l p m a l r p d h w y d r</u> | 150 |
| 451 | <u>aaa ggc gtc tgg tcg ggc tac tcc acg ttg ttg cct gac ggt ccg</u> | 495 |
| 151 | <u>k g v w s g y s t l l p d g r</u> | 165 |
| 496 | <u>att gtg gtg ttg tac acc ggc ggt acc aaa gaa tta gtg caa gtc</u> | 540 |
| 166 | <u>i v v l y t g g t k e l v q v</u> | 180 |
| 541 | <u>caa aac ctc gcc gtg ccc gtc aat ctc tcc gac cct ctc ctc ctc</u> | 585 |
| 181 | <u>q n l a v p v <u>N L S</u> d p l l l</u> | 195 |
| 586 | <u>gag tgg aag aag tct cac gtc aat cct ata ctt gtt cca cct cct</u> | 630 |
| 196 | <u>e w k k s h v n p i l v p p p</u> | 210 |
| 631 | <u>ggc att gaa gac cac gac ttc agg gat cct ttc cca gta tgg tac</u> | 675 |
| 211 | <u>g i e d h d f <u>R D P</u> f p v w y</u> | 225 |
| 676 | <u>aat gaa tcg gac tcc agg tgg cat gtt gtg att ggc tcc aag gat</u> | 720 |
| 226 | <u><u>N E S</u> d s r w h v v i g s k d</u> | 240 |
| 721 | <u>ccg gag cac tac ggc att gtc ctc atc tac acc acc aaa gac ttc</u> | 765 |
| 241 | <u>p e h y g i v l i y t t k d f</u> | 255 |
| 766 | <u>gtc aac ttc act ctg ctc ccc aac atc ctc cac tcc acc aag cag</u> | 810 |
| 256 | <u>v <u>N F T</u> l l p n i l h s t k q</u> | 270 |
| 811 | <u>ccc gtc ggc atg ctg gaa tgc gtc gac ttg ttc ccg gtc gcc acc</u> | 855 |
| 271 | <u>p v g m <u>L E C</u> v d l f p v a t</u> | 285 |
| 856 | <u>acc gac tcc cga gcc aac cag gcc ctc gac atg acg acg atg agg</u> | 900 |
| 286 | <u>t d s r a n q a l d m t t m r</u> | 300 |
| 901 | <u>ccg ggg ccg ggg ttg aag tac gtg ctt aag gcg agc atg gac gac</u> | 945 |
| 301 | <u>p g p g l k y v l k a s m d d</u> | 315 |
| 946 | <u>gag agg cac gat tac tat gcc ctc gga tca ttt gat ctg gac tct</u> | 990 |
| 316 | <u>e r h d y y a l g s f d l d s</u> | 330 |
| 991 | <u>ttc act ttt act ccc gac gat gaa acc atc gac gtt ggg gtt gga</u> | 1035 |
| 331 | <u>f t f t p d d e t i d v g v g</u> | 345 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1036 | ttg | agg | tac | gat | tgg | ggc | aaa | ttt | tac | gct | tcc | aag | act | ttc | tac | 1080 |
| 346 | L | R | Y | D | W | G | K | F | Y | A | S | K | T | F | Y | 360 |
| 1081 | gat | cag | gag | aag | cat | agg | cgg | gtg | ctg | tgg | gga | tac | gtt | ggg | gag | 1125 |
| 361 | D | Q | E | K | H | R | R | V | L | W | G | Y | V | G | E | 375 |
| 1126 | gtc | gat | agt | aag | aga | gat | gac | gcg | ttg | aaa | ggt | tgg | gcc | tca | ctt | 1170 |
| 376 | V | D | S | K | R | D | D | A | L | K | G | W | A | S | L | 390 |
| 1171 | cag | aac | att | ccg | cga | aca | ata | ttg | ttc | gat | acg | aaa | act | aaa | agc | 1215 |
| 391 | Q | N | I | P | R | T | I | L | F | D | T | K | T | K | S | 405 |
| 1216 | aac | ctc | atc | ctg | tgg | ccg | gtt | gag | gaa | gtg | gag | agc | ctc | agg | acg | 1260 |
| 406 | N | L | I | L | W | P | V | E | E | V | E | S | L | R | T | 420 |
| 1261 | atc | aac | aaa | aat | ttc | aac | agc | atc | ccc | ctg | tat | cct | ggg | tcg | aca | 1305 |
| 421 | I | N | K | N | F | N | S | I | P | L | Y | P | G | S | T | 435 |
| 1306 | tac | cag | cta | gat | gtt | ggc | gaa | gca | act | cag | ttg | gac | ata | gta | gcc | 1350 |
| 436 | Y | Q | L | D | V | G | E | A | T | Q | L | D | I | V | A | 450 |
| 1351 | <u>gag</u> | <u>ttt</u> | <u>gag</u> | <u>gtc</u> | <u>gat</u> | <u>gag</u> | <u>aaq</u> | <u>gcg</u> | <u>att</u> | <u>gag</u> | <u>gct</u> | <u>aca</u> | <u>gcc</u> | <u>gag</u> | <u>gcc</u> | 1395 |
| 451 | E | F | E | V | D | E | K | A | I | E | A | T | A | E | A | 465 |
| 1396 | <u>gac</u> | <u>gtc</u> | <u>acc</u> | <u>tac</u> | <u>aac</u> | <u>tgc</u> | <u>agc</u> | <u>acc</u> | <u>agc</u> | <u>ggc</u> | <u>ggg</u> | <u>gca</u> | <u>gcc</u> | <u>aac</u> | <u>cgg</u> | 1440 |
| 466 | D | V | T | Y | <u>N</u> | <u>C</u> | <u>S</u> | T | S | G | <u>G</u> | <u>A</u> | <u>A</u> | N | R | 480 |
| 1441 | <u>ggc</u> | <u>gtt</u> | <u>ctc</u> | <u>gga</u> | <u>ccg</u> | <u>ttc</u> | <u>ggc</u> | <u>ctg</u> | <u>ctc</u> | <u>gtt</u> | <u>ctc</u> | <u>gcg</u> | <u>aat</u> | <u>cag</u> | <u>gaa</u> | 1485 |
| 481 | G | V | L | G | P | F | <u>G</u> | L | L | V | L | A | N | Q | E | 495 |
| 1486 | <u>ctc</u> | <u>tcc</u> | <u>gag</u> | <u>cag</u> | <u>act</u> | <u>gcg</u> | <u>acc</u> | <u>tac</u> | <u>ttc</u> | <u>tat</u> | <u>gtt</u> | <u>agt</u> | <u>cgg</u> | <u>gga</u> | <u>att</u> | 1530 |
| 496 | L | S | E | Q | T | A | T | <u>Y</u> | F | Y | V | S | R | G | I | 510 |
| 1531 | <u>gat</u> | <u>ggc</u> | <u>aat</u> | <u>ctg</u> | <u>cgc</u> | <u>act</u> | <u>cac</u> | <u>ttc</u> | <u>tgc</u> | <u>cag</u> | <u>gat</u> | <u>gaa</u> | <u>ctg</u> | <u>agg</u> | <u>tca</u> | 1575 |
| 511 | D | G | N | L | R | T | H | F | <u>C</u> | Q | D | E | L | R | S | 525 |
| 1576 | <u>tcc</u> | <u>aag</u> | <u>gct</u> | <u>ggc</u> | <u>gcc</u> | <u>atc</u> | <u>acc</u> | <u>aaq</u> | <u>aga</u> | <u>gtg</u> | <u>gtt</u> | <u>ggc</u> | <u>agc</u> | <u>acc</u> | <u>gtt</u> | 1620 |
| 526 | S | K | A | G | A | I | T | K | R | V | V | G | S | T | V | 540 |
| 1621 | cca | gtg | ctt | cac | ggt | gaa | acc | tgg | gca | tta | aga | ata | ctt | gtg | gat | 1665 |
| 541 | P | V | L | H | G | E | T | W | A | L | R | I | L | V | D | 555 |
| 1666 | cac | tct | atc | gtc | gag | agc | ttt | gcc | cag | aga | ggg | agg | gcg | gtg | gcc | 1710 |
| 556 | H | S | I | V | E | S | F | A | Q | R | G | R | A | V | A | 570 |
| 1711 | acg | tcc | cgt | gtg | tac | ccg | act | gag | gca | atc | tac | agc | tcg | gca | cgg | 1755 |
| 571 | T | S | R | V | Y | P | T | E | A | I | Y | S | S | A | R | 585 |
| 1756 | gtc | ttc | ctc | ttc | aac | aat | gca | acc | gac | gcc | att | gtc | acc | gca | aaa | 1800 |
| 586 | V | F | L | F | N | <u>N</u> | <u>A</u> | <u>T</u> | D | A | I | V | T | A | K | 600 |
| 1801 | acg | gtg | aac | gtg | tgg | cac | atg | aac | tcc | aca | tac | aac | cat | gtc | ttc | 1845 |
| 601 | T | V | N | V | W | H | M | <u>N</u> | <u>S</u> | <u>T</u> | Y | N | H | V | F | 615 |
| 1846 | <u>cct</u> | <u>ggc</u> | <u>ttg</u> | <u>gtg</u> | <u>gct</u> | <u>cca</u> | <u>tga</u> | 1866 | | | | | | | | |
| 616 | P | G | L | V | A | P | * | | | | | | | | | |

Figura 10. Secuencia codificante de la 1-SST de *A. tequilana* Weber var. azul. Los aminoácidos correspondientes al péptido señal se muestran en minúsculas; los sitios probables de N-glicosilación (NXT/S) subrayados; las cisteínas conservadas involucradas en la formación de un puente disulfuro (línea punteada) son

resaltadas en negritas, al igual que los residuos involucrados en la catálisis (Asp94, Asp219 y Glu276). Estos últimos pertenecen a los motivos conservados (DPN, RDP y LEC) resaltados con línea doble.

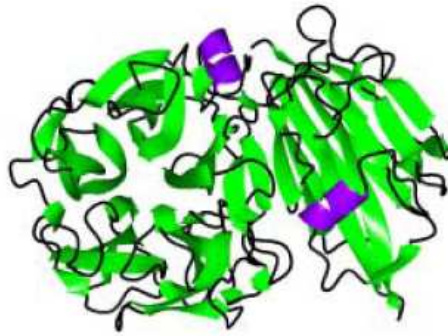
la fructan 1-exohidrolasa IIa de *C. intybus* (FEHci; código PDB 1st8) (4), la cual tiene una identidad de secuencia del 40.4% con SSTAg. Como se esperaba, el modelo de SSTAg (Figura 12A) comparte la misma arquitectura de la Fructan 1-exohidrolasa IIa de *C. intybus*, con 338 residuos formando una β -propela de 5 hojas en la región N-terminal y 192 residuos formando un β -sandwich constituido por 2 hojas β antiparalelas en la región C-terminal. El modelo de SSTAg fue superpuesto con las estructuras cristalográficas reportadas para la invertasa de *T. maritima* (INVtm; código PDB 1uyp), la exo-inulinasa de *A. awamori* (EIaa; código PDB 1y4w) y la FEHci (el templado del modelo, código PDB 1st8), ya que todas comparten la misma estructura tridimensional y están incluidas en la familia 32 de las glicosido hidrolasas (GH32) de acuerdo a la clasificación de Henrissat y Davies (5). En estas enzimas el sitio activo está conservado y localizado en la β -propela de la región amino terminal. Con base en la homología entre estas estructuras los residuos Asp94, Asp219 y Glu276 localizados en los motivos DPN, RDP y LEC fueron identificados como los aminoácidos catalíticos en SSTAg. Estos residuos comparten la misma posición y orientación de sus equivalentes Asp22, Asp147 y Glu201 en la FEHci (código PDB 1st8). La mutación en la posición equivalente al Asp219 del motivo RDP en la levansacarasa de *Acetobacter diazotrophicus* (LsdA; Asp309Asn) redujo 75 veces la actividad (6). Al igual que Asp219 otro residuo importante es Arg218, sus equivalentes en EIaa (código PDB 1y4w) están involucrados en la unión del sustrato como demuestra el análisis de la estructura obtenido al sumergir cristales de EIaa en soluciones de fructosa (7). Un caso similar es el de la cisteína en el motivo LEC cuya sustitución en la invertasa de levadura (Cys205Ala) resultó en la reducción del 70% de la actividad. Una notable diferencia observada tanto en SSTAg como en FEHci (código PDB 1st8) está relacionada con el asa que contiene una pequeña α -hélice y una de las hojas β de la región carboxilo terminal. La longitud del asa es similar en SSTAg (Val454 a Pro485) y FEHci (Leu373 a Pro406), mientras que es muy corta en INVtm (Gly332 a Glu335). Una importante característica derivada a partir del modelo es la presencia de un puente disulfuro entre la Cys471 situada en la α -hélice y la Cys519 localizada en una de las hojas β del dominio carboxilo terminal. Tanto la secuencia que codifica para la α -hélice como las 2 cisteínas involucradas en la formación del puente disulfuro parecen estar conservadas en FTFs, invertasas

y FEHs de plantas (Figura 11). Por otro lado, FEHci (código PDB 1st8) muestra 2 Asn glicosiladas, una de ellas muy conservada en FTFs, invertasas y FEH de plantas. Ya que SSTAg contiene estas

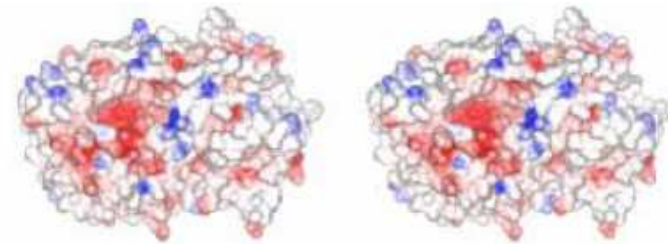
| | 91 | 104 | 153 | 187 | 215 | 274 | 347 | 454 | 517 | 589 | 593 | GenBank Accession no. |
|-------------|--------------------|------------|------------|------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|
| SSTag | WMN DP NA97 | WYHFFYQ110 | VWVSGYS158 | VNLSLSD191 | HDFR DP FFVW224 | VGMLE EC VD279 | RYDWGK GF YA355 | VDE-KALEATAEA--DVTY NC STSGGAANRGLGPFGLLVLAN493 | HF CQ D521 | FN N AT589 | FN N AT593 | DQ535031 |
| Invvira | WMN DP NG | WYHFFYQ | VWTGSA | ADPSD | KDFR DP TTAW | TGMW EC VD | RYDYG LF YA | IDT-ESLEKTAES-NEE-FT CS SSGGAAQRGALGPFGLLVLD | SF C SD | FN N AT | FN N AT | BAA01107 |
| INVLYes | WMN DP NG | WYHLFYQ | VWTGSA | ADPSD | KDFR DP TTAW | TGMW EC VD | RYDYG NF YA | VDQ-NMLKKVDGS-NAT-YD CI KSGSGGERGALGPFGLLVLD | FF C ND | FN N AT | FN N AT | CAJ19056 |
| INVOrsa | WMN DP NG | WYHLFYQ | VWTGSA | ADPSD | KDFR DP TTAG | TGMW EC VD | RLDYG K YYA | VDE-TLLETTSSES-HDAGYD CS NSGGAGTRGSLGPFGLLVAD | HL C AY | FN N AT | FN N AT | AAD10239 |
| SSTAllce | FMA DP NA | WYHFFYQ | VWVSGYA | ADPSD | HDFR DP FPVW | VGMLE EC VD | RYDYG K FYA | INK-EAVDAVVEA--DVTY NC STSDGAAHRGLGPFGLLVLAN | HF C QD | FN N AT | FN N AT | CAA06838 |
| SSTAllsa | FMG DP NA | WYHFFYQ | VWVSGYA | ADPSD | HDFR DP FPVW | VGMLE EC VD | RYDYG K FYA | INQ-EAVDAVVEA--DVTY NC STSDGSAHRGLGPFGLLVLAN | HF C QD | FN N AT | FN N AT | AAM21931 |
| Invallce | WMN DP NG | WYHFFYQ | VWTGSA | ADQSD | KDFR DP TTAW | VGMW EC VD | RYDWG K FYA | ISS-ELEAVKEA--DVSY NC SSSGGAAERGLGPFGLLVLAN | HF C QD | FN N AT | FN N AT | CAA06839 |
| InvAsof | WMN DP NG | WYHFFYQ | VWTGSA | ADLSD | TDFR DP TTAW | VGMW EC VD | RYDLG K FYA | INE-ESLSAEAEANGTGMV NC SGGGGAAERGLGPFGLLVLAN | HF C QD | FN N AT | FN N AT | AA871136 |
| 6-G-FFTAsof | YMN DP PSG | WYHLFYQ | VWTGSI | ADPSD | TDFR DP PNPIW | VGMW EC VD | RIDWG K FYA | MDK-DALETAIEA--DIGY NC SSSGGAVSRGLGPFGLVLAN | HL C HD | FN N AT | FN N AT | BAD89564 |
| 6G-FFTAllce | YMN DP PSG | WYHLFYQ | VWTGSI | ADPSD | DDFR DP PNPIW | VGMW EC VE | RYDWG K FYA | ISK-EALEATIEA--DVGY NC SSSGGAAIRGLGPFGLLVLAN | HF C QD | FN N AT | FN N AT | CAA69170 |
| SSTFear | YMN DP NG | WYHLFYQ | VLTSI | ADPSD | KDFR DP PLTAW | TGMY EC ID | RYDWG K YYA | LNS-SDVDALTEA--DVSY NC STS-GAAVRGALGPFGLLVLAN | HF C HD | FN N AT | FN N AT | CAE51350 |
| SSTLope | YMN DP NG | WYHLFYQ | VLTSI | ADPSD | KDFR DP PLTAW | TGMY EC ID | RYDWG K YYA | LNS-SDVDALNEA--DVGY NC STS-GAAVRGALGPFGLLVLAN | HF C HD | FN N AT | FN N AT | AA086693 |
| 6G-FFTLOpe | YMN DP NG | WYHLFYQ | VLTSI | ADPSD | KDFR DP PLTAW | TGMY EC LD | RYDWG K YYA | LNS-SDIDALNEA--DVGY NC SSSGGAAVRGALGPFGLLVFAD | HY C HD | FN N AT | FN N AT | AAM13671 |
| SSTTrae | YQN DP NG | WYHFFYQ | VLTSI | ADPSD | KDFR DP PTTAW | TGEY EC ID | RYDWG K YYA | IDA-SAIEALNEA--DVSY NC TSSGGAATRGALGPFGLLVLAN | HF C HD | FN N AT | FN N AT | BAD72792 |
| 1FFTTrae | YQN DP NG | WYHFFYQ | VLTSI | ADPSD | KDYR DP TTAW | TGMY EC ID | RYDYG R YDA | INA-SVIEALNEV--DVSY NC TMTSGAATRGALGPFGLLVLAN | HF C HD | FN N AT | FN N AT | BAD72792 |
| 6-SFTTrae | YMS DP NG | WYHMFYQ | VLSGSM | ADPTD | KDFR DP MPTAW | TGEW EC ID | RYDWG K FYA | LDA-SAVAALNEA--DVGY NC SSSGGAVNRGALGPFGLLVLAN | SF C QD | FN N AT | FN N AT | AB029887 |
| 6-SFTAgcr | YMS DP PDG | WYHMFYQ | VLSGSV | ADPND | KDFR DP MPTAW | TGEW EC ID | RYDWG K FYA | LDA-AAVAALNEA--DVGY NC SSSGGAVNRGALGPFGLLVLAN | SF C QD | FN N AT | FN N AT | AF211253 |
| 6-SFTPoase | FMS DP NG | YHHLFYQ | VLSGSI | AEPND | MDFR DP TTAW | TGMW EC MD | RYDWG K FYA | LNA-SAVAASEA--DVGY NC SSSGGAAATRGVLPFGLLVLAN | SF C ND | FN N AT | FN N AT | AF192394 |
| INVlote | WMN DP NG | WYHLFYQ | AWSGSA | SDPSD | KDFR DP TTAW | TGMW EC ID | RYDWG K FYA | LDP-LDVVAKEA--DVGY NC STS-GAAVRGALGPFGLLVLD | HF C HD | FN N AT | FN N AT | CAD58681 |
| INVtuges | WMN DP PDG | WYHIFYQ | ALTGSA | EDVDD | KDFR DP TTAW | TGMW EC VD | RYDYG K FYA | IDG-ATLEASVEA--DLGY NC STSGGTFRGVLGPFGLVLD | FF C QD | FN N AT | FN N AT | CAA64953 |
| SSTCiin | FIS DP PDG | WYHLFYQ | VMTGSA | V N SSD | KDFR DP STLW | TGMW EC VD | RYDYG K FYA | IDQ-KKLQSTLEA--DVL FN CTTSEGSVGRGVLGPFGLVLD | YF C AD | FN N AT | FN N AT | AA858909 |
| SSTTaof | FIS DP PDG | WYHLFYQ | VMTGSA | V N SSD | KDFR DP STLW | TGMW EC VD | RYDYG K FYA | IDE-KMESTLEA--DVL FN CTTSEGSVGRGVLGPFGLVLD | YF C AD | FN N AT | FN N AT | CAB60153 |
| SSTHetu | FIS DP PDG | WYHLFYQ | VMTGSA | V N SSD | KDFR DP STLW | TGMW EC VD | RYDFG K FYA | IDQ-KMESTLEA--DVL FN CTTSEGSVARSLGPFGLVLD | YF C AD | FN N AT | FN N AT | AJ009757 |
| SSTCysc | YIS DP PDG | WYHLFYQ | VMTGSA | V N SSD | KDFR DP STLW | TGMW EC VD | RYDFG K FYA | VDQ-TMESTLEA--DVL FN CTTSEGSAGRVLGPFGLVLD | YF C AD | FN N AT | FN N AT | CAA70855 |
| 1fftCysc | FIY DP NG | WYHLFYQ | VLSGST | V N ASD | TDYR DP STVW | TDMW EC VD | RCDYGR FF YA | VDQ-EALKATSDT--NDEY GC TSSGAAQRGSPGPFGLVLD | HF C TD | FN N AT | FN N AT | CAA04120 |
| 1FFTciin | FIY DP NG | WYHLFYQ | VLSGST | I N TSD | KDYR DP STVW | TDMW EC VD | RVDYGR FF YA | VEQ-ETFMRTSDT--NDEY GC TTSAGATERGSLGPFGLVLD | HF C TD | FN N AT | FN N AT | AAD00558 |
| FEHIIa | WMN DP NG | VYHFFYQ | CWSGSA | K N LSLSD | DCFR DP STAW | TGTW EC PD | RYDYG Q FYA | LEGLKEAEVLDTTLVD-PQAL C NERGASSRGALGPFGLLAMAS | LM C SD | FN N GT | FN N GT | AA85536 |
| FEHLope | WIN DP NG | IYHEFYQ | CWTGSA | K N KSD | SQFR DP PTGW | SSMW EC PD | RIDHG N FYA | LTSIDNADTFDPSWLLDPEK Q CREAGASVQGGIGPFGLVLD | LM C SD | FN N GS | FN N GS | AAZ29514 |
| FEHTrae | WMN DP PSG | IYHEFYQ | CWTGSV | K N RS | IEFR DP PTGW | SNMW EC PD | RIDYGT F YA | LASIDDADFPDPSWLLDPEK Q CEAGASVPGGIGPFGLVLD | LM C SD | FN N GS | FN N GS | CAD92365 |
| FEHCara | WMN DP NG | VYHFFYQ | CFSGSA | K N LSLSD | DDFR DP STAW | TSITW EC PD | RYDYG K FYA | LSNLEEAEELDPSWT-DPQL L SEMGSVSKGYPGPFGLLALAS | LM C SD | FN N YS | FN N YS | CAD49079 |
| FEHBevu | WMN DP NG | VYHLFYQ | CWSGSI | KDTSD | SSFR DP STAW | NGIW EC PD | RYDYG K FYA | IPESNYVEELDSTCT-NPQ IL CSQKASIKGRFGPFGLLTLAS | LM C SD | FN N GT | FN N GT | CAD48404 |
| | : **.. | ** **: | :* | : * | :*** . | . ** : | * * * : * | . . ****. .: | * | * .. | | |

Figura 11. Alineamiento de fructosiltransferasas, invertasas y fructan exo-hidrolasas de plantas. Las regiones conservadas descritas por Pons (8) se muestran en cajas; los residuos catalíticos (Asp94, Asp219 y Glu276) son mostrados en gris; las cisteínas conservadas involucradas en la formación de un puente disulfuro en la FEH IIa de *Cichorium intybus* producida en *P. pastoris* son resaltadas en negritas; los residuos probablemente involucrados en la formación del asa en la estructura tridimensional se muestran en la caja punteada y las asparaginas (N) susceptibles de glicosilación se resaltan en negritas.

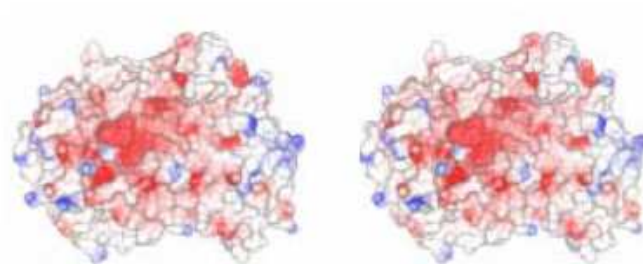
A)



B)



C)



D)

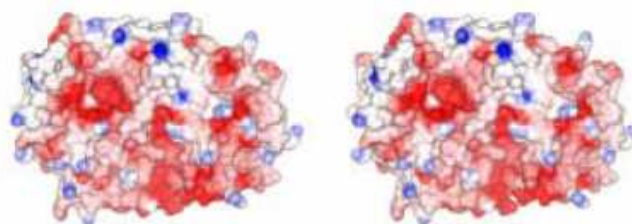


Figura 12. Modelo tridimensional de SSTAg, izquierda β -propela y derecha β -sandwich (A). Superficie con potenciales electrostáticos mostrando las diferencias en el canal que conecta la superficie entre los dominios con el sitio activo en el modelo de SSTAg (B), la FEH (código PDB 1st8) (C) y la INV (código PDB 1uyp) (D). Los potenciales electrostáticos son representados en el rango de colores entre azul (+1 volts o más) y rojo (-1 volts o menos). En los tres casos la orientación de las estructuras es idéntica.

dos Asn es muy probable que al expresarse en el mismo sistema que FEHci (*P. pastoris*) puedan establecerse en la proteína ambas glicosilaciones.

En el análisis de superficie de FEHci (código PDB 1st8) se observa un canal que conecta la superficie entre los dos dominios con el sitio activo; este canal está bloqueado en INVtm (código PDB 1uyp) (Figure 12D), mientras que en SSTAg (Figure 12B) aunque el canal no está cerrado como en INVtm, su amplitud es considerablemente reducida en comparación con FEHci (Figure 12C). Como ha sido propuesto que este canal contiene el sitio de unión a fructanas, no es sorprendente que en SSTAg e INVtm, enzimas que no sintetizan o hidrolizan fructanas, el canal tenga un arreglo diferente.

5.4 Expresión de MSSTAG en *P. pastoris* e identificación de los productos de reacción.

Para conocer la funcionalidad de la proteína codificada por SSTAg el ADNc que codifica la proteína madura putativa (MSSTAG; nucleótidos 184 al 1866) fue expresado en la cepa de *P. pastoris* X-33 mediante el vector de expresión y secreción pPICZ α A inducible con metanol. El medio de cultivo se concentró 60 veces después de separar las células y la proteína total determinada en el extracto enzimático fue de 1.35 mg/mL. Esta se analizó en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 8%(w/v) teñido con azul de Coomassie y no se observó de manera contundente la sobreexpresión de la proteína al compararse con el control negativo, un extracto preparado de la misma forma a partir de una transformante con el vector pPICZ α A vacío. El extracto enzimático fue incubado con sacarosa 300 mM a 25°C durante toda la noche para verificar la presencia de actividad fructosiltransferasa sobre la sacarosa. La presencia de 1-kestosa y glucosa como productos de reacción, así como la ausencia de actividad sobre la sacarosa en el control negativo confirmaron la actividad 1-SST en el extracto enzimático, a pesar de que la proteína no pudo identificarse con certeza mediante electroforesis.

La actividad observada en el medio de cultivo fue muy baja, lo que puede deberse a una pobre expresión de la proteína de interés, a una ineficiente secreción de la proteína al medio de cultivo o a su acumulación en forma de cuerpos de inclusión. Para determinar la causa se analizó la proteína del medio de cultivo, del extracto intracelular y de los restos celulares en geles teñidos con azul de Coomassie, pero en ningún caso fue evidente la sobreexpresión de la proteína en comparación con el control (vector pPICZ α A vacío). La ausencia de acumulación de proteína en forma de cuerpos de inclusión o soluble en el citoplasma hace pensar que no existe un problema de secreción de la proteína sino que esta no se expresa eficientemente.

Por otro lado, al analizar los productos de reacción sobre sacarosa, se observó que tanto el medio de cultivo como el extracto intracelular y los restos celulares mostraron actividad 1-SST (Figura 13), siendo mayoritaria en el medio de cultivo donde se produjeron 19.47 μ moles de 1-kestosa por mL de medio de cultivo a las 20 h de reacción, mientras que una cantidad equivalente fue detectada entre el extracto intracelular (11.89 μ moles) y los restos celulares (7.31 μ moles). No se observó glucosa en la reacción desarrollada con los restos celulares lo que puede deberse a que la ruptura de las células esta siendo ineficiente y las células sobrevivientes utilizan la glucosa como fuente de carbono (Figura 13C).

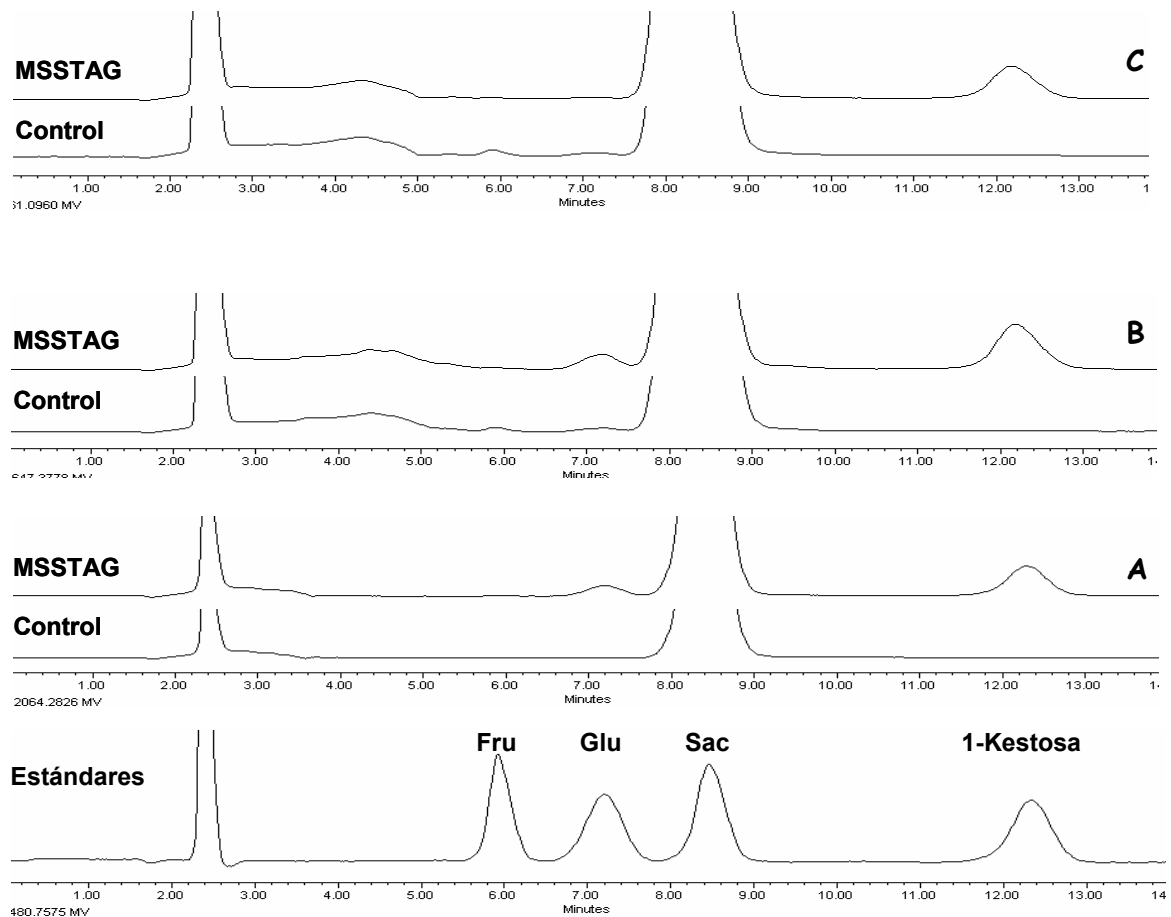


Figura 13. HPLC-IR. Análisis de los productos de reacción de la enzima recombinante (MSSTAG) a partir de soluciones de sacarosa 300 mM a las 20 horas de reacción. Medio de cultivo concentrado 60 veces (A). Extracto intracelular (B). Restos celulares (C). Fru: Fructosa, Glu: Glucosa y Sac: Sacarosa.

Considerando que el vector añade a la proteína una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo se intentó su identificación mediante inmunodetección a partir del medio de cultivo concentrado. Sin embargo, tampoco pudo identificarse la proteína de fusión, probablemente como consecuencia de la baja concentración.

5.5 Efecto de diversos parámetros de cultivo en la producción de MSSTAG en *P. pastoris*.

La actividad enzimática fue de 1.3 U/L de cultivo bajo las condiciones de producción probadas. Si bien esta actividad nos permite una caracterización bioquímica general es insuficiente para llevar a cabo ensayos de conversión y reacciones de aceptor. Para aumentar la producción de la enzima se modificaron algunas condiciones de cultivo como la temperatura de incubación, la oxigenación del cultivo, la concentración de inductor y la adición de una segunda fuente de carbono. Al estudiar el efecto de la temperatura de inducción del cultivo en la producción de MSSTAG (Figura 14A) se observó que la disminución a 27°C incrementó la producción de 1.3 U/L a 1.5 U/L. Dicho aumento no fue significativo comparado con el aumento obtenido al modificar las condiciones de aireación (4.41 U/L) (Figura 14B; Tabla 3). Este cambio se logró incrementando al doble la relación entre el volumen de cultivo y el volumen del matraz (de 1:3 a 1:6); por otro lado, el incremento en la velocidad de agitación propició la formación de espuma y no se observó cambio en la actividad medida en el medio de cultivo.

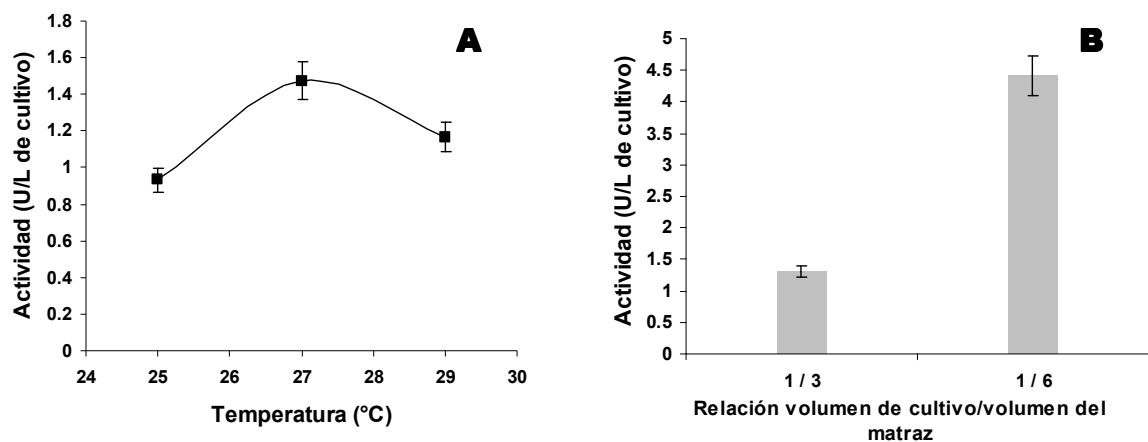


Figure 14. Efecto de la temperatura (A) y la relación entre el volumen de cultivo y el volumen del matraz (B) en la producción de MSSTAG.

A pesar de que algunas FTF vegetales han sido exitosamente producidas a mayores concentraciones de inductor (1% de metanol) (9) esta estrategia tampoco resultó favorable para la producción de MSSTAG, probablemente por el efecto tóxico que en ocasiones genera la acumulación de metanol sobre las células (10). Por otro lado, la mezcla de metanol con alguna otra fuente de carbono (glicerol, glucosa) en el medio de inducción ha conducido al aumento en la productividad de la proteína expresada en *P. pastoris* (11) y ha incrementado la rapidez con la

que se produce la proteína de interés (12). En nuestro caso, el uso de glucosa al 0.1% como fuente de carbono adicional favoreció el incremento de la producción de MSSTAG, aumentando 2.3 veces la actividad con respecto a las condiciones óptimas de temperatura y oxigenación y 7.8 veces con respecto a las condiciones bajo las cuales se produjo la enzima inicialmente (Figura 15; Tabla 3).

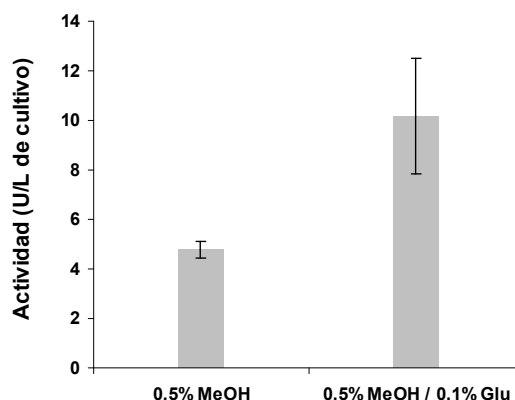


Figure 15. Efecto de la adición de una segunda fuente de carbono en la producción de MSSTAG.

Aún con las modificaciones efectuadas a las condiciones de cultivo la producción de MSSTAG es insuficiente para fines prácticos, ya que se requiere una actividad volumétrica de 2.5 U/mL (aproximadamente 250 veces la actividad del sobrenadante en condiciones optimizadas) para llevar a cabo las reacciones deceptor (ensayos de fructosilación) en condiciones estándar (0.5 U/mL de reacción).

Tabla 3. Resumen de condiciones de cultivo optimizadas para la producción de MSSTAG

| Condiciones | Actividad total (U) / L de cultivo |
|---|------------------------------------|
| 1. Temperatura: 29°C, Agitación: 180 rpm, Concentración de inductor: 0.5%, Vol. de cultivo: 1 L, Vol. del matraz: 3 L, Tiempo de inducción: 110 hrs. | 1.3 |
| 2. Temperatura: 27°C , Agitación: 180 rpm, Concentración de inductor: 0.5%, Vol. de cultivo: 0.5 L , Vol. del matraz: 3 L, Tiempo de inducción: 110 hrs. | 4.41 |
| 3. Temperatura: 27°C, Agitación: 180 rpm, Concentración de inductor: 0.5%, Vol. de cultivo: 0.5 L, Vol. del matraz: 3 L, Tiempo de inducción: 110 hrs, Fuente de carbono : Glucosa 0.1% | 10.15 |

En negrita y cursivas las condiciones modificadas respecto al ensayo anterior.

5.6 Identificación de la proteína.

Para descartar que el fracaso en la inmunodetección de MSSTAG se debiera a la baja concentración de la proteína se realizó de nuevo el ensayo a partir del extracto enzimático obtenido del medio de cultivo producido bajo las mejores condiciones (Condición 3 de la tabla

3). Previo al ensayo de inmunodetección se llevó a cabo un fraccionamiento por tamaño de las proteínas del extracto enzimático mediante una columna de exclusión molecular, lo que además eliminó los compuestos del extracto que dificultan su concentración. La fracción con la mayor actividad (fracción 34) fue concentrada 30 veces mediante filtración y el extracto se utilizó en el ensayo de inmunodetección (Figura 16).

En el ensayo se observó una proteína mayoritaria de entre 100 y 110 kDa que estuvo ausente en el control. Cabe mencionar que el fraccionamiento por tamaños permitió cargar entre 20 y 40 veces más actividad en el ensayo de inmunodetección con respecto a los realizados inicialmente, lo que prueba que la proteína no pudo detectarse debido a su baja concentración. El peso molecular es mucho mayor al teórico calculado para MSSTAG (66.2 kDa), es probable que entre 30 y 40% del peso molecular corresponda a la glicosilación que puede sufrir la proteína al ser expresada en *P. pastoris*. Por otro lado, una fina banda de 90 kDa fue observada debajo de la banda mayoritaria. Esta podría deberse a una limitada proteólisis en el extremo amino terminal de la proteína o a la presencia de diferentes glicoformas como ha sido reportado para otras proteínas expresadas en *P. pastoris* (13, 14).

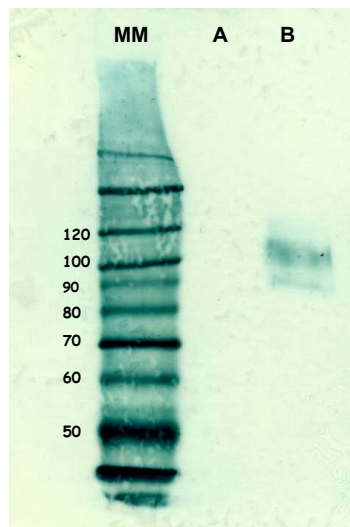


Figura 16. Identificación de MSSTAG mediante inmunodetección. Control (A). MSSTAG (B). Se cargaron 40 μ l de la fracción 34 concentrada 30 veces, el equivalente a 25 mU de actividad enzimática de MSSTAG.

5.7 Caracterización bioquímica del extracto enzimático.

La caracterización bioquímica se realizó con el medio de cultivo producido bajo las condiciones iniciales (condición 1 de la tabla 3), concentrado 60 veces. La velocidad de reacción en el extracto enzimático medida en amortiguador MES 50 mM pH 5.5 fue de 73 mU/mL,

mientras que en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 fue un 16% mayor (85 mU/mL). En adelante se utilizó amortiguador de acetatos para realizar los experimentos.

5.7.1 Temperatura y pH óptimos y estabilidad a temperatura.

La temperatura óptima determinada a pH 5.5 fue de 25 a 30°C (Figura 17A), ligeramente mayor que la reportada para la 1-SST nativa de *Helianthus tuberosus* (20 to 25°C) (15) y menor que la reportada para la FTF nativa de *A. veracruz* (37°C) (16) y las FTF fúngicas, las cuales trabajan mejor entre 50 y 60°C (17, 18). La especificidad de algunas FTF cambia de transferasa a hidrolasa cuando la temperatura de reacción incrementa; sin embargo, esta modificación en la especificidad no fue observada en MSSTAG cuando la temperatura se incrementó de 20 a 35°C. Por otro lado, el pH óptimo determinado a 30°C fue 5.5 (Figura 17B), igual al reportado para la FTF nativa de *A. veracruz* (16), la 6G-FFT de *A. officinalis* (19) y la FTF de *Aspergillus aculeatus* (18) y fue ligeramente mayor al reportado para la 1-SST de *H. tuberosus* (3.5 a 5.0) (15). Con respecto a la estabilidad térmica, el tiempo de vida media determinado a 25, 30 y 35°C fue de 246, 12.4 y 2.5 horas, respectivamente (Figura 18A). MSSTAG tiene baja estabilidad térmica, ya

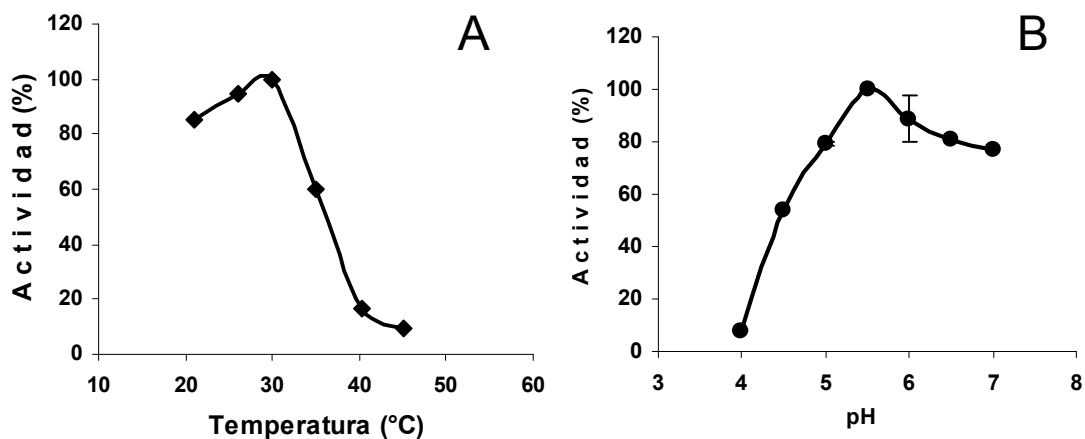


Figura 17. Perfil de actividad de MSSTAG en función de la temperatura y el pH. Actividad determinada en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 a diferentes temperaturas (A). Actividad determinada a 30°C en amortiguador de acetatos 50 mM a diferentes valores de pH (B). Las desviaciones estándar fueron menores al 3%.

que su vida media cae un orden de magnitud cada 5°C; en consecuencia, mientras a 25°C más del 90% de la actividad se mantiene después de 24 h de incubación, la actividad se pierde con rapidez arriba de los 35°C; incluso a 30°C, 60% de la actividad se pierde después de 4 horas de incubación. Sin embargo, cuando el sustrato está presente en la reacción a 30°C se observa un efecto protector del sustrato sobre la enzima ya que la pérdida de actividad no es tan drástica.

La inestabilidad de la enzima a la temperatura podría explicar el hecho de que se obtenga mayor actividad en el cultivo inducido a 27°C que en aquel inducido a 29°C (Figura 14A).

5.7.2 Parámetros cinéticos.

La velocidad de reacción obtenida a diferentes concentraciones de sacarosa fue graficada en el rango de 50 a 1530 mM (Figure 18B). Aunque MSSTAG no exhibe un comportamiento de saturación hacia la sacarosa, los parámetros cinéticos determinados mediante ensayos clásicos de velocidad inicial se ajustan a la gráfica de Lineweaver-Burk. Por lo tanto, fue posible estimar un valor de K_M aparente de 633 mM y una actividad específica de 231 mU/mg de proteína total. Este comportamiento cinético también se observa en el caso de la 1-SST nativa de *H. tuberosus* (15) y la 1-SST recombinante de *F. arundinaceae* (2).

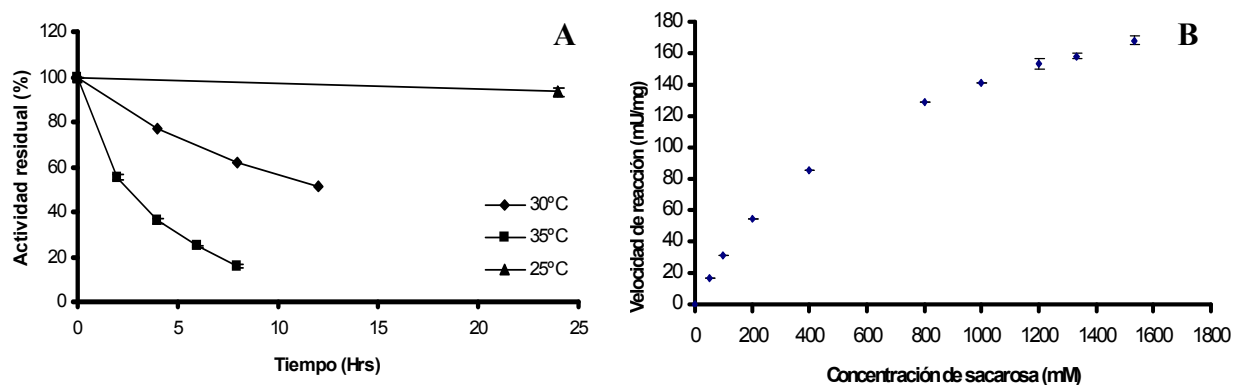


Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción de MSSTAG; el tiempo de vida media a los 25, 30 y 35°C fue de 246, 12.4 y 2.5 horas, respectivamente (A). Efecto de la concentración de sacarosa sobre la velocidad de reacción (B).

5.7.3 Especificidad.

Se han reportado como propiedades típicas de las enzimas 1-SST la producción mayoritaria de 1-kestosa, una baja producción de nistosa y una ligera actividad fructan exohidrolasa (2). La nistosa resulta de la transfructosilación de la 1-kestosa acumulada y la actividad fructan exohidrolasa se manifiesta como hidrólisis de la 1-kestosa resultando en la liberación de fructosa y sacarosa (2). En el caso de MSSTAG, la ausencia de nistosa y fructosa cuando se utiliza sacarosa como sustrato incluso a las 48 horas de reacción se debe probablemente a la baja concentración de 1-kestosa alcanzada, insuficiente para las reacciones de transfructosilación e hidrólisis (Figura 19A). Esto fue confirmado cuando la 1-kestosa fue utilizada directamente como sustrato, ya que se obtuvieron fructosa y sacarosa como productos de la actividad hidrolítica, al igual que pequeñas cantidades de nistosa (y sacarosa) como

consecuencia de la actividad transferasa (Figura 19B). A esta concentración de sustrato la velocidad de reacción observada sobre la 1-kestosa fue solo un 31% de la velocidad observada sobre la sacarosa. Estos resultados corroboran que MSSTAG tiene las propiedades típicas de una 1-SST.

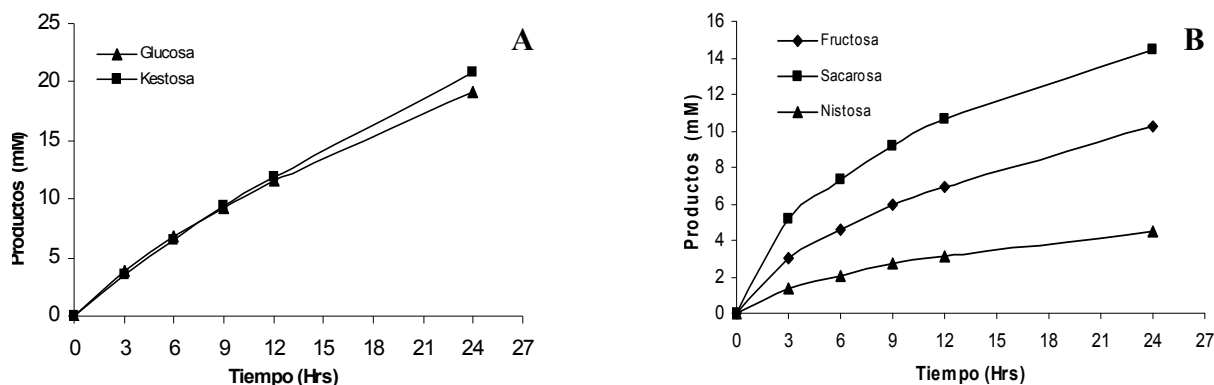


Figure 19. Productos de reacción de MSSTAG empleando como sustrato sacarosa (A) y 1-kestosa (B). En ambos casos la concentración inicial de sustrato fue 150 mM. Las desviaciones estándar fueron menores a 3%.

5.7.4 Ensayos a tiempos largos de reacción.

El consumo de sacarosa fue estudiado a lo largo del tiempo en soluciones con una concentración inicial de sacarosa de 36 g/L (Figura 20). Los resultados mostraron que cuando se ha transformado un 50% de la sacarosa la enzima ha producido casi exclusivamente 1-kestosa. La velocidad de reacción disminuye considerablemente después del 80% de conversión, lo que coincide con la máxima concentración de FOS alcanzada. En ese momento, la 1-kestosa comienza a ser sustrato de las reacciones secundarias de la enzima, siendo parcialmente hidrolizada a sacarosa y fructosa mientras que otra parte es convertida a nistosa y sacarosa mediante transfructosilación entre 2 moléculas de 1-kestosa, como indican los resultados obtenidos en los ensayos de especificidad. Después de 70 horas de reacción, cuando el 90% de la sacarosa ha sido consumida se han formado 11.7 g/L de 1-kestosa, 6.77 g/L de fructosa y 5.86 g/L de nistosa. La máxima concentración de FOS obtenida representa entre el 50 y 60% del total de azúcares, lo que es comparable a la concentración obtenida con las FTF de *Aspergillus japonicus*, *A. oryzae* CFR 202 y *A. pullulans* CFR 77 (entre 53 y 57%) cuando se emplea como sustrato sacarosa entre el 50 y 80% (20, 21). Sin embargo, MSSTAG ensayada a baja concentración de sacarosa tiene una mayor actividad hidrolasa sobre los productos que las FTF fúngicas, lo que se refleja en la drástica disminución de FOS totales después de alcanzar la concentración máxima, mientras que en las reacciones con la FTF fúngica la concentración de

FOS se mantiene aunque cambia el perfil de productos (20). En el caso de las FTF fúngicas la conversión es limitada entre el 55 y 60% debido a que la glucosa liberada durante la reacción enzimática actúa como inhibidor competitivo (21). Dicha inhibición no ha sido estudiada en las 1-SST de plantas.

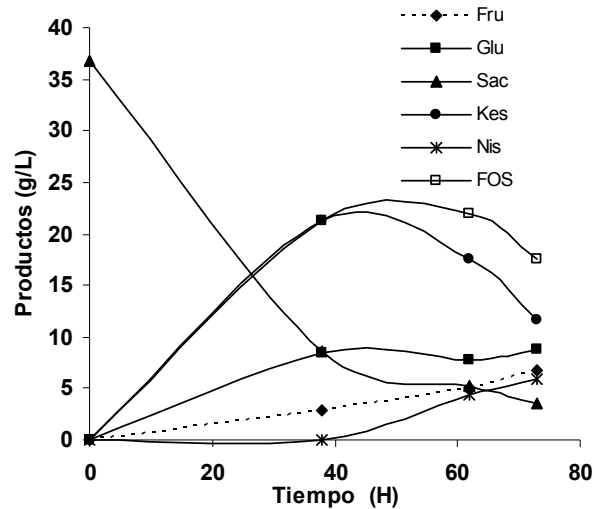


Figure 20. Producción de FOS en una solución de sacarosa de 36 g/L (aproximadamente 100 mM) utilizando 20 U/L de actividad enzimática. Los productos de reacción fueron cuantificados por HPLC-IR. Fru: Fructosa, Glu: Glucosa, Sac: Sacarosa, Kes: 1-kestosa, Nis: Nistosa, FOS: Suma de 1-kestosa y nistosa.

Por otro lado, el perfil de productos obtenido con MSSTAG es diferente al obtenido con las FTF fúngicas mencionadas. Del total de FOS producidos por MSSTAG cuando se alcanza la máxima concentración de FOS entre un 65 y 80% lo constituye la 1-kestosa y el resto es nistosa, mientras que para las FTF fúngicas del 38 al 58% es 1-kestosa y el resto es repartido entre nistosa y oligosacáridos con mayor grado de polimerización.

5.7.5 Ensayos de aceptor con MSSTAG.

Se realizaron ensayos de aceptor con 70 mU/mL de actividad enzimática en soluciones de sacarosa 300 mM y en presencia de maltosa 300 mM o xilosa 600 mM, ya que se ha demostrado que estos azúcares adicionados al medio de reacción reducen la producción de levana promoviendo la transferencia hacia el aceptor (xilosa o maltosa) cuando son utilizados en presencia de la levansacarasa de *B. subtilis* (22). Además, ha sido reportada la transferencia de fructosa a xilosa utilizando las FTF de *A. Veracruz* y *A. americana* (16, 23). Los productos observados después de 19 horas de reacción fueron los mismos que en la reacción con sacarosa (1-kestosa y glucosa) indicando que la reacción no se modificó por la presencia de maltosa o

xilosa en el medio de reacción. Sin embargo, para concluir que MSSTAG no es capaz de transferir fructosa a otra molécula diferente de la sacarosa sería deseable realizar ensayos con una mayor cantidad de enzima.

5.8 Expresión de MSSTAG en *E. coli*.

Se realizaron algunos ensayos para determinar si *E. coli* podría ser utilizado como sistema de expresión para la producción de la enzima. Se utilizaron 4 vectores diferentes (pBad/TOPO Thiofusion, pET 32, pET 22 y pCold I) que fueron expresados en la cepa Origami DE3 donde se observó una pobre expresión en la mayoría de los casos. El vector pBad/TOPO Thiofusion fue el que expresó con mayor eficiencia la proteína, sin embargo, se encontró en cuerpos de inclusión por lo que fue parcialmente purificada y sometida a replegamiento *in vitro* sin que al final haya sido posible obtener una proteína activa. Por otro lado, los vectores pET 22 y pCold I fueron coexpresados con chaperonas para favorecer el apropiado plegamiento de la proteína y su recuperación en la fracción soluble: pero esta estrategia tampoco dio resultado ya que no se observó actividad. Es probable que la glicosilación de la proteína sea indispensable para la actividad o para proporcionar estabilidad a la enzima y es por ello que *E. coli* no es un sistema apropiado de producción.

5.9 Expresión y caracterización de la 1-SST de *F. arundinacea* en *P. pastoris*.

Con la finalidad de explorar el potencial de otras enzimas de tipo 1-SST para fructosilar compuestos se solicitó una clona en *P. pastoris* X-33 de la 1-SST de *F. arundinacea* (pPICZ α C-F2). El aislamiento y clonación del ADNc que codifica para esta enzima fue reportado por Luscher en 2000 (2) y su expresión en *P. pastoris* ha resultado eficiente (24), por lo que consideramos que se trata de una buena alternativa para realizar algunos ensayos de fructosilación.

5.9.1 Producción de la enzima.

La clona pPICZ α C-F2 que contiene el ADNc que codifica la 1-SST de *F. arundinacea* fue expresada bajo las condiciones de cultivo optimizadas para producir MSSTAG (condición 2 de la tabla 3) y la actividad fue medida a 27°C y pH 6.3. La mayor actividad (13 U/L) se observó a las 24 horas de inducción.

Al inducir el cultivo con diferentes concentraciones de metanol (0.5, 0.75, 1 y 1.5% v/v) y determinar la actividad enzimática a las 24 horas de inducción se encontró que la concentración óptima de inductor para pPICZ α C-F2 es 1% (Figura 21).

Bajo estas condiciones de cultivo y sin optimizar las condiciones de medición de actividad se logra obtener 45 U/L de cultivo, 3 veces mas de lo que se obtiene en las mejores condiciones de producción de MSSTAG (10.15 U/L) (Tabla 3).

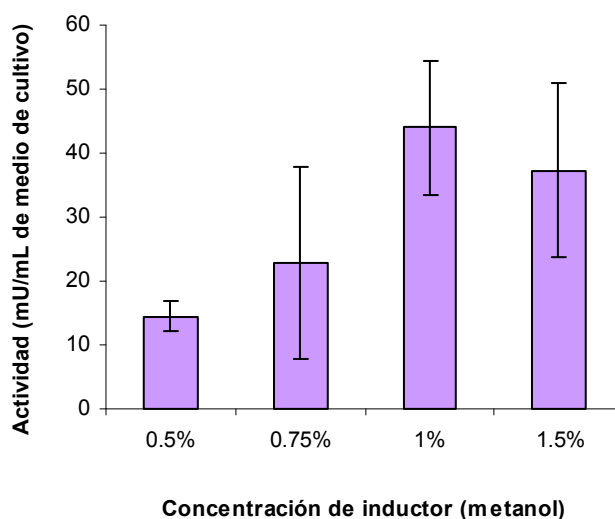


Figura 21. Actividad de pPICZ α C-F2 determinada en el medio de cultivo inducido con diferentes concentraciones de metanol (0.5 a 1.5%). La actividad fue cuantificada como aparición de azúcares reductores.

5.9.2 Precipitación de pPICZ α C-F2 a partir del medio de cultivo.

Para llevar a cabo las reacciones de aceptor en tiempos de reacción razonables fue necesario concentrar la enzima hasta una actividad volumétrica adecuada (>2.5 U/mL). La precipitación de la proteína con 70% de sulfato de amonio permitió contar con soluciones con una actividad volumétrica 8 veces mayor (3.1 U/mL) que en el medio de cultivo recuperándose un 60% de la actividad inicial (Tabla 4).

Precipitación con 70% de sulfato de amonio de la 1-SST de *Festuca arundinacea* producida en *P. pastoris*.

| | Volumen inicial (mL) | Conc. Prot. (mg/mL) | Proteína total (mg) | Actividad volumétrica | Actividad total (U) | Actividad específica (U/mg prot) | Rendimiento (%) |
|------------------|----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|----------------------------------|-----------------|
| Medio de cultivo | 250.000 | 0.101 | 25.250 | 0.362 | 90.500 | 3.584 | 100.000 |
| Fraccion 0-70 | 17.500 | 1.095 | 19.160 | 3.130 | 54.775 | 2.859 | 60.525 |
| Resto | 288.000 | 0.002 | 0.576 | 0.003 | 0.864 | 1.500 | 0.955 |

5.9.3 Temperatura y pH óptimos.

La temperatura óptima de pPicZ α C-F2 determinada a pH 5.5 fue de 40°C (Figura 22A), mientras que a 35 y 45°C se observa un 90% de la actividad máxima. Una caída drástica se observa entre los 50 y 55°C perdiéndose la actividad por completo a esta última. pPICZ α C-F2 tiene una temperatura óptima 10°C mayor a la reportada para MSSTAG (30°C) (25) y 15°C mayor que la reportada para la 1-SST nativa de *H. tuberosus* (20 to 25°C) (15). Por otro lado, el pH óptimo determinado a 30°C fue 5.5, igual al reportado para la 1-SST de *A. tequilana* (25), la 6G-FFT de *A. officinalis* (19) y la FTF de *A. aculeatus* (18).

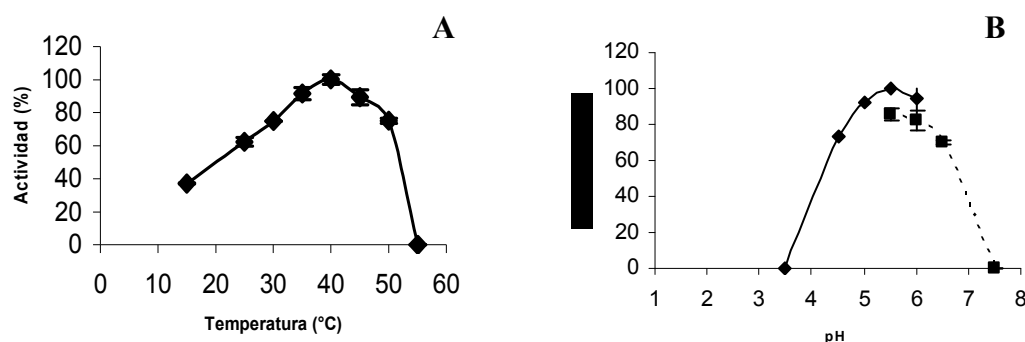


Figura 22. Perfil de actividad de pPICZ α C-F2 en función de la temperatura y el pH. Actividad determinada en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 a diferentes temperaturas (A). Actividad determinada a 35°C en amortiguador de acetatos 50 mM y amortiguador de fosfatos 50 mM (línea punteada) a diferentes valores de pH (B).

Se observó una mayor actividad en amortiguador de acetatos que en amortiguador de fosfatos donde disminuye alrededor de un 15% al ser medida a pH 5.5. Sin embargo, la actividad en amortiguador de fosfatos es menos sensible al cambio de pH entre 5.5 y 6 que en amortiguador de acetatos (Figura 22B).

5.9.4 Reacciones de aceptor.

En ensayos realizados con 0.5U de enzima por mililitro de reacción en soluciones de sacarosa 300 mM y en presencia de maltosa 300 mM, xilosa 300 mM o xilosa 600 mM, los productos observados después de 6 horas de reacción, fueron prácticamente los mismos que al utilizar solo sacarosa como sustrato (Figura 23). No se observó una disminución significativa en la producción de 1-kestosa en ninguno de los casos y solo en las reacciones con xilosa se observó la formación de un producto diferente (círculo gris), con un tiempo de retención similar al de la maltosa. Dicho producto es apenas detectado con ambas concentraciones de xilosa.

Se concluyó que pPICZ α C-F2 no es capaz de fructosilar maltosa y la reacción resultó bastante ineficiente sobre xilosa, produciéndose la misma cantidad de 1-kestosa que en la reacción con sacarosa (Figura 23) demostrando la alta especificidad de la enzima para utilizar la sacarosa como molécula donadora y aceptora, lo que conduce a la formación del trisacárido 1-kestosa con una alta especificidad.

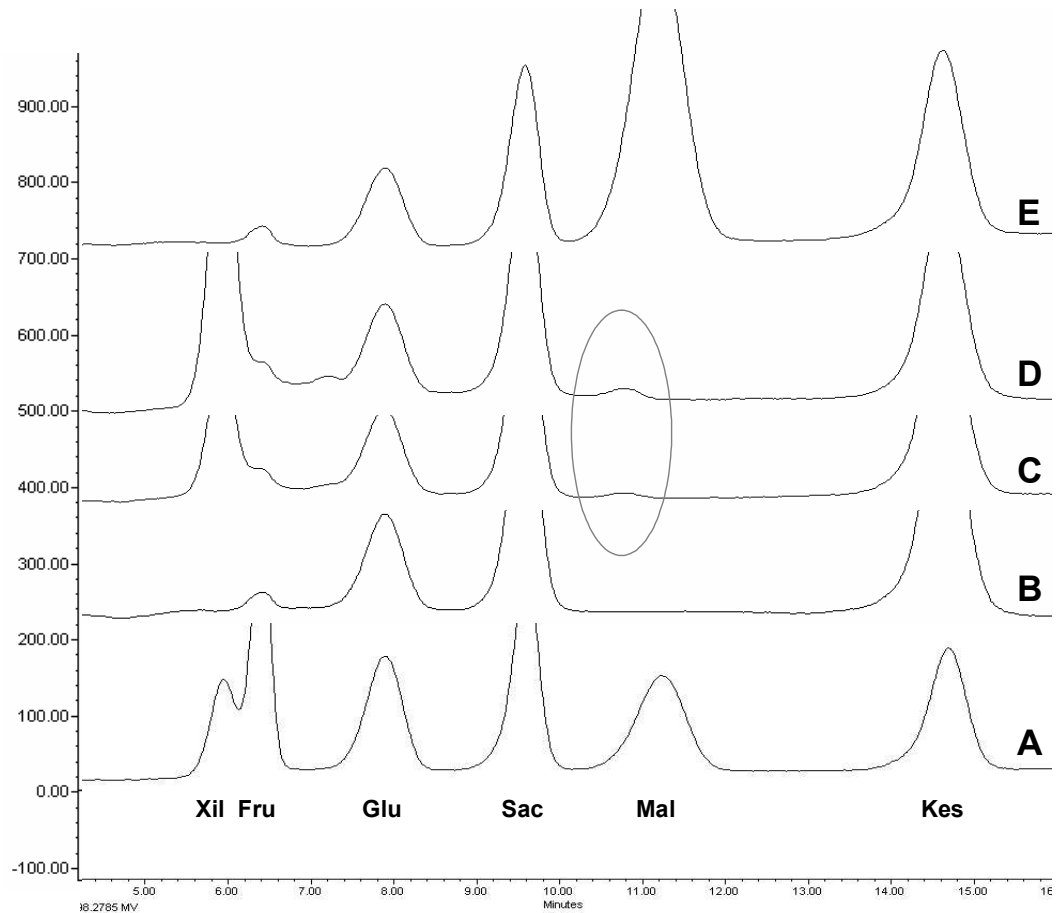


Figura 23. HPLC-IR. Análisis de los productos de las reacciones de aceptor llevadas a cabo con 0.5U de la enzima recombinante (pPicZ α C-F2) durante 6 horas. Estándares (A). Reacción con Sac 300 mM (B). Reacción con Sac 300 mM/Xil 300 mM (C). Reacción con Sac 300 mM/Xil 600 mM (D). Reacción con Sac 300 mM/Mal 300 mM (E). En un círculo gris el producto de fructosilación de la xilosa. Xil: Xilosa, Fru: Fructosa, Glu: Glucosa, Sac: Sacarosa, Mal: Maltosa, Kes: 1-Kestosa.

6. Conclusiones

Se aisló, clonó y caracterizó el ADNc que codifica para una fructosiltransferasa de *A. tequilana* Weber var. azul.

El análisis de su secuencia mediante alineamiento múltiple con otras FTF, FEH e invertasas de plantas así como la construcción de un modelo de su estructura terciaria permitió identificar los residuos catalíticos y la formación de un puente disulfuro que al parecer es una estructura conservada en todas ellas.

La comparación de la superficie con potenciales electrostáticos del modelo de MSSTAG con aquellas de las estructuras cristalográficas de la FEH IIa de *C. intybus* e invertasa de *T. maritima* permitió describir la probable diferencia de amplitud en el canal que conecta la superficie de ambos dominios con el sitio activo.

El ADNc expresado en el hospedero heterólogo *P. pastoris* permitió producir una proteína activa (MSSTAG) con propiedades similares a las de otras fructosiltransferasas vegetales y cuyo producto principal es la 1-kestosa cuando se utiliza sacarosa como sustrato, lo que demostró que la enzima es una sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST).

MSSTAG tiene una temperatura óptima (30°C) y un pH óptimo (5.5) similares a los reportados para otras FTF de plantas. Su estabilidad térmica resultó baja en comparación con las FTF fúngicas.

MSSTAG tiene mayor afinidad hacia la sacarosa como sustrato que hacia la 1-kestosa y exhibe las propiedades típicas de las enzimas 1-SST: una producción mayoritaria de 1-kestosa, una baja producción de nistosa y una ligera actividad fructan exohidrolasa.

MSSTAG convierte eficientemente la sacarosa a 1-kestosa en reacciones con una baja concentración de sustrato (36 g/L) hasta alcanzar un 80% de conversión a partir del cual la 1-kestosa es hidrolizada o convertida a nistosa.

Por otro lado, la producción de la 1-SST de *F. arundinacea* (pPICZ α C-F2) en *P. pastoris* fue mas eficiente que la producción de MSSTAG. La caracterización de algunas de sus propiedades mostró su similitud con otras FTF e INV de plantas, mientras que los ensayos de aceptor corroboraron la alta especificidad que las enzimas de tipo 1-SST tienen hacia la producción de 1-kestosa y su poca afinidad por moléculas como la xilosa o maltosa para ser utilizadas como aceptoras en la formación de otros productos.

7. Perspectivas

Optimizar la producción de la enzima en *P. pastoris* ya sea utilizando estrategias de biología molecular (optimización del uso de codones o uso de un promotor constitutivo) o estrategias de fermentación (cambiar a una cepa de lento crecimiento, probar medios minerales o combinar el inductor con otras fuentes de carbono como glicerol o sorbitol) que promuevan una mayor expresión y secreción de la enzima.

Realizar ensayos de conversión con MSSTAG y pPICZ α C-F2 a altas concentraciones de sacarosa para determinar si estas enzimas pueden ser utilizadas en la producción industrial de FOS.

Inmovilizar MSSTAG y pPICZ α C-F2 como estrategia para mejorar la estabilidad de las enzimas y comparar las características de los biocatalizadores con aquellas de las FTF fúngicas inmovilizadas para establecer si ofrece alguna ventaja en la producción de FOS.

Diseñar estudios de relación estructura-función que nos orienten a entender la razón de la especificidad de esta enzima hacia la producción de 1-kestosa y su incapacidad para producir polímero. Una primera aproximación sería la construcción de mutantes de los aminoácidos que en MSSTAG reducen el canal entre la superficie de los dominios y el sitio activo para verificar si esto cambia en alguna forma la especificidad de la enzima.

Diseñar estrategias de ingeniería de proteínas orientadas a aumentar la actividad y estabilidad de la enzima así como a modificar la capacidad de la enzima para utilizar como aceptores otras moléculas diferentes de la sacarosa.

8. Referencias

1. Hendry, G. & RK., W. (1993) The origin, distribution and evolutionary significance of fructans, *Science and Technology of Fructans*. pp. 119-139, CRC Press.
2. Lewis, B. A., Cyr, M. J. S. & Smith, F. (1967) The constitution of the fructan produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain C, *Carbohydrate Research*. 5, 194-201.
3. Van Geel-Schutten, G. H., Faber, E. J., Smit, E., Bonting, K., Smith, M. R., Ten Brink, B., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G. & Dijkhuizen, L. (1999) Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild type strain and by mutant strains, *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 3008-3014.
4. Corrigan, A. J. & Robyt, J. F. (1979) Nature of the fructan of *Streptococcus mutans* OMZ 176, *Infection and Immunity*. 26, 387-389.
5. Tanaka, T., Oi, S. & Yamamoto, T. (1980) The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase, *Journal of Biochemistry*. 87, 297-303.
6. Ghaly, A. E., Arab, F., Mahmoud, N. S. & Higgins, J. (2007) Production of levan by *Bacillus licheniformis* for use as a soil sealant in earthen manure storage structures, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 3, 47-54.
7. Doelle, H. W., Kirk, L., Crittenden, R., Toh, H. & Doelle, M. B. (1993) *Zymomonas mobilis*. Science and industrial application, *Critical Reviews in Biotechnology*. 13, 57-98.
8. Hernandez, L., Arrieta, J., Menendez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M. F. & Chambert, R. (1995) Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane, *Biochemical Journal*. 309, 113-118.
9. Osman, S. F., Fett, W. F. & Fishman, M. L. (1986) Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. glycinea, *Journal of Bacteriology*. 166, 66-71.
10. Cote, G. L. A., J. A. . (1993) Metabolism in microorganisms, part I: levan and levansucrase. *Science and Technology of Fructans*. (Suzuki M., C. N. J., ed) pp. 141-168., CRC Press, Boca Raton.
11. Denny, T. P. (1995) Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis, *Annual Review of Phytopathology* pp. 173-197
12. Bezzate, S., Aymerich, S., Chambert, R., Czarnes, S., Berge, O. & Heulin, T. (2000) Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere, *Environmental Microbiology*. 2, 333-342.
13. Burne, R. A., Wen, Z. T., Chen, Y. Y. M. & Penders, J. E. C. (1999) Regulation of expression of the fructan hydrolase gene of *Streptococcus mutans* GS-5 by induction and carbon catabolite repression, *Journal of Bacteriology*. 181, 2863-2871.
14. Bergeron, L. J. & Burne, R. A. (2001) Roles of fructosyltransferase and levansucrase of *Actinomyces naeslundii* in fructan and sucrose metabolism, *Infection and Immunity*. 69, 5395-5402.
15. Heyer, A. G. & Wendenburg, R. (2001) Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowi* IAM 2544, *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 363-370.

16. Salerno, G. L., Porchia, A. C., Vargas, W. A. & Abdian, P. L. (2004) Fructose-containing oligosaccharides: Novel compatible solutes in *Anabaena* cells exposed to salt stress, *Plant Science*. 167, 1003-1008.
17. Yun, J. W. (1996) Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation, and application, *Enzyme and Microbial Technology*. 19, 107-117.
18. Olah, A., Papp, Z. & Szentirmai, A. (1993) Inulin formation of penicillin producing industrial *Penicillium chrysogenum* strains, *Acta Microbiologica Hungarica*. 40, 379-386.
19. Kawai, G., Taniguchi, H. & Nakamura, M. (1973) Polyfructan and oligofructans synthesized from sucrose by conidia of *Aspergillus sydowi* IAM 2544, *Agricultural and Biological Chemistry*. 37, 2111-2119.
20. Vijn, I. & Smeekens, S. (1999) Fructan: More than a reserve carbohydrate?, *Plant Physiology*. 120, 351-359.
21. Pollock, C. J. (1986) TANSLEY REVIEW NO. 5 FRUCTANS AND THE METABOLISM OF SUCROSE IN VASCULAR PLANTS in pp. 1-24, Blackwell Synergy.
22. Ritsema, T. & Smeekens, S. (2003) Fructans: beneficial for plants and humans, *Current Opinion in Plant Biology*. 6, 223-230.
23. Hinch, D. K., Hellwege, E. M., Heyer, A. G. & Crowe, J. H. (2000) Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying, *European Journal of Biochemistry*. 267, 535-540.
24. Van Loo, J., Coussemant, P., de Leenheer, L., Hoebregs, H. & Smits, G. (1995) On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet, *Critical reviews in food science and nutrition*. 35, 525-552.
25. Waleckx, E., Gschaedler, A., Colonna-Ceccaldi, B. & Monsan, P. (2008) Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process, *Food Chemistry*. 108, 40-48.
26. Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics, *Journal of Nutrition*. 125, 1401-1412.
27. Kolida, S., Tuohy, K. & Gibson, G. R. (2002) Prebiotic effects of inulin and oligofructose, *British Journal of Nutrition*. 87, S193-S197.
28. Roberfroid, M. B. (2000) Prebiotics and probiotics: are they functional foods?, *American Journal of Clinical Nutrition*. 71, 1682S-1687S.
29. Roberfroid, M. B. (2001) Prebiotics: preferential substrates for specific germs?, *American Journal of Clinical Nutrition*. 73, 406S-409S.
30. Delzenne, N. M. & Kok, N. (2001) Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism, *American Journal of Clinical Nutrition*. 73.
31. Franck, A. (2006) Oligofructose-enriched inulin stimulates calcium absorption and bone mineralisation, *Nutrition Bulletin*. 31, 341-345.
32. Sauer, J., Richter, K. K. & Pool-Zobel, B. L. (2007) Products formed during fermentation of the prebiotic inulin with human gut flora enhance expression of biotransformation genes in human primary colon cells, *British Journal of Nutrition*. 97, 928-937.
33. Fukasawa, T., Murashima, K., Matsumoto, I., Hosono, A., Ohara, H., Nojiri, C., Koga, J., Kubota, H., Kanegae, M., Kaminogawa, S., Abe, K. & Kono, T. (2007) Identification of marker genes for intestinal immunomodulating effect of a fructooligosaccharide by DNA microarray analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 3174-3179.

34. Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J. & Hsieh, C. Y. (2005) Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 8211-8215.
35. Franck, A. (2002) Technological functionality of inulin and oligofructose, *British Journal of Nutrition*. 87, S287-S291.
36. Kaplan, H. & Hutkins, R. W. (2003) Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195, *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 2217-2222.
37. Morales-Arrieta, S., Rodriguez, M. E., 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, 59-67.
38. Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñera, Olvera, C., Lopez-Munguia, A. (2008) Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties., *Protein Engineering, Design and Selection*. 21, 589-595.
39. Park, J. P., Oh, T. K. & Yun, J. W. (2001) Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6, *Process Biochemistry*. 37, 471-476.
40. L'Hocine, L., Wang, Z., Jiang, B. & Xu, S. Y. (2000) Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023, *Journal of Biotechnology*. 81, 73-84.
41. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. & Prapulla, S. G. (2004) Production of fructo-oligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77, *Process Biochemistry*. 39, 753-758.
42. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. & Prapulla, S. G. (2004) Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65, 530-537.
43. Qin, Y. M., Su, J. K., Tang, J. T., Wang, J., Yao, P. J. & Wei, Y. A. (2007) Separation and purification of β -fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* GX0011, *Gao Xiao Hua Xue Gong Cheng Xue Bao/Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*. 21, 710-714.
44. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. & Prapulla, S. G. (2005) Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides, *Trends in Food Science and Technology*. 16, 442-457.
45. Vijn, I., van Dijken, A., Luscher, M., Bos, A., Smeets, E., Weisbeek, P., Wiemken, A. & Smeekens, S. (1998) Cloning of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined fructan molecules from sucrose, *Plant Physiology*. 117, 1507-1513.
46. Luscher, M., Hochstrasser, U., Boller, T. & Wiemken, A. (2000) Isolation of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from barley (*Hordeum vulgare*), *New Phytologist*. 145, 225-232.
47. Vergauwen, R., Van Laere, A. & Van den Ende, W. (2003) Properties of fructan:fructan 1-fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two asteracean plants storing greatly different types of inulin, *Plant Physiology*. 133, 391-401.
48. Van Den Ende, W., Van Laere, A., Le Roy, K., Vergauwen, R., Boogaerts, D., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. & Machado De Carvalho, M. A. (2005) Molecular cloning and characterization of a high DP fructan:fructan 1-

- fructosyltransferase from *Viguiera discolor* (Asteraceae) and its heterologous expression in *Pichia pastoris*, *Physiologia Plantarum*. 125, 419-429.
49. Vijn, I., vanDijken, A., Sprenger, N., vanDun, K., Weisbeek, P., Wiemken, A. & Smeekens, S. (1997) Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L) harbouring onion (*Allium cepa* L) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase, *Plant Journal*. 11, 387-398.
 50. Sprenger, N., Bortlik, K., Brandt, A., Boller, T. & Wiemken, A. (1995) Purification, Cloning, and Functional Expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a Key Enzyme of Fructan Synthesis in Barley, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92, 11652-11656.
 51. Henrissat, B. & Davies, G. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases, *Current Opinion in Structural Biology*. 7, 637-644.
 52. Pons, T., Hernandez, L., Batista, F. R. & Chinae, G. (2000) Prediction of a common β -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity, *Protein Science*. 9, 2285-2291.
 53. Nagem, R. A. P., Rojas, A. L., Golubev, A. M., Korneeva, O. S., Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Neustroev, K. N. & Polikarpov, I. (2004) Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: The enzyme fold and structural determinants of substrate recognition, *Journal of Molecular Biology*. 344, 471-480.
 54. Alberto, F., Bignon, C., Sulzenbacher, G., Henrissat, B. & Czjzek, M. (2004) The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases, *Journal of Biological Chemistry*. 279, 18903-18910.
 55. Verhaest, M., Van den Ende, W., Le Roy, K., De Ranter, C. J., Van Laere, A. & Rabijns, A. (2005) X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*, *Plant Journal*. 41, 400-411.
 56. Verhaest, M., Lammens, W., Le Roy, K., De Coninck, B., De Ranter, C. J., Van Laere, A., Van Den Ende, W. & Rabijns, A. (2006) X-ray diffraction structure of a cell-wall invertase from *Arabidopsis thaliana*, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 62, 1555-1563.
 57. Meng, G. Y. & Futterer, K. (2003) Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase, *Nature Structural Biology*. 10, 935-941.
 58. Martinez-Fleites, C., Ortiz-Lombardia, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E. J., Arrieta, J. G., Hernandez, L. & Davies, G. J. (2005) Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Biochemical Journal*. 390, 19-27.
 59. Chambert R., T. G. (1976) Levansucrase of *Bacillus subtilis*. Kinetic and thermodynamic aspects of transfructosylation process., *European Journal of Biochemistry*. 62.
 60. Chambert R., T. G., Dedonder R. (1974) Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*., *European Journal of Biochemistry*. 41, 285-300.
 61. Luscher, M., Hochstrasser, U., Vogel, G., Aeschbacher, R., Galati, V., Nelson, C. J., Boller, T. & Wiemken, A. (2000) Cloning and functional analysis of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from *Tall fescue*, *Plant Physiology*. 124, 1217-1227.

62. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. & Harvey, L. M. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system, *Yeast*. 22, 249-270.
63. Cregg, J. M., Vedvick, T. S. & Raschke, W. C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*, *Nature Biotechnology*. 11, 905-910.
64. Hochstrasser, U., Luscher, M., De Virgilio, C., Boller, T. & Wiemken, A. (1998) Expression of a functional barley sucrose:fructan 6-fructosyltransferase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Febs Letters*. 440, 356-360.
65. Kawakami, A. & Yoshida, M. (2002) Molecular characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose:fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 66, 2297-2305.
66. Chalmers, J., Johnson, X., Lidgett, A. & Spangenberg, G. (2003) Isolation and characterisation of a sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne*), *Journal of Plant Physiology*. 160, 1385-1391.
67. Kawakami, A. & Yoshida, M. (2005) Fructan:fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat, *Planta*. 223, 90-104.
68. Van Den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Boogaerts, D., Le Roy, K., Arckens, L. & Van Laere, A. (2006) Cloning and functional analysis of a high DP fructan:fructan 1-fructosyltransferase from *Echinops ritro* (Asteraceae): Comparison of the native and recombinant enzymes, *Journal of Experimental Botany*. 57, 775-789.
69. Ueno, K., Onodera, S., Kawakami, A., Yoshida, M. & Shiomi, N. (2005) Molecular characterization and expression of a cDNA encoding fructan:fructan 6(G)-fructosyltransferase from asparagus (*Asparagus officinalis*), *New Phytologist*. 165, 813-824.
70. Van den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J., Verhaert, P. & Van Laere, A. (2000) Cloning and functional analysis of chicory root fructan1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the enzyme, *Plant J*. 24, 447-456.
71. Sevenier, R., Hall, R. D., Van der Meer, I. M., Hakkert, H. J. C., Van Tunen, A. J. & Koops, A. J. (1998) High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet, *Nature Biotechnology*. 16, 843-846.
72. Baciú, I. E., Jordening, H. J., 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, *Journal of Biotechnology*. 117, 347-357.
73. Yamamori, A., Onodera, S., Kikuchi, M. & Shiomi, N. (2002) Two novel oligosaccharides formed by 1(F)-fructosyltransferase purified from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.), *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 66, 1419-1422.
74. Seo, E. S., Lee, J. H., Park, J. Y., Kim, D., Han, H. J. & Robyt, J. F. (2005) Enzymatic synthesis and anti-coagulant effect of salicin analogs by using the *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrase acceptor reaction, *Journal of Biotechnology*. 117, 31-38.
75. Yamamoto, Y., Takahashia, Y., Kawano, M., Iizukab, M., Matsumoto, T. & Saekia, S. (2000) Hypocholesterolemic effects of levan in rats in *Hidrocolloids* (Nishinari, K., ed) pp. 339-404, Elsevier Science & Technology,
76. Rairakhwada, D., Pal, A. K., Bhathena, Z. P., Sahu, N. P., Jha, A. & Mukherjee, S. C. (2007) Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles, *Fish and Shellfish Immunology*. 22, 477-486.

77. Cedeño, M. C. (1995) Tequila Production, *Crit Rev Biotechnol.* 15, 1-11.
78. Partida, V., Camacho, A., Martinez, A.J. (1998) Method of producing fructose syrup from agave plants, US patent 5 846 333.
79. Lopez, M. G., Mancilla-Margalli, N. A. & Mendoza-Diaz, G. (2003) Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51, 7835-7840.
80. Mancilla-Margalli, N. A. & Lopez, M. G. (2006) Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliro* species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 54, 7832-7839.
81. Satyanarayana, M. N. (1976) Biosynthesis of Oligosaccharides and Fructans in *Agave veracruz.* 1. Properties of a Partially Purified Transfructosylase, *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics.* 13, 261-266.
82. Bhatia, I. S. & Nandra, K. S. (1979) Studies on Fructosyl Transferase from *Agave americana*, *Phytochemistry.* 18, 923-927.
83. Rochester, D. E., Winer, J. A. & Shah, D. M. (1986) The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70, *EMBO J.* 5, 451-458.
84. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry.* 31, 426-428.
85. Van Den Ende, W., Van Wouterghem, D., Dewil, E., Verhaert, P., De Loof, A. & Van Laere, A. (1996) Purification and characterization of 1-SST, the key enzyme initiating fructan biosynthesis in young chicory roots (*Cichorium intybus*), *Physiologia Plantarum.* 98, 455-466.
86. Batista, F. R., Hernández, L., Fernández, J. R., Arrieta, J., Menéndez, C., Gómez, R., Tambara, 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, *Biochemical Journal.* 337, 503-506.
87. Ritsema, T., Hernandez, L., Verhaar, A., Altenbach, D., Boller, T., Wiemken, A. & Smeeckens, S. (2006) Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding box, *Plant Journal.* 48, 228-237.
88. Guarna, M. M., Lesnicki, G. J., Tam, B. M., Robinson, J., Radziminski, C. Z., Hasenwinkle, D., Boraston, A., Jarvis, E., MacGillivray, R. T. A., Turner, R. F. B. & Kilburn, D. G. (1997) On-line monitoring and control of methanol concentration in shake-flask cultures of *Pichia pastoris*, *Biotechnology and Bioengineering.* 56, 279-286.
89. McGrew, J. T., Leiske, D., Dell, B., Klinke, R., Krasts, D., Wee, S., Abbott, N., Armitage, R. & Harrington, K. (1997) Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: Use of a rapid method to detect high-level expressing transformants, *Gene.* 187, 193-200.
90. Boettner, M., Prinz, B., Holz, C., Stahl, U. & Lang, C. (2002) High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*, *Journal of Biotechnology.* 99, 51-62.
91. Bretthauer, R. K. & Castellino, F. J. (1999) Glycosylation of *Pichia pastoris* derived proteins, *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 30, 193-200.

92. Miele, R. G., Nilsen, S. L., Brito, T., Bretthauer, R. K. & Castellino, F. J. (1997) Glycosylation properties of the *Pichia pastoris* expressed recombinant kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator, *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 25, 151-157.
93. Koops, A. J. & Jonker, H. H. (1996) Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia .2. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan 1-fructosyltransferase, *Plant Physiology*. 110, 1167-1175.
94. Ghazi, I., Fernandez-Arrojo, L., Garcia-Arellano, H., Ferrer, M., Ballesteros, A. & Plou, F. J. (2007) Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*, *Journal of Biotechnology*. 128, 204-211.
95. Yang, Y. L., Wang, J. H., Teng, D. & Zhang, F. (2008) Preparation of high-purity fructo-oligosaccharides by *Aspergillus japonicus* β -fructofuranosidase and successive cultivation with yeast, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 2805-2809.
96. Altenbach, D., Nuesch, E., Ritsema, T., Boller, T. & Wiemken, A. (2005) Mutational analysis of the active center of plant fructosyltransferases: Festuca 1-SST and barley 6-SFT, *FEBS Letters*. 579, 4647-4653.
97. Avila-Fernandez, A., Olvera-Carranza, C., Rudiño-Piñera, E., Cassab, G. I., Nieto-Sotelo, J. & Lopez-Munguia, A. (2007) Molecular characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from *Agave tequilana* Weber var. azul, *Plant Science*. 173, 478-486.

Abreviaturas

| | |
|-------------------------|--|
| 1-FFT | Fructan:fructan 1-fructosiltransferasa |
| 1-SST | Sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa |
| 6G-FFT | Fructan:fructan 6G-fructosiltransferasa |
| 6-SFT | Sacarosa:fructan 6-fructosiltransferasa |
| <i>A. aculeatus</i> | <i>Aspergillus aculeatus</i> |
| <i>A. americana</i> | <i>Agave americana</i> |
| <i>A. awamori</i> | <i>Aspergillus awamori</i> |
| <i>A. cepa</i> | <i>Allium cepa</i> |
| <i>A. niger</i> | <i>Aspergillus niger</i> |
| <i>A. officinalis</i> | <i>Asparagus officinalis</i> |
| <i>A. oryzae</i> | <i>Aspergillus oryzae</i> |
| <i>A. pullulans</i> | <i>Aureobasidium pullulans</i> |
| <i>A. sativum</i> | <i>Allium sativum</i> |
| <i>A. sydowii</i> | <i>Aspergillus sydowii</i> |
| <i>A. tequilana</i> | <i>Agave tequilana</i> |
| <i>A. veracruz</i> | <i>Agave Veracruz</i> |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| <i>B. licheniformis</i> | <i>Bacillus licheniformis</i> |
| <i>B. subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> |
| BSA | Seroalbumina bovina |
| <i>C. intybus</i> | <i>Cichorium intybus</i> |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DNS | Ácido dinitrosalicílico |
| DP | Grado de polimerización |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| Elaa | Exoinulinasa de <i>Aspergillus awamori</i> |
| EPS | Polisacáridos extracelulares |
| <i>F. arundinacea</i> | <i>Festuca arundinacea</i> |

| | |
|--------------------------|--|
| FEH | Fructan exohidrolasa |
| FEHci | Fructan exohidrolasa de <i>Cichorium intybus</i> |
| FOS | Fructooligosacáridos |
| FTF | Fructosiltransferasa |
| <i>G. diazotrophicus</i> | <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> |
| GH | Glicósido hidrolasas |
| GH32 | Familia 32 de las glicósido hidrolasas |
| GH68 | Familia 68 de las glicósido hidrolasas |
| GH-J | Clan J de las glicósido hidrolasas |
| <i>H. tuberosus</i> | <i>Helianthus tuberosus</i> |
| HPLC-IR | Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de índice de refracción. |
| INV | Invertasa |
| INVtm | Invertasa de <i>Thermotoga maritima</i> |
| <i>L. mesenteroides</i> | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| <i>L. perenne</i> | <i>Lolium perenne</i> |
| MES | Ácido 3-(N-) morfolinoetanesulfónico |
| MSSTAG | 1-SST madura putativa de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul |
| ORF | Marco de lectura abierto (open reading frame) |
| <i>P. pastoris</i> | <i>Pichia pastoris</i> |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction) |
| pPicZ α C-F2 | 1-SST de <i>Festuca arundinacea</i> producida en <i>Pichia pastoris</i> |
| RT-PCR | Reacción de retrotranscripción y amplificación (reverse transcription polymerase chain reaction) |
| <i>S. mutans</i> | <i>Streptococcus mutans</i> |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SACB | Levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i> |
| SSTAg | Secuencia que codifica para la 1-SST de <i>Agave tequilana</i> Weber var. azul |
| <i>T. aestivum</i> | <i>Triticum aestivum</i> |
| <i>T. maritima</i> | <i>Thermotoga maritima</i> |

Molecular characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from *Agave tequilana* Weber var. azul.

Ángela Ávila-Fernández, Clarita Olvera-Carranza, Enrique Rudiño-Piñera, Gladys Iliana Cassab, Jorge Nieto-Sotelo, Agustín López-Munguía *

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3 Cuernavaca, Morelos 62250, México

Received 30 March 2007; received in revised form 11 July 2007; accepted 24 July 2007

Available online 7 August 2007

Abstract

A full-length cDNA encoding for 1-SST in *Agave tequilana* Weber var. azul. was isolated, cloned and expressed in *Pichia pastoris*. The heterologous protein, with a molecular mass of 75 kDa, shows identity with different plant fructosyltransferases and invertases, which belong to the glycoside hydrolase 32 family. When sucrose was used as substrate, only the transference products 1-kestose and glucose were identified, while from 1-kestose, nystose and fructose were obtained as transference and hydrolysis products respectively, with sucrose as a secondary product. The enzyme has a low turnover number (260 min^{-1}) at 30 °C, with optimal stability at 25 °C and pH 5.5. In order to identify the probable residues involved in the active site, a three-dimensional model was built using the fructan 1-exohydrolase IIa from *Cichorium intybus* (PDB entry 1st8) as template. This is the first report concerning cloning and expression of an *Agave* fructosyltransferase.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Agave; Fructan; Fructooligosaccharides; 1-Kestose; 1-SST

1. Introduction

Fructosyltransferases (FTFs) are enzymes that catalyze the transfer of the fructosyl residue from sucrose to another sucrose molecule or a growing fructose chain. FTFs are present in bacteria, fungi and plants [1], where they are implicated in the biosynthesis of fructans (levan, inulin, graminan, phlein, etc.). In plants, fructans play an important role as a storage carbohydrate, and are common in monocotyledons and in 15% of the flowering plant species. Among plant FTFs, those from Asparagales (previously classified as Liliales), Poales and Asterales orders have been the most studied [2–4]. The presence of different plant FTFs has been reported: sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST), initiates fructan synthesis catalyzing the transfer of a fructosyl residue from sucrose to another sucrose molecule resulting in the formation of the trisaccharide 1-kestose [5,6]; fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT), elongates the fructosyl chain [7,8]; fructan:fructan 6G-fructosyltransferase (6-GFT), implicated in the inulin neoseris synthesis [9]; and

sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT), catalyzes the formation and extension of β 2–6 linked fructans, typical of grasses [10]. Plant and fungal FTFs belong to family 32 of the glycoside hydrolases together with levanases, inulinases and invertases [11], according to the classification by Henrissat and Davies [12] (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>). Recently, the first structure of a fructan related enzyme (PDB entry 1st8) was determined [13], this fructan 1-exohydrolase IIa from *Cichorium intybus* also belongs to family 32 and was reported as a two-domain enzyme: the N-terminal domain consisting of a five bladed β -propeller fold connected to the second domain which presents a β -sandwich fold, with the putative catalytic site located in the β -propeller domain and constituted by two aspartic and one glutamic residues, all conserved within members of family 32. The authors suggest that there is a fructan binding site in the cleft formed between the two domains.

Among plants that are industrially important due to their fructan content, chicory and Jerusalem artichoke are the most studied. Agaves are particularly important plants in mexican agroindustry as numerous distilled beverages are obtained from a wide variety of species by fermentation and distillation of musts after inulin hydrolysis [14]. Among these beverages, *Tequila* has had international acceptance even before the

* Corresponding author. Tel.: +52 777 3291673; fax: +52 777 3172388.

E-mail address: agustin@ibt.unam.mx (A. López-Munguía).

recognition of origin certification of the beverage by the World Intellectual Property Organization (WIPO) in 1978. *Tequila* is produced from *Agave tequilana* Weber var. azul. juice, but beverages such as *mezcal*, *sotol*, *bacanora* and *raicilla*, also obtained from *Agave* species are worth mentioning. Fructans present in *A. tequilana* have a DP ranging from 3 to 29 and contain mainly $\beta(2-1)$ linkages in their linear chain, but also $\beta(2-6)$ linkages in branching moieties as was recently reported [15]. An enzyme involved in fructan biosynthesis in *Agave veracruz* has been partially purified and some of its properties analyzed [16]. Although fructose from *Agave* inulin has been traditionally used as the carbon source for fermentation, its commercialization as fructose syrups using *Agave* extracts has also been proposed [17]. Inulin and fructooligosaccharides (FOS) are considered as prebiotics with demonstrated cholesterol-lowering activity [18] and effect on calcium absorption and bone mineralization [19], due to the selective stimulation of the microflora in the colon with beneficial effects to the host [20]. It has been demonstrated that among FOS, 1-kestose and nystose have the highest prebiotic activity [21]. Therefore, its selective production in any given system using 1-SST from plants and sucrose as raw material could be advantageous with respect to its non-specific process such as the acid hydrolysis of inulin.

In this study, we describe the isolation and molecular characterization as well as the heterologous expression, functional and biochemical characterization of 1-SST from *A. tequilana* Weber var. azul. Up to now and in spite of their economical importance there is a lack of reports concerning enzymes implicated in fructan biosynthesis in *Agavaceae*, particularly in *A. tequilana* Weber. This is the first report of cloning and characterization of FTFs implicated in fructan synthesis in *Agave*.

2. Materials and methods

2.1. Cloning of *A. tequilana* Weber var. azul. 1-SST cDNA

2.1.1. RNA isolation

A. tequilana Weber var. azul. plants 30 cm height were used for RNA isolation. Plants were removed from the pot and the leaves carefully cut off around the pine (base leaves). Once all the leaves were removed the pine was cut in small pieces, placed in a sterilized 5% sucrose solution and illuminated for 14 h to induce fructosyltransferases mRNA. Tissue was rinse with water DEPC-treated (0.1%), frozen in liquid N₂, and ground. Total RNA was then isolated using the Aurum Total RNA Mini kit (Bio-Rad).

2.1.2. cDNA library construction

In a parallel project, looking for heat shocked proteins a cDNA library was constructed. The source of total RNA for the library construction were leaves of *in vitro* grown *A. tequilana* seedlings that were heat-shocked for 4 h at 40 °C in an illuminated growth chamber. RNA was isolated following the method of Rochester et al. [22]. Polyadenylated mRNA was isolated using the polyA tract mRNA isolation systems

(Promega). To construct the cDNA library, the Smart cDNA library construction system (Clontech) was utilized. To synthesize the first-strand cDNA 1 μ g of polyA⁺ RNA and Powerscript reverse transcriptase (Clontech) were used. cDNA amplification was made by long distance polymerase chain reaction (LD PCR). The cDNA was digested with SfiI and size fractionated with a Chroma spin 400 column. The cDNA was ligated to λ -TriplEx2 vector and packaged with Zap cDNA Gigapack III (Stratagene). A total of 2×10^8 recombinants were obtained. As FTFs were not sufficiently represented in this library, it was not possible to isolate 1-SST cDNA by hybridization with a random ³²P-labeled 1200 bp fragment from *Allium cepa* 1-SST cDNA, which was kindly provided by Professor Sjeff Smeekens. However, the library was useful for the 5' end amplification by PCR (see Section 2.1.5).

2.1.3. RT-PCR and 3'RACE

cDNA was synthesized from two micrograms of total RNA using the 3'RACE adapter supplied with the FirstChoice RLM-RACE kit (Ambion) and the enzyme M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). PCR was carried out with the forward primer DC- (CCA TGG TTC CTG ACC ATT GGT ACG) and the reverse primer 2- (TCG GTC TCN CCA ACR TAN SCC CA, where N = A, C, G or T; R = A or G and S = C or G), both designed from conserved regions observed on the sequences alignment of 1-SST from *A. cepa*, *Allium sativum*, *Cynara scolymus*, *C. intybus*, *Festuca arundinacea*, *Helianthus tuberosus*, *Lolium perenne*, *Taraxacum officinale*, and *Triticum aestivum* (GenBank accession nos. CAA06838, AAM21931, CAA70855, AAB58909, CAC05261, AJ009757, AAO86693, CAB60153, BAB82470). All PCR reactions were carried out using Expand High Fidelity PCR System (Roche), according to the manufacturer instructions. 3'-End was amplified by nested PCR using the FirstChoice RLM-RACE kit (Ambion) and the forward primers *GSP3'ou*- (ATC GAC GTT GGG GTT GGA TTG AGG) and *GSP3'in*- (CTA CGA TCA GGA GAA GCA TAG GCG), according to the user's manual.

2.1.4. 5'-End amplification

5'-End was obtained screening an *A. tequilana* cDNA lambda library by nested PCR using the reverse primers *GSP5'ou*- (GTG TAC AAC ACC ACA ATC CGA CCG) and *GSP5'in*-(AAC GTG GAG TAG CCC GAC CAG ACG) in combination with one vector specific forward primer *5'Trip*- (TCC GAG ATC TGG ACG AGC). Primary PCR was performed using as template 2.5 μ L of the *A. tequilana* cDNA lambda library in a reaction volume of 25 μ L, while the secondary PCR was carried out with 0.15 μ L of the primary product in the same reaction volume.

2.1.5. Full-length cDNA cloning

To amplify the coding region from the *A. tequilana* cDNA lambda library, PCR was carried out with the primers *Againi*- (ATC GAC GTT GGG GTT GGA TTG AGG) and *Agafin*- (CTA CGA TCA GGA GAA GCA TAG GCG). The PCR product was cloned into the pBAD/TOPO ThioFusion vector, transformed and conserved in *E. coli* DH5 α (Invitrogen).

2.2. Expression of 1-SST cDNA in *P. pastoris*

Specific primers were designed to amplify the putative mature 1-SST (MSSTAG). An Eco RI restriction site was created in the forward primer *PromadpPicZaA*- (CCG GAA TTC ATG AGA TTG AGA GAG AAC G) and a Xba I restriction site in the reverse primer *AgafinpPicZaA*- (GCT CTA GAG GAG CCA CCA AGC CAG GG). The amplification product was purified with the High Pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics), digested with Eco RI (New England Biolabs) and Xba I (Roche Biochemical) restriction enzymes, and ligated with T4 DNA ligase (New England Biolabs) into the secretory expression vector pPICZ α A supplied with the EasySelect *Pichia* Expression Kit (Invitrogen) behind the α -factor, according to the manufacturer's instructions. Chemically competent *P. pastoris* X-33 cells were prepared with the *Pichia* EasyComp kit and transformed with 5 μ g of Sac I linearized vector containing the insert; the transformed cells were selected on YPD/Zeocin (100 mg/L) plates, following the instructions provided by the supplier.

In order to produce the recombinant enzyme a *P. pastoris* (X-33) single transformant was inoculated in 200 mL of BMGY medium and incubated at 29 °C and 180 rpm until an OD₆₀₀ of 3.0 was reached. Cells were harvested by centrifugation and resuspended to an OD₆₀₀ of 0.5 in the induction medium BMMY and incubated during 110 h. Every 24 h methanol was added to obtain a concentration of 0.5% (v/v).

2.3. Enzymatic extract preparation

After 110 h of incubation the *P. pastoris* culture medium was centrifuged; 50 mL of the supernatant were concentrated 60-fold, desalted, and equilibrated against 50 mM MES buffer (NaOH, pH 5.5), 50 mM sodium acetate buffer pH 5.5 or 50 mM sodium citrate buffer pH 5.5, by filtration on Amicon ULTRA-4 concentrators 30,000 MWCO (Millipore).

2.4. Protein quantification

Total protein in the enzymatic extract was measured by the Protein Assay (Bio-Rad) based on the method of Bradford using bovine serum albumin (BSA) as standard. The amount of MSSTAG with respect to total protein was estimated by densitometric quantification of Coomassie stained SDS-polyacrylamide gels, using BSA ranging from 0.25 to 2 μ g as standard. Gels were scanned and densitometric volume was calculated for the 75 kDa protein band by ImageJ program.

2.5. Enzymatic characterization of recombinant *Agave 1-SST* (MSSTAG)

2.5.1. Standard activity assay

1-SST activity was assayed at pH 5.5 in two different buffers, 50 mM MES buffer and 50 mM acetate buffer at 30 °C, by measuring the production rate of 1-kestose from 300 mM sucrose solutions in 90 μ L reactions containing 30 μ L of enzymatic extract. Samples of 100 μ L were withdrawn at 3 h

time intervals and heated to 94 °C during 7 min to inactivate the enzyme. In order to measure 1-kestose, samples were centrifuged and analyzed by HPLC in a Waters 510 instrument equipped with a refraction index detector (Waters 410) and using a Prevail Carbohydrate ES column (Part. No. 35101 Alltech) at room temperature and using a 68:32 acetonitrile:water mixture as eluent at a flow rate of 1.0 ml/min. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme producing 1 μ mol of 1-kestose per minute.

2.5.2. Effect of temperature and pH

The effect of temperature on the activity was evaluated with the standard activity assay at pH 5.5 and different temperatures in the 20–45 °C range, while the effect of pH was determined at 30 °C in 50 mM citrate buffer with pH values varying in the 5.0–6.0 range.

2.5.3. Thermal stability

Thermal stability was evaluated incubating the enzyme at pH 5.5 in 50 mM sodium acetate buffer at 25, 30, and 35 °C. 100 μ L samples of the incubated enzyme extract were withdrawn at 4 h time intervals to assay the residual activity using the standard activity assay.

2.5.4. Kinetic properties

Kinetic parameters (K_M and V_{max}) were determined from rate measurements using sucrose concentrations from 50 to 1333 mM. The data was processed following the classical Lineweaver–Burk type plots. All the measurements were performed in duplicate.

2.5.5. Specificity

The specificity towards substrate was determined by comparison of the enzymatic reaction rates obtained when 150 mM sucrose or 1-kestose were used as substrates in the standard activity assay conditions. The corresponding products were determined by HPLC.

2.6. Nucleotide sequence accession number

The sequence of the entire 1-SST cDNA gene has been assigned with the GenBank accession number DQ535031 (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank).

3. Results

3.1. Cloning of *A. tequilana* Weber var. azul. 1-SST cDNA

A 662 bp partial cDNA fragment was amplified from total RNA isolated from juvenile plants by RT-PCR using a conserved forward primer (DC) and a degenerated reverse primer (2) designed from the conserved regions observed in the multiple nucleotide sequence alignment (Fig. 1). Several primers were designed with this strategy but only the DC-2 combination amplified a fragment of the expected size. The fragment showed identity with several plant fructosyltransferases and invertases by BLASTX analysis and was used to

| | DC | | | | | | | | | | 2 | | | | | | | | GenBank | | | |
|----------|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|----|------|----------|
| | 142 | L | R | P | D | H | W | Y | 148 | 370 | W | G | Y | V | G | E | V | 376 | Accessión no. | | | |
| SSTAg | 422 | CT | CTG | AGG | CCG | GAC | CAC | TGG | TAC | G | 445 | 1108 | TGG | GGA | TAC | GTT | GGG | GAG | GTC | GA | 1130 | DQ535031 |
| SSTAllce | | CC | ATG | GTA | CCC | GAC | CAC | TGG | TAT | G | | | TGG | GGT | TAT | GTT | GGG | GAG | GTT | GA | | CAA06838 |
| SSTAllsa | | CC | ATG | GTG | CCT | GAC | CAT | TGG | TAC | G | | | TGG | GGT | TAT | GTT | GGA | GAG | GTT | GA | | AAM21931 |
| SSTFear | | CC | ATG | GTT | CCC | GAC | CAG | TGG | TAC | G | | | TGG | GCC | TAC | ATC | GGC | GAG | ACC | GA | | CAA70855 |
| SSTLope | | CC | ATG | GTT | CCC | GAC | CAG | TGG | TAC | G | | | TGG | GCA | TAC | ATC | GGC | GAG | ACC | GA | | AAB58909 |
| SSTTrae | | CC | TIG | GTG | CCC | GAC | CAG | TGG | TAC | G | | | TGG | GCG | TAC | GTC | GGC | GAG | ACC | GA | | CAC05261 |
| SSTCiin | | CC | ATG | GTC | CCG | GAC | CAT | TGG | TAC | G | | | TGG | GGT | TAT | GTT | GGT | GAA | ACC | GA | | AJ009757 |
| SSTTaof | | CT | ATG | GTT | CCA | GAT | CAC | TGG | TAC | G | | | TGG | GGT | TAT | GTT | GGT | GAA | ACC | GA | | AA086693 |
| SSTCysc | | CC | ATG | GTC | CCT | GAC | CAA | TGG | TAC | G | | | TGG | GGT | TAC | GTT | GGA | GAA | ACC | GA | | CAB60153 |
| SSTHetu | | CC | ATG | GTT | CCT | GAC | CAT | TGG | TAC | G | | | TGG | GCC | TAT | GTT | GGA | GAA | ACC | GA | | BAB82470 |
| | | * | ** | ** | ** | ** | ** | ** | ** | * | | | *** | * | ** | * | ** | ** | ** | ** | | |

Fig. 1. Conserved region selected for primer design from a multiple nucleotide sequence alignment of 1-SSTs.

design divergent specific primers to obtain the 5'-end (*GSP5'ou* and *GSP5'in*) and 3'-end (*GSP3'ou* and *GSP3'in*). A second fragment of 1047 bp was obtained by 3'RACE. It was formed by a coding region of 787 bp corresponding to the 3'-end, followed by a 260 bp 3'UTR region. Finally, in order to isolate the 5'end, an *A. tequilana* cDNA lambda library was screened by nested PCR with gene specific primers (*GSP5'ou* and *GSP5'in*) and a vector specific primer (*5'Trip*). The resulting 568 bp fragment contained a 5'UTR region of 89 bp followed by a coding region of 479 bp corresponding to the 5'-end. Specific primers (*Againi* and *Agafin*) were designed based on the complete sequence, and the ORF was amplified by PCR from the cDNA lambda library, cloned into the pBAD/TOPO ThioFusion vector, transformed and conserved in *E. coli* DH5α.

3.2. cDNA sequence analysis

The analysis of the 2212 bp of the full-length cDNA sequence showed one ORF starting at position 90 and ending at position 1952. This ORF encodes for a 621 amino acids protein with a theoretical molecular mass of 69,799 Da and a *pI* of 5.83, that was named SSTAg. A BLASTP search carried out with

SSTAg showed identity with different plant FTFs and invertases [*A. cepa* 1-SST (70%), *A. sativum* 1-SST (68%), *Asparagus officinalis* 6-GFT (59%), *A. cepa* 6-GFT (59%), *A. cepa* invertase (66%) and *A. officinalis* invertase (59%)]. The SSTAg was classified into the glycoside hydrolases family 32 (GH32) by the NCBI Conserved Domain Search program. Seven putative *N*-glycosylation sites (NXT/S) were identified in the primary sequence. The N-terminal of SSTAg was compared with the sequence of known 1-SSTs mature proteins already reported [3,23,24]. This analysis suggests that SSTAg has a 61 amino acids putative signal peptide, the mature protein starts in nucleotide 184 counting from the beginning of the ORF. From a multiple alignment of different plant fructosyltransferases, invertases and fructan exohydrolases, the 6 conserved regions already described in plants and fungi FTFs were found [11] (Fig. 2). The most probable catalytic residues (Asp94 and Glu276), two important residues involved in the reaction mechanism (Asp219 and Cys277), and two cysteine residues (Cys 471 and Cys519) probably involved in a disulphide bridge are also identified. An additional observation can be derived from Fig. 2, as around the conserved residues, the similarity of *A. cepa* and *A. tequilana* SSTs is rather high; it

| | 91 | 104 | 153 | 187 | 215 | 274 | 347 | 484 | 517 | 589 | GenBank |
|--------------|------------|------------|--------------|-------------|------------------|---------------|-----------------|--|-------------|-------------|---------------|
| | FQADPNAs97 | 104WYHFFYQ | 153VWSGYS158 | 187VNLSD151 | 215HDFRDPFPVW224 | 274VGMLECD279 | 347RYDWGKFYA355 | 484VDE-KAIEATAEA--DVTYNCSTSSGGAANRGLV688 | 517HFCQD521 | 589FNNAT593 | Accession no. |
| SSTAg | WMNDPFG | WYHFFYQ | VMTGSA | ADPSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGIFYA | IDT-ESLEKTAES-NEE-FTCSSSGGAAQRGALGP | SECS | FNNAT | BAA01107 |
| InvVira | WMNDPFG | WYHFFYQ | VMTGSA | ADPSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGIFYA | VDQ-NMLKQVDGS-NAT-YICSKSGSGGERGALGP | FFCN | FNNAT | CAJ19056 |
| INVlYes | WMNDPFG | WYHFFYQ | VMTGSA | ANLSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RLDYGKYFA | VDE-TLLETTSSE-HDAGYICSTNSGGAGTRGSLGP | HECAY | FNNAT | AAD10239 |
| INVOrsa | FMADPNA | WYHFFYQ | VWSGYA | ADPSD | KDFRDPTTAW | VGMLECD | RYDYGKYFA | INK-EAVDVAVVEA--DVTYNCSTSSGGAHRLLGP | HECQD | FNNAT | CAA06838 |
| SSTAllce | FMADPNA | WYHFFYQ | VWSGYA | ADPSD | HDFRDPTTAW | VGMLECD | RYDYGKYFA | ING-EAVDVAVVEA--DVTYNCSTSSGGAHRLLGP | HECQD | FNNAT | AAM21931 |
| SSTAllsa | FMADPNA | WYHFFYQ | VWSGYA | ADPSD | KDFRDPTTAW | VGMWECVD | RYDYGKYFA | ISS-EALEAVKEA--DVSYNCSSTSSGGAERVLGP | HECQD | FNNAT | CAA06839 |
| InvAllce | WMNDPFG | WYHFFYQ | VMTGSA | ADQSD | KDFRDPTTAW | VGMWECVD | RYDYGKYFA | INE-EISLSAEAEANGTWMYCSGGGAAERLLGP | HECQD | FNNAT | AAB71136 |
| InvAsof | WMNDPFG | WYHFFYQ | VMTGSA | ADLSD | TDFRDPTTAW | VGMWECVD | RYDYGKYFA | MDK-DALEATAEA--DIGYNCSSSSGGAVSRGVLGP | HLCHD | FNNAT | BAD89564 |
| 6-G-FTTAsof | YMNDFSG | WYHFFYQ | VMTGSI | ADPSD | TDFRDPTTAW | VGMWECVE | RYDYGKYFA | ISK-EALEATAEA--DVSYNCSSTSSGGAIRGTG | HECQD | FNNAT | CAA69170 |
| 6-G-FTTAllce | YMNDFSG | WYHFFYQ | VMTGSI | ADPSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | LNS-SDVDALTEA--DVSYNCSSTSSGGAIRGTG | HECHD | FNNAT | CAE51350 |
| SSTFear | YMNDFSG | WYHFFYQ | VMTGSI | ADPSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | LNS-SDVDALTEA--DVSYNCSSTSSGGAIRGTG | HECHD | FNNAT | AA086693 |
| SSTLope | YMNDFSG | WYHFFYQ | VMTGSI | ADPSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | LNS-SDVDALTEA--DVSYNCSSTSSGGAIRGTG | HECHD | FNNAT | AAM13671 |
| 6-G-FTTLope | YMNDFSG | WYHFFYQ | VMTGSI | ADPSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | IDA-SALEALNEA--DVSYNCSSTSSGGAIRGTG | HECHD | FNNAT | BAD72792 |
| SSTTrae | YQNDPFG | WYHFFYQ | VLTGSI | ADPSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | INA-SVLEALNEV--DVSYNCSSTSSGGAIRGTG | HECHD | FNNAT | BAD72792 |
| 1FFTTrae | YQNDPFG | WYHFFYQ | VLTGSI | ADPSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | IDA-SALEALNEA--DVSYNCSSTSSGGAIRGTG | HECHD | FNNAT | AB029887 |
| 6-SFTTrae | YMSDFNG | WYHFFYQ | VLSGSM | ADPTD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | LDA-SAVAALNEA--DVSYNCSSTSSGGAIRGTG | SECDQ | FNNAT | AF211253 |
| 6-SFTAgrc | YMSDFNG | WYHFFYQ | VLSGSM | ADPND | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | LNA-SAVAALNEA--DVSYNCSSTSSGGAIRGTG | SECDN | FNNAT | AF192394 |
| 6-SFTPoase | FMSDFNG | WYHFFYQ | VLSGSI | AEFND | MDFRDPTTAW | TGMWECMD | RYDYGKYFA | LDP-LDVVAKEA--DVSYNCSSTSSGGAIRGTG | HECHD | FNNAT | CAD58681 |
| INVlote | WMNDPFG | WYHFFYQ | AMSGSA | SDPSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | IDG-ATLEASVEA--DLGYNCSSTSGGTGFRGVLGP | FFCQD | FNNAT | CAA64953 |
| INVlTuges | WMNDPFG | WYHFFYQ | ALTGSA | EDVDD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | IDQ-RKLQSTLEA--DVLNFCSTSSGGAIRGTG | YECAD | FNNAT | AAB58909 |
| SSTCiin | FISDPDG | WYHFFYQ | VMTGSA | VNSSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | IDB-KMLESTLEA--DVLNFCSTSSGGAIRGTG | YECAD | FNNAT | CAB60153 |
| SSTTaof | FISDPDG | WYHFFYQ | VMTGSA | VNSSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | IDB-KMLESTLEA--DVLNFCSTSSGGAIRGTG | YECAD | FNNAT | AJ009757 |
| SSTHetu | FISDPDG | WYHFFYQ | VMTGSA | VNSSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | VDQ-TMLESTLEA--DVLNFCSTSSGGAIRGTG | YECAD | FNNAT | CAA70855 |
| SSTCysc | YISDPDG | WYHFFYQ | VMTGSA | VNSSD | KDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | VDQ-TMLESTLEA--DVLNFCSTSSGGAIRGTG | YECAD | FNNAT | CAA04120 |
| 1ffTCysc | FICYDPNG | WYHFFYQ | VLSGST | VNASD | TDYRDPTTAW | TMWECVD | RYDYGKYFA | VEQ-ETFMRTSDT--NDEYCNSTSSGGAIRGTG | HECTD | FNNAT | AAD00558 |
| 1ffTCiin | FICYDPNG | WYHFFYQ | VLSGST | LNTSD | KDYRDPTTAW | TMWECVD | RYDYGKYFA | LEGLKEAEVLDLTLVD-PQALCENRGAASRVLGP | LMCS | FNNAT | AA229514 |
| FEHIIa | WMNDPFG | WYHFFYQ | CWSGSA | KNLSD | QDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | LTSDINADTDFPSSMLLDPEKHCGEGAGAVFGVGLGP | LMCS | FNNAT | CAD92365 |
| FEHLope | WMNDPFG | WYHFFYQ | CWTGSA | KNKS | QDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | LSMIEAEELDPSWT-DPQLICSEMVSCKGKYGP | LMCS | FNNAT | CAD94079 |
| FEHTrae | WMNDPFG | WYHFFYQ | CWTGSA | KNKS | QDFRDPTTAW | TGMWECVD | RYDYGKYFA | IPESMYVELDSTCT-NPQLICSGKASIKRGRGP | LMCS | FNNAT | CAD48404 |
| FEHCara | WMNDPFG | WYHFFYQ | CWSGSA | KNLSD | DDFRDPTTAW | TSTWECVD | RYDYGKYFA | | | | |
| FEHBevu | WMNDPFG | WYHFFYQ | CWSGSI | KDTS | SSFRDPTTAW | NGIWECPD | RYDYGKYFA | | | | |
| | : | ** | ** | * | : | * | * | : | * | * | * |

Fig. 2. Alignment of plant fructosyltransferases, invertases, and fructan exo-hydrolases. Conserved regions described by Pons et al. [11] are high-lighted in boxes; conserved Cys involved in a disulphide bridge in the *Cichorium intybus* FEH IIa produced in *P. pastoris* in bold; probable residues forming a loop containing a small α-helix in the three-dimensional structures in a dashed box; and conserved Asn susceptible for glycosylation in *P. pastoris* also in bold.

therefore seems that not only along the sequence, but especially around the conserved residues, there is a close relatedness between them.

3.3. SSTA_g molecular model

A computational model of the three-dimensional structure of SSTA_g was built by the CPHmodels 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels>) [25], using as a template the recently described crystallographic structure of fructan 1-exohydrolase IIa (FEH) from *C. intybus* (PDB entry 1st8) [13] which has a sequence identity of 40.4% with SSTA_g. The program PROCHECK [26] was used to validate the stereochemical quality of the resulting three-dimensional model. After analysing the Ramachandran plot, 99% of the residues are in allowed regions, the five residues found in disallowed regions do not form part of the active site. All the bond distances, angles and dihedrals fulfil the normal limits for polypeptide chains. The model includes 530 of the 609 residues of SSTA_g (the lack of signal peptide in the structure used as template was responsible for the inability to model the first 80 residues of the SSTA_g sequence). As expected, the SSTA_g model (Fig. 3A) shares the same architecture as the template, fructan 1-exohydrolase IIa, with 338 residues forming a five bladed β -propeller in the N-terminal region and 192 residues involved in a β -sandwich constituted by two antiparallel β -sheets in the C-terminal region. The SSTA_g model was superimposed with the crystallographic structures reported for invertase (INV) from *Thermotoga maritime* (PDB entry 1uyp), exo-inulinase (EI) from *Aspergillus awamori* (PDB entry 1y4w) and FEH from *C. intybus* (the template of the model, PDB entry 1st8), all sharing the same three-dimensional structure and included in family 32 of glycoside hydrolases (GH32) according to the classification by Henrissat and Davies [12]. In all of these enzymes the active site is conserved and located in the β -propeller of the N-terminal region. Based on the analogy between these structures, Asp94 and Glu276 located in motives DPN and LEC were identified as the catalytic amino acids in SSTA_g. These residues share the position and orientation as their equivalents Asp22 and Glu201 in FEH (PDB entry 1st8). An important amino acid in SSTA_g is Asp 219 in the RDP motive, as the mutation in the equivalent position (Asp 309 Asn) in levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* (LsdA) resulted in a 75-fold reduction in activity [27]. Like Asp219 another important residue is Arg218, as their equivalents in EI (PDB entry 1y4w) are involved in substrate binding as concluded from analysis of the structure obtained after soaking EI crystals in solutions containing fructose [28]. This is also the case of a conserved Cys in motive LEC, whose substitution in yeast invertase (Cys 205 Ala) resulted in a 70% reduction in activity. A notable difference observed both in SSTA_g and in FEH (PDB entry 1st8) is related with a loop containing a small α -helix and joining two of the β -strands in the C-terminal. The loop length is similar in SSTA_g (Val 454 to Pro 485) and FEH (Leu 373 to Pro 406), while it is very short in INV (Gly 332 to Glu 335). An important feature derived from the model is the presence of a disulphide bridge

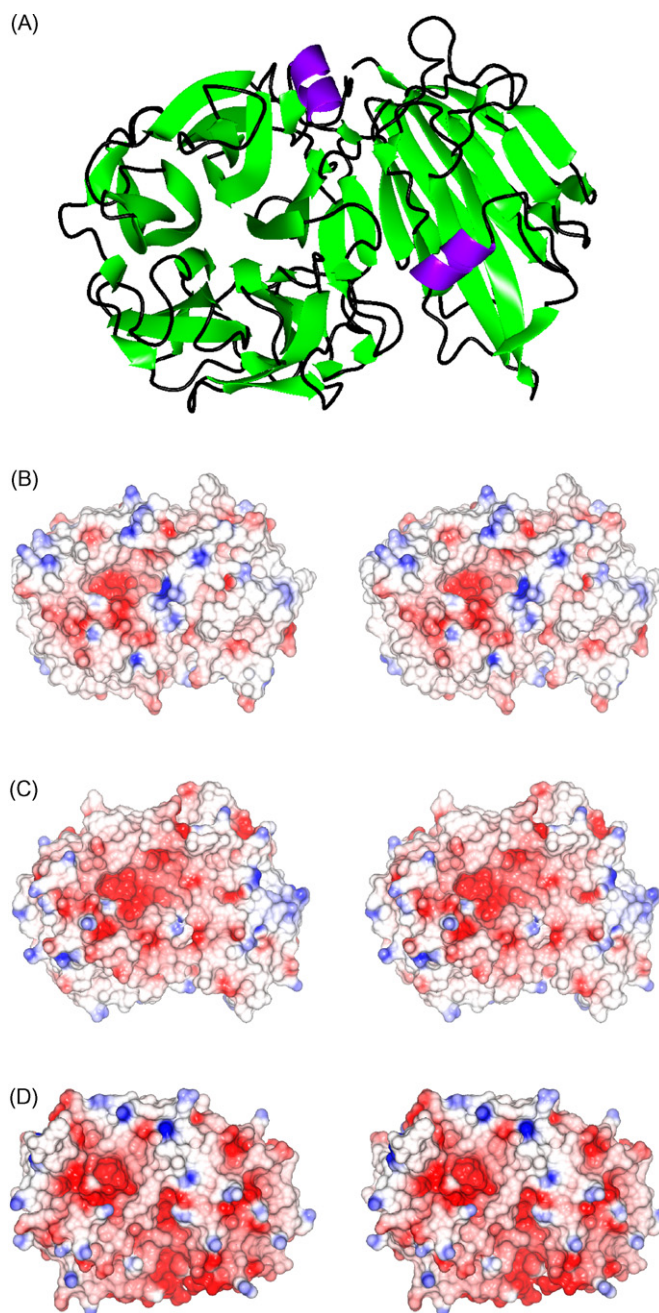


Fig. 3. Three-dimensional model of SSTA_g, left β -propeller and right β -sandwich (A). Electrostatic surface showing the differences in the groove connecting the surface between the domains with the active site in the SSTA_g model (B), the FEH model (PDB entry 1st8) (C) and the INV model (PDB entry 1uyp) (D). Electrostatic potentials are represented in colors ranging between blue (+1 V or above) and red (−1 V or below). In every panel the orientation of the structures is identical.

between Cys 471 in the α -helix and Cys 519 located in one of the β -strands in the C-terminal domain. Both the sequence fragment coding for the α -helix as well as the two cysteine residues involved in the disulphide bridge seem to be present in plant FFTs, invertases and FEHs (Fig. 2). Also, FEH (PDB entry 1st8) shows two glycosylated Asn, one is very conserved in plant FTFs, invertases and fructan-exohydrolases, while the other is only present in some of them (Fig. 2). As SSTA_g has

both (Asn 188 and Asn 591), it is therefore possible that SSTAg expressed in the same system (*P. pastoris*) may have both glycosylations too. In the surface analysis of FEH (PDB entry 1st8) a groove connecting the surface between the domains with the active site is observed; this channel is blocked in INV (PDB entry 1uyy) (Fig. 3D), while in SSTAg (Fig. 3B) although the channel is not closed as in INV, its width is considerably reduced in comparison to FEH (Fig. 3C). As it has been proposed that this channel contains the fructan-binding site, it is therefore not surprising that SSTAg and INV, which do not synthesize or hydrolyse fructans with a DP higher than 4, have a different arrangement in this region.

3.4. MSSTAG expression in *P. pastoris* and identification of products

The cDNA encoding the putative mature 1-SST (MSSTAG) (nucleotides 184–1866, counting from the start of the ORF) was expressed in *P. pastoris* X-33 with the secretory expression vector pPICZ α A and the time required for incubation was defined. Total protein in the enzymatic extract was 1.35 mg/mL. It was analyzed by SDS-PAGE on an 8% (w/v) acrylamide gel stained with Coomassie brilliant blue and a protein of approximately 75 kDa was observed (Fig. 4). This protein band was absent in the negative control, an extract obtained by the same procedure from a transformant containing the empty vector. The enzymatic extract was incubated in 300 mM sucrose solution at 25 °C overnight to assay fructosyltransferase activity towards sucrose. The presence of 1-kestose and glucose in the reaction as the only reaction products confirmed

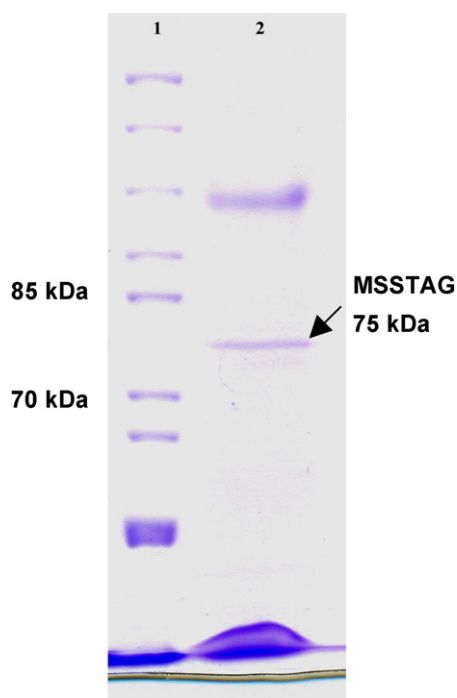


Fig. 4. SDS-PAGE analysis. Enzymatic extract obtained as described in Section 2.3 was separated on an 8% (w/v) acrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue. (1) Molecular marker, (2) enzymatic extract (10 μ g of total protein were loaded).

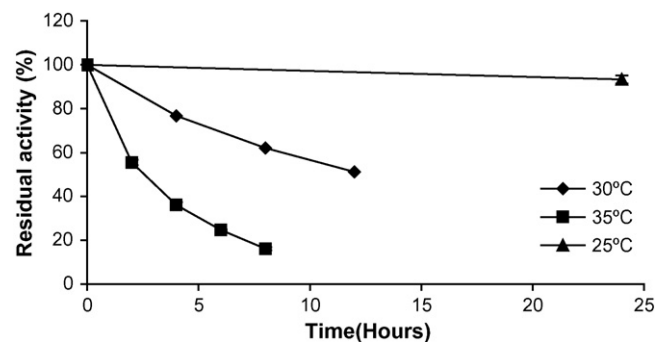


Fig. 5. Temperature effect on MSSTAG reaction rate. Half lifetime at 25, 30 and 35 °C was 246, 12.4 and 2.5 h, respectively.

1-SST activity in the enzymatic extract. No activity towards sucrose was found in the negative control.

When the reaction rate was measured under the standard activity assay conditions in 50 mM MES buffer pH 5.5 the activity was 73 mU/mL of enzymatic extract. However, in 50 mM sodium acetate buffer pH 5.5 the activity was 16% higher (85 mU/mL). Therefore, acetate buffer was used in subsequent experiments.

3.5. Biochemical characterization

3.5.1. Thermal stability, optimum temperature and pH

The influence of temperature and stability on the MSSTAG activity was studied at pH 5.5. It was found that the enzyme is readily inactivated above 35 °C, while the optimum temperature range for activity is displayed between 25 and 30 °C. In the whole temperature range the only products observed were 1-kestose and glucose. MSSTAG has a rather low thermal stability as it shows half lifetimes ($t_{1/2}$) of 246, 12.4 and 2.5 h at 25, 30 and 35 °C, respectively (Fig. 5).

The influence of pH on MSSTAG activity was also studied at the optimum temperature (30 °C) in sodium citrate buffer. The optimum pH was found to be 5.5.

3.5.2. Kinetic properties

In order to characterize the kinetic behavior of MSSTAG the K_M and the V_{max} values for the transferase reaction were determined. The measured reaction rate (mU mL⁻¹ of enzymatic extract) was plotted against sucrose concentrations in a range of 50–1530 mM (Fig. 6).

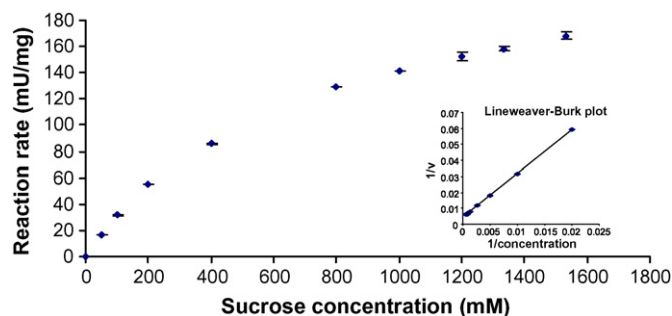


Fig. 6. Effect of sucrose concentration on MSSTAG reaction rate.

Although MSSTAG did not exhibit a saturation behavior by sucrose, kinetic parameters determined by classical initial rate experiments did fit the Lineweaver–Burk plots. Therefore, it was possible to estimate an apparent K_M value of 633 mM and a specific activity of 231 mU/mg of total protein.

The amount of MSSTAG was estimated by densitometry of Coomassie stained SDS-polyacrylamide gels, and was found to be 7.5 mg/100 mg of total protein, with an error of 2.5%. It is therefore possible to state that the k_{cat} value is around 260 min^{-1} .

3.5.3. Specificity

As far as the specificity is concerned, in the whole sucrose concentration range explored and during 48 h of reaction, 1-kestose and glucose were the only products observed from sucrose. Neither nystose nor fructose were observed. In order to explore the specificity towards sucrose and 1-kestose more closely, reactions with 150 mM sucrose and 1-kestose as substrates were performed (Fig. 7A and B). At this substrate concentration the reaction rate observed with 1-kestose as substrate was only 31% of the rate observed with sucrose. Fructose, nystose and sucrose were produced when 1-kestose was used as substrate.

Sucrose consumption was studied in a long term reaction in a 100 mM initial concentration reaction including 0.02% NaN_3 to prevent microbial growth. It was found that the reaction rate decreases considerably after 80% conversion. After 70 h of reaction, when 90% of sucrose was consumed, 23.2 mM 1-kestose, 37.6 mM fructose and 8.8 mM nystose had been produced.

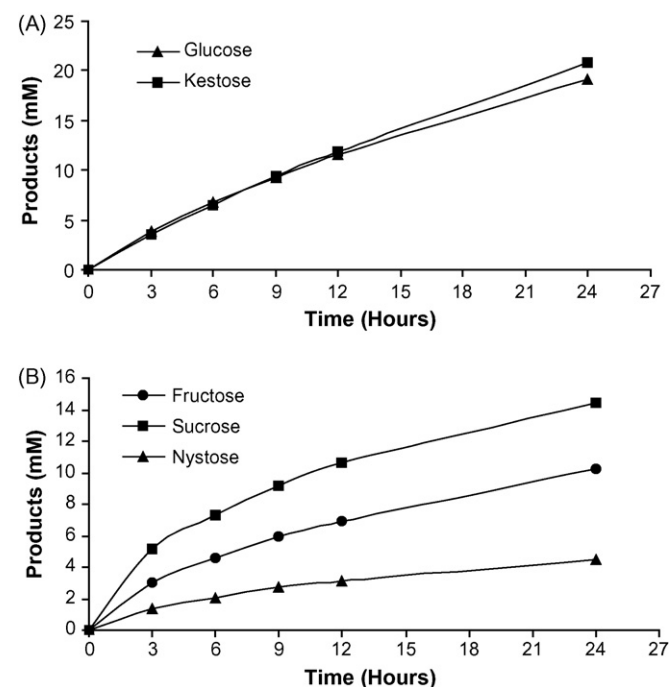


Fig. 7. MSSTAG reaction products when sucrose (A) and 1-kestose (B) were used as substrate. Initial substrate concentration was 150 mM in both cases.

4. Discussion

In this study, we report cloning of cDNA encoding a 1-SST from Agave. Besides the importance of Agave as an agroindustrial plant in several countries, Mexico in particular, fructosyltransferases have been widely studied due to their role in the biosynthesis of fructans, sugar polymers with interesting applications in the food industry. The cDNA isolated from Agave has the highest percentage of identity with *A. cepa* 1-SST (70%).

In order to characterize the 1-SST activity the putative mature protein (MSSTAG) of 560 amino acids with a theoretical molecular weight (without consideration of its probable glycosylation) of 63,675 Da was expressed in *P. pastoris*. The recombinant protein secreted into the culture medium had a 75 kDa molecular weight probably due to the posttranslational modifications carried out by the expression system.

Several attempts to purify the enzyme were unsuccessfully carried out due to the low concentration of protein obtained with this expression system. Therefore, concentrated culture medium was used to identify and characterize those MSSTAG properties not affected by the purification level.

The MSSTAG optimum temperature (25–30 °C) was slightly higher than the optimum reported for the native 1-SST from *H. tuberosus* (20–25 °C) [29] but lower than the optimum reported for the native FTF of *A. veracruz* (37 °C) [16] and fungal FTFs, which work better between 50 and 60 °C [30,31]. The specificity of some FTFs switches from transferase to hydrolase when the reaction temperature increases; however, this modification was not observed for MSSTAG, when the temperature was increased from 20 to 35 °C. MSSTAG has a rather low thermal stability, half-life time falls one order of magnitude each 5 °C; as a consequence, while at 25 °C more than 90% of the activity is retained after 24 h of incubation, the activity was rapidly lost above 35 °C; even at 30 °C, 60% of the activity is lost after 4 h of incubation. Nevertheless, when the substrate is present in the reaction at 30 °C no loss of activity is observed, as consequence of the protective effect of the substrate on the enzyme. In the other hand, the optimum pH (5.5) was the same as in native FTF from *A. veracruz* [16], 6-GFT from *A. officinalis* [2], and *Aspergillus aculeatus* FTF [31] but slightly higher to the optimum reported for 1-SST from *H. tuberosus* (3.5–5.0) [29].

When analyzing the influence of substrate concentration on enzymatic activity it was observed that MSSTAG did not exhibit a saturation behavior by sucrose. This is also the case of native 1-SST from *H. tuberosus* [29] and recombinant 1-SST from *F. arundinaceae* [23]. The estimated k_{cat} value (260 min^{-1}) corresponds to a low turnover number, as in the case of *H. tuberosus* 1-SST, reported by Koops and Jonker [29], which according to our calculations from their report, has a k_{cat} of 1566 min^{-1} . This fact combined with the low expression obtained in the recombinant system, and the low concentration obtained in plant tissue extracts has made a detailed kinetic characterization of the wild and recombinant enzymes difficult. On the contrary, fungal FTFs have higher turnover numbers;

such is the case of the enzyme from *A. aculeatus* which has a k_{cat} of $9.72 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ [31].

It has been reported that 1-kestose may be hydrolyzed or used for the synthesis of nystose [29]. In this case, nystose and fructose were observed only after long reaction times, when sucrose conversion is higher than 80%. This is due to the higher affinity of the enzyme towards sucrose compared to 1-kestose. Furthermore, when 1-kestose becomes available, hydrolysis proceeds twice faster than transfructosylation, as inferred from Fig. 7B, where the products formed directly from 1-kestose are shown. As sucrose is also the product of the two possible reactions of MSSTAG on 1-kestose (transfructosylation and hydrolysis), the net sucrose consumption rate decreases. 1-Kestose synthesis is therefore kinetically controlled and in the very long term will be entirely consumed. These results show that MSSTAG has the typical 1-SST properties: high specificity towards 1-kestose synthesis, low fructan exohydrolase activity towards 1-kestose and low nystose production [23]. This explains why other fructosyltransferases such as 1-FFT or 6-SFT are required to produce fructans with greater polymerization degree and branching.

In conclusion, we have isolated, cloned and characterized a cDNA encoding for an *A. tequilana* fructosyltransferase. This enzyme shows 1-SST activity and similar properties to other fructosyltransferases with 1-kestose as the main product of activity from sucrose. A model describing its tertiary structure was built based on the *C. intybus* FEH IIa structure, where important residues and regions involved in the catalysis were described. This report contributes to the basic understanding of *Agave* inulin biosynthesis, a plant with commercial interest in Mexico as it is the raw material for *Tequila* production.

Acknowledgments

This project was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) no. 40609-Z and 1821094, and by UNAM-PAPIIT No. IN228006-3. We thank Rosario Luján for her support in the genomic library construction, and Ma. Elena Rodríguez and Fernando González for their technical assistance. We also thank Eugenio López, Santiago Becerra, Paul Gaytán, and Jorge Yáñez, for the primer synthesis and sequences analysis.

References

[1] G. Hendry, Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal, *New Phytol.* 123 (1993) 3–14.
 [2] K. Ueno, S. Onodera, A. Kawakami, M. Yoshida, N. Shiomi, Molecular characterization and expression of a cDNA encoding fructan:fructan 6G-fructosyltransferase from asparagus (*Asparagus officinalis*), *New Phytol.* 165 (2005) 813–824.
 [3] A. Kawakami, M. Yoshida, Molecular characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose:fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (2002) 2297–2305.
 [4] M. Luscher, C. Erdin, N. Sprenger, U. Hochstrasser, T. Boller, A. Wiemken, Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltrans-

ferases from tubers of *Helianthus tuberosus*, *FEBS Lett.* 385 (1996) 39–42.
 [5] I. Vijn, A. Van Dijken, M. Luscher, A. Bos, E. Smeets, P. Weisbeek, A. Wiemken, S. Smeekens, Cloning of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined fructan molecules from sucrose, *Plant Physiol.* 117 (1998) 1507–1513.
 [6] M. Luscher, U. Hochstrasser, T. Boller, A. Wiemken, Isolation of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from barley (*Hordeum vulgare*), *New Phytol.* 145 (2000) 225–232.
 [7] R. Vergauwen, A. Van Laere, W. Van Den Ende, Properties of fructan:fructan 1-fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two asteracean plants storing greatly different types of inulin, *Plant Physiol.* 133 (2003) 391–401.
 [8] W. Van Den Ende, A. Van Laere, K. Le Roy, R. Vergauwen, D. Boogaerts, R.C.L. Figueiredo-Ribeiro, M.A. Machado De Carvalho, Molecular cloning and characterization of a high DP fructan: fructan 1-fructosyl transferase from *Viguiera discolor* (Asteraceae) and its heterologous expression in *Pichia pastoris*, *Physiol. Plant.* 125 (2005) 419–429.
 [9] I. Vijn, A. Van Dijken, N. Sprenger, K. Van Dun, P. Weisbeek, A. Wiemken, S. Smeekens, Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase, *Plant J.* 11 (1997) 387–398.
 [10] N. Sprenger, K. Bortlik, A. Brandt, T. Boller, A. Wiemken, Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 11652–11656.
 [11] T. Pons, L. Hernandez, F.R. Batista, G. China, Prediction of a common β -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity, *Protein Sci.* 9 (2000) 2285–2291.
 [12] B. Henrissat, G. Davies, Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997) 637–644.
 [13] M. Verhaest, W. Van Den Ende, K. Le Roy, C.J. De Ranter, A. Van Laere, A. Rabijns, X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*, *Plant J.* 41 (2005) 400–411.
 [14] M. Cedeño, Tequila production, *Crit. Rev. Biotechnol.* 15 (1995) 1–11.
 [15] M.G. Lopez, N.A. Mancilla-Margalli, G. Mendoza-Diaz, Molecular Structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul., *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7835–7840.
 [16] M.N. Satyanarayana, Biosynthesis of oligosaccharides and fructans in *Agave vera cruz*. I. Properties of a partially purified transfructosylase, *Indian J. Biochem. Biophys.* 13 (1976) 261–266.
 [17] V. Partida, A. Camacho, A.J. Martínez, Method of producing fructose syrup from agave plants, U.S. Patent 5 846 333 (1998).
 [18] N.M. Delzenne, N. Kok, Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism, *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2001) 456–458.
 [19] A. Franck, Oligofructose-enriched inulin stimulates calcium absorption and bone mineralisation, *Nutr. Bull.* 31 (2006) 341–345.
 [20] G.R. Gibson, M.B. Roberfroid, Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics, *J. Nutr.* 128 (1995) 11–19.
 [21] H. Kaplan, R.W. Hutkins, Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195, *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 2217–2222.
 [22] D.E. Rochester, J.A. Winter, D.M. Shah, The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70, *EMBO J.* 5 (1986) 451–458.
 [23] M. Luscher, U. Hochstrasser, G. Vogel, R. Aeschbacher, V. Galati, C.J. Nelson, T. Boller, A. Wiemken, Cloning and functional analysis of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from *Tall fescue*, *Plant Physiol.* 124 (2000) 1217–1227.
 [24] W. Van Den Ende, D. Van Wouterghem, E. Dewil, P. Verhaert, A. De Loof, A. Van Laere, Purification and characterization of 1-SST, the key enzyme initiating fructan biosynthesis in young chicory roots (*Cichorium intybus*), *Physiol. Plant.* 98 (1996) 455–466.
 [25] O. Lund, M. Nielsen, C. Lundegaard, P. Worning, CPHmodels 2.0: X3M a Computer Program to Extract 3D Models. Abstract at the CASP5 conference A102, 2002.

- [26] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.* 26 (1993) 283–291.
- [27] F.R. Batista, L. Hernández, J.R. Fernández, J. Arrieta, C. Menéndez, R. Gómez, Y. Támbara, T. Pons, 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 (1999) 503–506.
- [28] R.A.P. Nagem, A.L. Rojas, A.M. Golubev, O.S. Korneeva, E.V. Eneyskaya, A.A. Kulminkaya, K.N. Neustroev, I. Polikarpov, Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinants of substrate recognition, *J. Mol. Biol.* 344 (2004) 471–480.
- [29] A.J. Koops, H.H. Jonker, Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan 1-fructosyltransferase, *Plant Physiol.* 110 (1996) 1167–1175.
- [30] L. L'Hocine, Z. Wang, B. Jiang, S. Xu, Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023, *J. Biotechnol.* 81 (2000) 73–84.
- [31] I. Ghazi, L. Fernandez-Arrojo, H. Garcia-Arellano, M. Ferrer, A. Ballesteros, F.J. Plou, Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*, *J. Biotechnol.* 128 (2007) 204–211.