



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE LA
FRUCTOSILTRANSFERASA DE *BURKHOLDERIA PHYMATUM***

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

QUE PRESENTA

FRANCISCO VERA LÓPEZ PORTILLO



MÉXICO, D. F.

2013



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. BLASS LOTINA HENNSEN

VOCAL: DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

SECRETARIO: DRA. CLARITA OLVERA CARRANZA

1^{er}. SUPLENTE: DR. JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO

2^{do}. SUPLENTE: DRA. TZVETRANKA DIMITROVA DINKOVA

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE INGENIERÍA DE TECNOLOGÍA DE ENZIMAS DEL DEPARTAMENTO INGENIERIA CELULAR Y BIOCATALÍISIS DE LA UNVIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

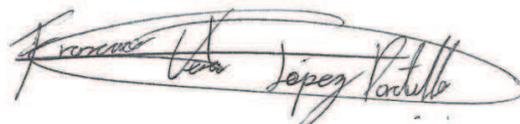
ASESOR DEL TEMA: DRA. CLARITA OLVERA CARRANZA



SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. MARÍA ELENA RODRÍGUEZ ALEGRÍA



SUSTENTANTE: FRANCISCO VERA LÓPEZ PORTILLO



A las personas que me han apoyado a lo largo de este camino:

A mis padres y hermano

A mi Abuelita Esperanza

Jaramar Villarreal Rosas

AGRADECIMIENTOS

Los resultados expuestos en la tesis son el fruto de un trabajo colectivo, por lo cual quiero agradecer:

Al Dr. Agustín López-Munguía Canales, por haberme permitido ingresar a su equipo de investigación y por toda la ayuda brindada a lo largo de mi estancia.

A mi tutora, la Dra. Clarita Olvera Carranza, que además de haberme llevado a lo largo de este aprendizaje y enseñarme que la perseverancia es nuestra mejor arma para alcanzar nuestras metas, me ha brindado un valioso cariño.

Al Dr. Jesús Caballero M.[†], a la Dra. Paulina Estrada de los Santos y a la QFB. Lourdes Martínez Aguilar por proporcionarnos la cepa de estudio.

A la M. en C. María Elena Rodríguez Alegría, por su enseñanza, paciencia y consejos brindados durante la realización de esta tesis.

A la Ing. Leticia Olvera R. y al M. en C. Gabriel Guillen S., por su colaboración en la clonación del gen.

A la M. en C. Julia Cassani Hernandez, por su apoyo en la identificación por resonancia magnética nuclear del polímero producido por la enzima KesL.

Al QFB. Rodrigo Aguayo Ortiz, por su ayuda en la parte de estudio computacional y acoplamiento molecular.

A la QFB. Myriam Ortiz García por su ayuda en la liofilización del polímero.

A la TL Aurelia Ocampo, por su apoyo técnico brindado en el laboratorio y por sus pláticas que me ayudaron en todo momento.

Al TL Fernando González Muñoz, por su ayuda en el uso y manejo del HPLC.

A Rubén Mendoza por toda sus pláticas motivacionales y por su amistad que me ha ayudado a sostenerme en los momentos más difíciles.

A la QFB. Aurora Zurita y a la QA. María Guadalupe Romo por compartir: la estancia en la preparatoria, el examen de admisión a la carrera, los días y noches de estudio, por todas esas pláticas amenas y por su sincera amistad.

A todos mis amigos, a los que son y los que fueron, principalmente: Aguayo, Ana Karla, Angel, Grisel y Vincent.

A todos mis compañeros del laboratorio por sus consejos y por haber hecho amena mi estancia en el laboratorio.

Finalmente, al Comité Técnico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación (PAPIIT) con número IN212311.

RESUMEN

Se denominan fructanas a los polímeros de fructosa unidos por enlaces beta glicosídicos, dependiendo del grado de polimerización (GP) se clasifican en: fructanas y fructooligosacáridos (FOS). Debido a las propiedades y aplicaciones de las fructanas existe gran interés en la identificación y estudio de nuevas FTFs las cuales se encuentran presentes en diversas plantas, hongos y bacterias, por lo que el objetivo principal de este trabajo fue la identificación y la caracterización molecular y bioquímica de una FTF presente en la cepa *Burkholderia phymatum*.

Para la identificación de la fructosiltransferasa de *B. phymatum*, se analizó la notación de su genoma depositada en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Se encontró en ensayos *in silico* que el plegamiento de la proteína y los residuos implicados en la catálisis coinciden con las FTFs reportadas. El gen que codifica para esta posible FTF fue aislado, clonado y expresado heterológamente en *Escherichia coli*. La proteína recombinante fue purificada con una actividad específica de 247.3 U/mg_{proteína}. Se observó que las condiciones óptimas de reacción son: 50 °C y pH 6.0. Empleando las condiciones óptimas de reacción se realizó la caracterización enzimática obteniendo una constante de afinidad (Km) de 27.09 mM y una constante catalítica (kcat) de 309.04 seg⁻¹. El análisis de los productos de reacción mostró que en una relación hidrólisis/transferencia de 80/20% la enzima es capaz de sintetizar polímero de tipo levana y oligosacáridos con diferentes GP (1-kestosa como principal producto). Finalmente, se realizó un estudio de acoplamiento molecular *in silico* para identificar algún posible inhibidor de la levansacarasa.

Palabras clave:

Burkholderia phymatum, fructosiltransferasa, fructooligosacáridos, levana

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Blast	Basic Local Alignment Search Tool (Instrumento de Búsqueda de Alineación Básico Local)
GC	Contenido guanina-citosina
Da	Daltons
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminico
FOS	Fructooligosacáridos
FTF	Fructosiltransferasa
g	Gramo
GH	Glicosil-hidrolasas
GP	Grado de polimerización
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento)
ID	Similitud secuencial
IR	Índice de refracción
NCBI	National Center for Biotechnology Information
L	Litro
mA	Miliamper
min	Minutos
mg	Miligramo
mL	Mililitro

mM	Milimolar
nm	Nanometro
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción de la cadena de la polimerasa)
pH	-log de la concentración del protones
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
p/v	Peso/volumen
RMSD	Root mean Square fluctuacion (Fluctuación media cuadrática)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato sódico)
seg	Segundos
TAE	Base tris ácido acético y EDTA
TLC	Thin layer chromatography (Cromatografía en capa fina)
U	Unidad de actividad enzimática
v/v	Volumen/volumen
°C	Grados Celsius
ΔG	Energía libre de Gibbs
μL	Microlitros

Aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1 letra)
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N
Histidina	His	H
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Trh	T
Alanina	Ala	A
Glicina	Gly	G
Valina	Val	V
Prolina	Pro	P
Leucina	Leu	L
Fenilalanina	Phe	F
Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Triptófano	Trp	W
Cisteína	Cys	C

ÍNDICE

1. 1. Introducción.....	1
2. Revisión Bibliográfica.....	3
2.1 Fructanas y fructooligosacáridos.....	3
2.2 Aplicación de las fructanas y FOS.....	6
2.3 Organismos productores de fructanas y FOS.....	8
2.3.1 Plantas.....	8
2.3.2 Hongos	8
2.3.3 Bacterias	9
2.3.3.1 gram positivas	9
2.3.3.2 gram negativas	10
2.4 Fructosiltransferasas	11
2.4.1 Mecanismo de reacción	11
2.4.2 Estructura	12
2.4.3 Mecanismo catalítico	14
2.4.4 Propiedades catalíticas	15
2.5 Género <i>Burkholderia</i>	16
3 Justificación	22
4. Hipótesis	22
5. Objetivos	23
6. Materiales y métodos	24
6.1 Estudio computacional	24
6.2 Métodos generales de biología molecular	26
6.3 Expresión de la proteína recombinante en <i>Escherichia coli</i>	32

6.4 Métodos generales de análisis de proteínas	33
6.5 Caracterización enzimática	35
6.6 Métodos generales de identificación y cuantificación de productos . . .	37
6.7 Estudio de acoplamiento molecular	39
7. Resultados y discusión.	42
7.1 Identificación de la FTF de <i>Burkholderia phymatum</i>	42
7.2 Obtención y clonación del gen <i>kesL</i>	50
7.3 Expresión de la FTF KesL recombinante	51
7.4 Purificación de la enzima KesL	54
7.5 Caracterización bioquímica	55
7.6 Determinación de los productos de reacción (relación hidrólisis- transferencia)	58
7.7 Caracterización enzimática	60
7.8 Caracterización de los productos de reacción	63
7.9 Identificación de posibles inhibidores de la levansacarasa de <i>B. phymatum</i>	68
8. Conclusiones	82
9. Perspectivas	84
10. Referencias	85
11. Apéndices	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de diferentes tipos de fructanas	4
Figura 2. Estructura de los fructooligosacáridos	5
Figura 3. Reacciones catalizadas por las FTFs bacterianas	11
Figura 4. Reacciones de polimerización que pueden catalizar las fructosiltransferasas	12
Figura 5. FTF unidominio de <i>Gluconoacetobacter diazotrophicus</i>	12
Figura 6. Primer plano del sitio activo de la Levansacarasa SacB	14
Figura 7. Árbol filogenético del género <i>Burkholderia</i>	18
Figura 8. Análisis filogenético de las fructosiltransferas bacterianas	20
Figura 9. Mapa del vector pJET1.2/Blent	29
Figura 10. Mapa del vector pBAD/Thio-TOPO	30
Figura 11. Alineamiento de las secuencias peptídicas <i>B. phymatum</i> y <i>G. diazotrophicus</i>	42
Figura 12. Resultados de los modelos generados por modelado por homología .	45
Figura 13. Localización del sitio activo	47
Figura 14. Superposición del sitio activo de LsdA y KesL-S	48
Figura 15. Sitio activo	50
Figura 16. Fragmentos amplificados por PCR	51
Figura 17. Gel SDS-PAGE y Zimograma	53
Figura 18. Gel de purificación de la proteína por columna de afinidad	54
Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la actividad de KesL	56
Figura 20. Efecto de la temperatura realizando una incubación previa 5 minutos	56
Figura 21. Efecto del pH en la actividad enzimática de KesL	57
Figura 22. Porcentaje hidrólisis-transferencia a 37 °C y pH 6.5	59
Figura 23. Porcentaje hidrólisis-transferencia a 50 °C y pH 6.0	60
Figura 24. Representación gráfica del Modelo enzimático a pH 6.5 y con una temperatura de 37 °C	62

Figura 25. Representación gráfica del Modelo de enzimático a pH 6.0 y con una temperatura de 50 °C	62
Figura 26. Cromatografía del perfil de producción por KesL	63
Figura 27. Cromatograma obtenido por HPLC con detector IR	64
Figura 28. Espectro del MNR de la levana producida por la enzima KesL	65
Figura 29. Cromatograma de FOS	66
Figura 30. Comparación entre la sacarosa co-cristalizadas en la levansacarasa SacB de <i>Bacillus subtilis</i> y el acoplamiento teórico con KesL	69
Figura 31. Representación esquemática del mecanismo enzimático de SacB	70
Figura 32. Representación esquemática de los acoplamientos moleculares calculados para las estructuras de la sacarosa y la glucosa	71
Figura 33. Representación esquemática de los acoplamientos moleculares calculados para las estructuras de la 1-kestosa y la 6-kestosa	72
Figura 34. Representación de los puntos de sitio en el modelo del KesL	73
Figura 35. Modelamiento molecular del chitosan en el sitio activo del modelo KesL-S (8SPH1-144-931)	79
Figura 36. Modelamiento molecular de la kanamicina en el sitio activo del modelo KesL-S (8SPH1-152-434)	79
Figura 37. Modelamiento molecular del compuesto N-[(2-cloro-5-nitro-fenil)metil]-N-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)sulfonil-2-nitro-anilina en el sitio activo del modelo KesL-S (39SPH1-015-991)	80
Figura 38. Modelamiento molecular del compuesto (5S,5aS)-5-[4-(dimetilamino)anilino]-9-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-5 ^a ,6,8 ^a ,9-tetrahidro-5H-[2]benzofuro[5,6-f][1,3]benzodioxol-8-uno-clorhidrato en el sitio activo del modelo KesL-S (35SPH1-104-225)	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales propiedades de las levansacarosas microbianas	15
Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen en <i>KesL</i>	27
Tabla 3. Condiciones usadas en la reacción de PCR	28
Tabla 4. Concentraciones de inductor utilizadas para el análisis de la expresión .	32
Tabla 5. Resultados de la búsqueda de la plantilla	43
Tabla 6. Resultado de los modelos generados con la técnica de modelado por homología	45
Tabla 7. Comparación estructural y secuencial de aminoácidos presentes en el sitio catalítico	49
Tabla 8. Actividad enzimática de la optimización de las condiciones de expresión	52
Tabla 9. Datos de purificación de la enzima <i>KesL</i>	55
Tabla 10. Desplazamientos químicos del espectro de C-RMN de levana, inulina y el polímero de <i>B. phymatum</i>	65
Tabla 11. Porcentaje de los productos de reacción (hidrólisis y transferencia) . .	67
Tabla 12. Acoplamiento de carbohidratos en el sitio activo de la enzima	71
Tabla 13. Moléculas obtenidas por screening virtual como posibles inhibidores de la <i>KesL</i>	75
Tabla 14. Moléculas descargadas de la biblioteca de PubChem como posibles inhibidores de la <i>KesL</i>	78

1. INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos representan una de las tres mayores clases de macromoléculas junto con las proteínas y los ácidos nucleicos. Actualmente existe un gran interés en estudiar a los glicanos para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, agentes prebióticos, fibra soluble, glicoproteínas como anticuerpos y fármacos glicosilados (Wong, 2003). La función biológica de los carbohidratos está dada por el grado de polimerización (GP), el tipo de enlace y las ramificaciones presentes en los diferentes carbohidratos (Ritsema y Smeekens, 2003).

La biosíntesis de los polímeros de fructosa (fructana) es catalizada por la acción de enzimas denominadas fructosiltransferasas (FTFs). Actualmente se sabe que existen dos tipos de FTFs: las inulosacarasas que producen inulina, la cual tiene enlaces glicosídicos $\beta(2\rightarrow1)$ en la cadena principal y las levansacarasas, las cuales presentan enlaces $\beta(2\rightarrow6)$.

Otra clasificación se da con base en el GP que presentan las cadenas, clasificándose en fructanas y fructooligosacáridos. Los fructooligosacáridos, al igual que las fructanas de levana, tienen propiedades prebióticas (Mancilla-Margalli y López 2006).

La síntesis de fructanas por diversos organismos de los reinos plantae, fungi y monera, les proporciona un gran número de ventajas entre las que se encuentran protección al medio ambiente y fuente de carbono, particularmente en bacterias se considera como un factor de virulencia, ya que el polímero es usado para adherirse a la superficie del hospedero permitiéndole iniciar la infección (Bereswill *et al.*, 1997). Un ejemplo de bacterias que utilizan a estos exopolisacáridos como factores de virulencia es el género *Burkholderia*.

El gran interés en estudiar este género bacteriano es principalmente, porque se encuentra como simbiote en diversas plantas de maíz, café y tomate

entre otras (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996), en las cuales participa en la fijación del nitrógeno y además es un patógeno oportunista en pacientes con fibrosis quística (Cescutti *et al.*, 2003).

El grupo de trabajo del Dr. Jesús Caballero aisló la cepa de *Burkholderia phymatum* de los nódulos presentes en *Phaseolus vulgaris* (Talbi *et al.*, 2010).

Actualmente sólo se ha reportado la presencia de levana como parte del análisis de caracterización de los exopolisacáridos producidos por el género *Burkholderia* (Cescutti *et al.*, 2003)

En el laboratorio 3 del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía se ha especializado por el estudio de las fructosiltransferasas capaces de producir FOS por su gran importancia en la industria de alimentos, los microorganismos principalmente estudiados son las bacterias ácido lácticas; sin embargo, en este trabajo se trabajó con una bacteria gram negativa.

El objetivo principal del presente trabajo fue aislar y caracterizar la enzima responsable de la síntesis de fructana como parte del exopolisacárido producido por *Burkholderia phymatum*. Este exopolisacárido es importante por estar altamente relacionado con la adherencia al hospedero y por su papel como simbiote. En nuestro conocimiento es la primera FTF del género *Burkholderia* caracterizada.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fructanas y fructooligosacáridos

Las fructanas son polímeros de fructosa que se encuentran unidas por medio de enlaces glicosídicos, los cuales constituyen los principales carbohidratos de reserva de algunas plantas y microorganismos. Estos polímeros presentan diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales de acuerdo con su GP, PM y estructura (Ritsema y Smeekens, 2003).

Las fructanas son clasificadas con base en su estructura molecular en: inulinas, levanas, levanas mixtas y neo series de fructanas. Las inulinas son polímeros de fructosa unidos con enlaces $\beta(2\rightarrow1)$ en la cadena principal y con enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ en las ramificaciones (figura 1a); mientras que las levanas (figura 1b) son polímeros de fructosa unidos con enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ en la cadena principal y $\beta(2\rightarrow1)$ en las ramificaciones (Fooks y Gibson, 2002).

En algunos casos las fructanas contienen, en igual proporción, ambos tipos de enlaces, por lo que no pueden denominarse como inulinas o levanas, es por esta razón que son nombradas fructanas mezcladas o levanas mixtas (figura 1c). Otra clasificación son las neo series de fructanas (figura 1d), las cuales están formas de dos cadenas levana y/o inulina que crecen a partir de un glucosa inicial en sus carbonos uno y seis. La presencia de estos polímeros ha sido reportada únicamente en plantas (Mancilla-Margalli y López 2006).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fructanas y fructooligosacáridos

Las fructanas son polímeros de fructosa que se encuentran unidas por medio de enlaces glicosídicos, los cuales constituyen los principales carbohidratos de reserva de algunas plantas y microorganismos. Estos polímeros presentan diferentes propiedades fisicoquímicas y funcionales de acuerdo con su GP, PM y estructura (Ritsema y Smeekens, 2003).

Las fructanas son clasificadas con base en su estructura molecular en: inulinas, levanas, levanas mixtas y neo series de fructanas. Las inulinas son polímeros de fructosa unidos con enlaces $\beta(2\rightarrow1)$ en la cadena principal y con enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ en las ramificaciones (figura 1a); mientras que las levanas (figura 1b) son polímeros de fructosa unidos con enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ en la cadena principal y $\beta(2\rightarrow1)$ en las ramificaciones (Fooks y Gibson, 2002).

En algunos casos las fructanas contienen, en igual proporción, ambos tipos de enlaces, por lo que no pueden denominarse como inulinas o levanas, es por esta razón que son nombradas fructanas mezcladas o levanas mixtas (figura 1c). Otra clasificación son las neo series de fructanas (figura 1d), las cuales están formas de dos cadenas levana y/o inulina que crecen a partir de un glucosa inicial en sus carbonos uno y seis. La presencia de estos polímeros ha sido reportada únicamente en plantas (Mancilla-Margalli y López 2006).

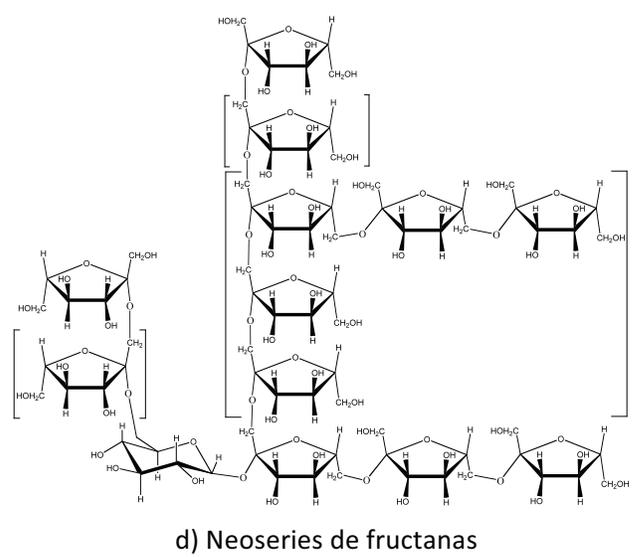
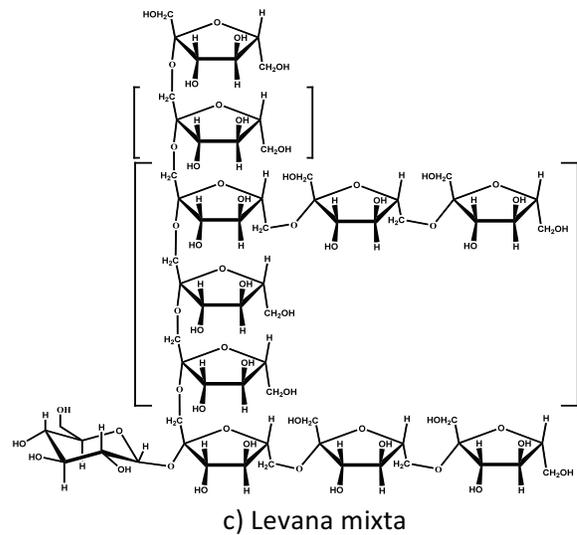
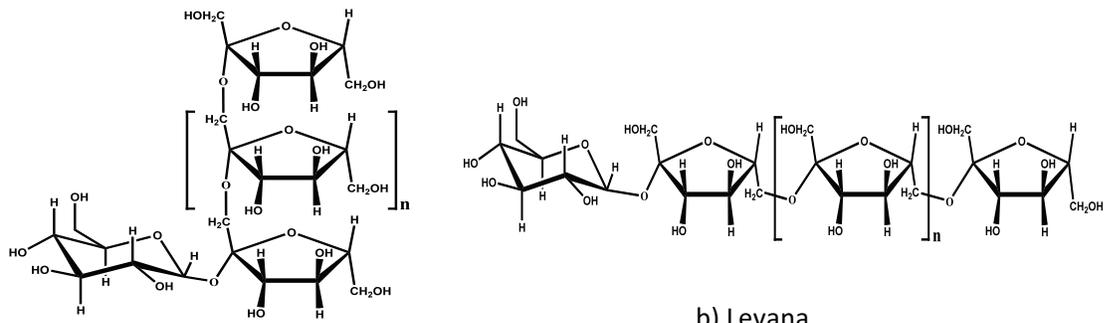


Figura 1. Ejemplos de diferentes tipos de fructanas. Estructuras propuestas por Tanaka *et al.* (1980).

Los fructooligosacáridos (FOS) se han clasificado en tres series: serie F, serie GF y serie G, los más conocidos y comercializados actualmente se derivan de la hidrólisis de la inulina, por lo que presentan enlaces $\beta(2\rightarrow1)$, y al ser producto de una hidrólisis, no contienen la molécula de glucosa en el extremo no reductor; éstos son abreviados como serie 1F . Los FOS derivados de la hidrólisis de levana son denominados como serie 6F y se encuentran unidos por enlaces $\beta(2\rightarrow6)$, estos FOS se encuentran bajo investigación.

La serie GF_n , presenta una molécula de glucosa en el extremo no reductor, debido a que son sintetizados a partir de la sacarosa, el valor "n" indica el número de residuos glicosilo, dependiendo del GP presente, ejemplos: kestosa (GF_2), nistosa (GF_3), y fructosil nistosa (GF_4), fructofuranosil nistosa (GF_5), etcétera. Para el caso de los FOS de la serie GF se pueden denominar como 1- o 6- dependiendo del enlace $\beta(2\rightarrow1)$ y $\beta(2\rightarrow6)$ respectivamente (figura 2a y 2b).

Esta serie puede presentar ramificaciones nombrándose bifurcosa (GF_3) al más pequeño expositor de este grupo. La neokestosa (figura 2d), es un trisacárido en el que una fructosa se encuentra unida por un enlace $\beta(2\rightarrow6)$ a la unidad de glucosa en la sacarosa, éste es el primer representante de la serie 6G (tercer serie de FOS).

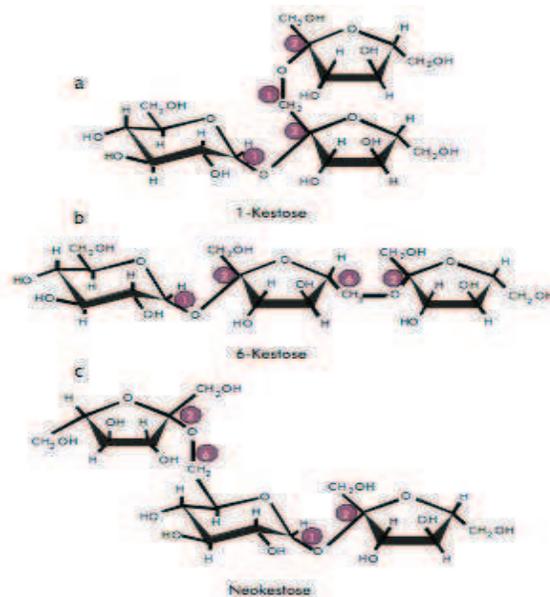


Figura 2. Estructura de los fructooligosacáridos: a) 1-kestosa, b) 6-kestosa, c) neokestosa.

2.2. Aplicación de las fructanas y FOS

Las fructanas y FOS poseen diversas aplicaciones debido al enlace glicosídico tipo beta que presentan. La presencia de este enlace provoca que los polímeros no sean hidrolizados por las enzimas del sistema digestivo en los mamíferos. Sin embargo, una vez que llegan al colón, son sustrato de un grupo específico de bacterias de la microflora habitual, las cuales son denominadas como agentes probióticos.

Los probióticos son microorganismos vivos que han demostrado, en estudios controlados, producir un beneficio a la salud del huésped. Los géneros bacterianos más representativos como agentes probióticos son: *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Estas bacterias producen las enzimas necesarias para hidrolizar el enlace beta glicosídico y metabolizar los monosacáridos liberados. Por esta razón se ha permitido clasificar a las fructanas y FOS como prebióticos, los cuales son definidos como compuestos no digeribles por el hospedero, pero fermentados por la flora benéfica, estimulando así el crecimiento y/o actividad de ésta, lo que contribuye a mejorar la calidad de vida del huésped (Nines, 1999 y Roberfroid, 2007).

Un estudio publicado por Fooks y Gibson en 2002, menciona que en ensayos *in vitro* las cepas: *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus*, combinados con FOS, inulina o ambos, inhiben el crecimiento de organismos patógenos, como: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Campylobacter jejuni*. Esta inhibición es debida a la fuerte competencia por las fuentes de carbono, ya que las bacterias enteropatógenas no son capaces de romper el enlace glicosídico de estos polímeros de fructosa. Además, la producción de lactato, acetato y ácidos grasos de cadena corta resultantes de la fermentación de estas bacterias benéficas provocan el decaimiento del pH a valores menores de 5, provocando un ambiente hostil, con la subsecuente inhibición del crecimiento de organismos patógenos.

Recientemente se ha investigado el efecto de la ingesta de fructanas y FOS, con los niveles de colesterol y triglicéridos en diversos organismos como: roedores y perros. Estos estudios demostraron que existe una disminución del colesterol y triglicéridos posterior a la ingesta de fructanas. En el caso del hombre, este resultado es contradictorio; sin embargo, en la mayoría de los estudios realizados se observa un efecto positivo. La disminución en las concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos se relaciona con la disminución de la lipogénesis (Beylot, 2005). La lipogénesis se refiere a la serie de reacciones bioquímicas por las cuales son sintetizados los ácidos grasos y triglicéridos o grasas de reserva.

Un estudio reciente muestra la capacidad antiviral de la levana frente a dos tipos diferentes de virus respiratorios (H5N1 y adenovirus tipo 40), en la publicación se menciona que esta defensa es dependiente al tamaño molecular de la levana (Mona *et al.*, 2011).

Dentro de la industria alimenticia, los FOS son comúnmente usados como edulcorantes no cariogénicos, ya que las bacterias presentes en la cavidad bucal no son capaces de utilizarlas como fuente de carbono. Por otro lado, la levana es usada para mejorar las propiedades reológicas y las características funcionales de alimentos de consumo diario, por lo que su aplicación en la industria alimenticia incluye usos como: estabilizador, emulsificador, ayudante en la formulación, agente encapsulante y acarreador de aromas y de fragancias, por mencionar algunos (Han, 1990).

Todas estas aplicaciones nos muestran la gran importancia de las fructanas y de los FOS, es por esto el gran interés de seguir estudiando sus funciones y características.

2.3. Organismos productores de fructanas y FOS

2.3.1 Plantas

Actualmente se sabe que alrededor de 40 mil plantas almacenan fructanas en sus hojas, raíces, tubérculos o bulbos. Las fructanas son sintetizadas y almacenadas en vacuolas y en órganos especializados, como ejemplos podemos citar: la raíz de la achicoria, el tubérculo de la alcachofa de Jerusalén, el bulbo de la cebolla y la piña en las plantas de agave, entre otras (López *et al.*, 2003). Al menos el 15% de las angiospermas (plantas con flores) utilizan las fructanas como carbohidratos de reserva (Hendry, 1993). Además de actuar como carbohidratos de reserva, se cree que las fructanas funcionan como agentes protectores durante etapas de estrés causadas por sequía, alta concentración de sales y/o baja temperatura (Ritsema, 2003). Por lo general, las fructanas en plantas, tienen un grado de polimerización entre 30 a 50 residuos fructosilo, pero ocasionalmente, se pueden encontrar cadenas mayores a 200 residuos (Vijn y Smeekens, 1999). Además en plantas existe una gran variabilidad en los enlaces formados; entre ellas las neo series de levana y las levanas mixtas (Vijn y Smeekens, 1999).

2.3.2 Hongos

En hongos se han identificado fructanas y FOS como parte de los polisacáridos producidos, algunos ejemplos de los géneros productores de fructanas son: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phytophthora* y *Trichoderma* (Rehm *et al.*, 1998). En la literatura se muestra que la mayoría de las fructanas sintetizadas por el reino fungi son inulinas lineales. Por el grado de polimerización de estas fructanas tienden considerarse como FOS; sin embargo, puede existir variabilidad de tamaño inclusive entre las especies del mismo género; por ejemplo, en el género *Aspergillus sydawi* que convierte sacarosa en inulina con un GP cercano a 30, mientras que *A. foetidus*, *A. niger*, *A. oryzae* y *A. phoenicis* producen una mezcla de FOS que presentan un GP de 3 a 8 (Banguela y Hernández, 2006).

A pesar de que existen abundantes reportes relacionados con las fructanas fúngicas, poco se conoce de la función fisiológica de las fructanas en estos organismos (Heyer y Wenderburg, 2001).

2.3.3 Bacterias

2.3.3.1 Bacterias gram positivas

La producción de fructanas, se encuentra ampliamente distribuida entre las bacterias ácido lácticas (BAL), que han sido utilizadas por siglos para la obtención de productos fermentados. Además de las BAL existen otras bacterias no ácido lácticas, capaces de producir fructanas. Se ha propuesto que la función de las fructanas bacterianas es de protección contra la depredación por protozoos, la desecación, la fagocitosis y el ataque de fagos, antibióticos, toxinas y estrés osmótico. También se ha propuesto que estos polímeros tienen un papel importante en el reconocimiento celular, adhesión a superficies y formación de biofilms facilitando de esta forma la colonización de varios ecosistemas (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002).

Las bacterias productoras de fructanas sintetizan tanto levana como inulina; sin embargo, las bacterias productoras de inulina pertenecen exclusivamente al grupo de las BAL (gram positivas), mientras que las bacterias productoras de levana se encuentran ampliamente distribuidas entre gram positivas y gram negativas.

Un gran número de bacterias gram positivas se han reportado como productoras de fructanas, algunos ejemplos son: *Bacillus subtilis* (Dedonder, 1966), *B. amyloliquefaciens* (Tang *et al.*, 1990), *B. natto* (Takahama *et al.*, 1991), *B. circulans* (Pérez-Oseguera *et al.*, 1996), *B. stearothermophilus* (Li *et al.*, 1997), *Paenibacillus polymyxa* (Bezzate *et al.*, 1994), *Streptococcus salivarius* (Milward y Jacques, 1990), *Actinomyces viscosus* (Pabst, 1977), *A. naeslundii* (Bergeron *et al.*, 2000) y *Lactobacillus reuteri* (Van Hijum *et al.*, 2001). Además, se conocen bacterias productoras de inulosacaros como: *S. mutans* (Sato *et al.*, 1984),

Lactobacillus reuteri (Van Hijum *et al.*, 2003) y *Leuconostoc citeum* (Del Moral Ventura *et al.*, 2008).

2.3.3.2 Bacterias gram negativas

Dentro de las bacterias gram negativas se conocen varias especies capaces de producir fructanas, *Gluconobacter oxydans* (Elishashvili, 1980), *Zymomonas mobilis* (Song *et al.*, 1993), *Erwinia herbicola* (Cote, 1988), *E. amylovora* (Gross *et al.*, 1992), *Gluconoacetobacter diazotrophicus* (Hernández *et al.*, 1995), *Rahnella aquatilis* (Song *et al.*, 1998), *Pseudomonas syringae* (Hettwer *et al.*, 1998), *G. xylinus* (Tajima *et al.*, 2000) y *Burkholderia cepacea* (Cescutti *et al.*, 2003), son algunos ejemplos de estos.

Algunas bacterias gram negativas como: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Gluconoacetobacter* y *Burkholderia* se encuentran involucradas en procesos de fitopatogenicidad, en donde la síntesis de levana está destinada a una función más importante que, sólo un carbohidrato de reserva.

Es conocido que las bacterias productoras de levana quedan envueltas por el polímero y adquieren una morfología mucosa (Cote y Ahlgren, 1993). Esta envoltura les permite adherirse a la superficie de las plantas y así realizar el proceso de infección. *Erwinia amylovora*, agente causal de la enfermedad “Fireblight” del manzano y otros frutales templados, permitió definir que este exopolisacárido funciona como un factor de virulencia durante la infección de la planta (Geier y Geider 1993; Bereswill *et al.*, 1997).

Se ha postulado que la levana producida por el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constituye una barrera aislante que impide el reconocimiento de la bacteria por la planta y evita así la respuesta de defensa del hospedero (Kassapis *et al.*, 1994; Hettwer *et al.*, 1995). Además se propone que la levana en estos organismos pudiera limitar el intercambio gaseoso con el medio, propiciando así la realización de procesos enzimáticos que requieren de un microambiente específico; por ejemplo, la fijación de nitrógeno (Leigh y Coplin, 1992).

2.4. Fructosiltransferasas

2.4.1 Mecanismo de reacción

Las fructosiltransferasas (EC 2.4.1.99), son enzimas que catalizan la transferencia de un residuo fructosilo de una molécula donadora como la sacarosa a una molécula aceptora. Esta transferencia se lleva a cabo sin la necesidad de cofactores o intermediarios fosforilados, ya que la energía proviene del rompimiento del enlace glicosídico de la sacarosa (Chambert y Gonzy-Tréboul, 1976).

Las reacciones realizadas por las FTFs son clasificadas dependiendo la molécula aceptora (figura 3), las cuales son:

- Reacción de transferencia: si la molécula aceptora es una molécula de sacarosa o un polímero de fructana en crecimiento.
- Reacción de hidrólisis: si el agua es la molécula aceptora.
- Reacción de aceptor: si la molécula aceptora es un azúcar diferente a la sacarosa o a la fructana y además posee en su estructura un grupo hidroxilo.

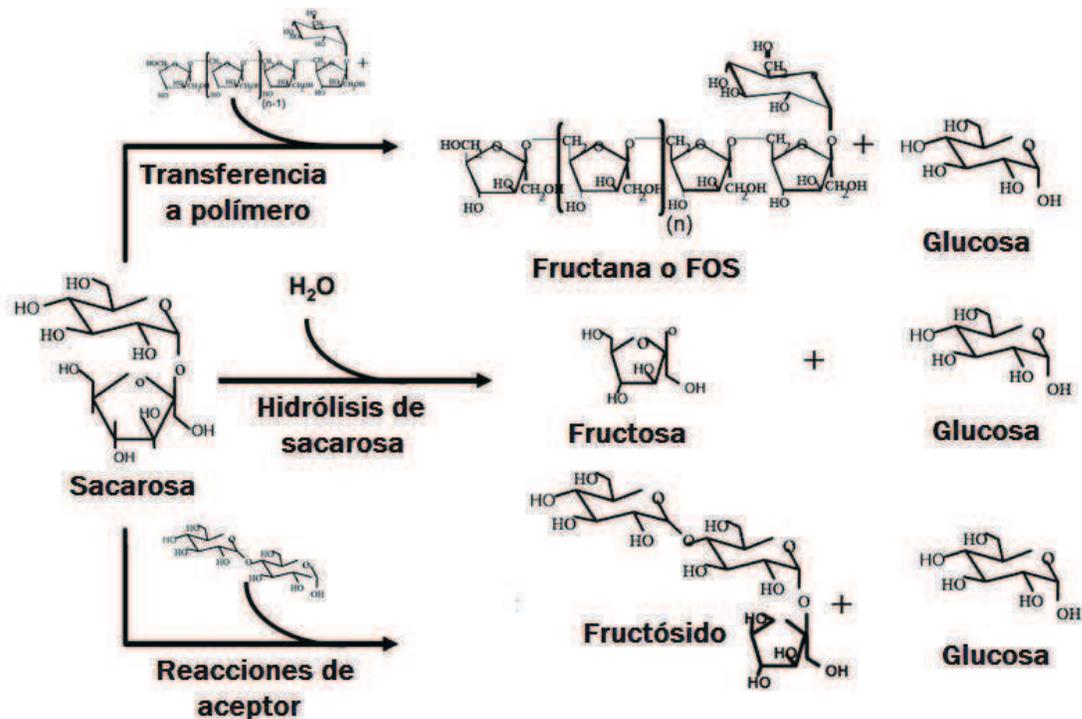


Figura 3. Reacciones catalizadas por las FTFs bacterianas.

Las FTFs se clasifican dependiendo del tipo de fructana que sintetizan (figura 4) en: inulosacarasa (EC 2.4.1.9) para las enzimas productoras de inulina y levansacarasa (EC 2.4.1.10) en el caso de las enzimas que sintetizan levana.

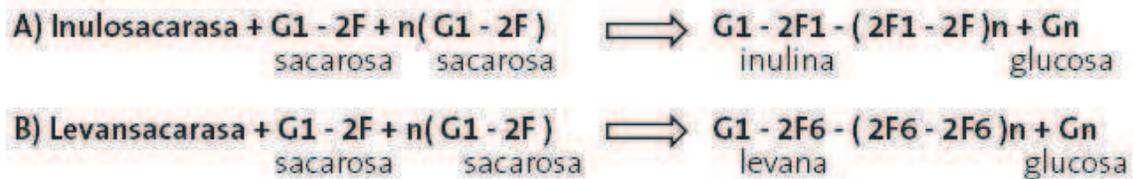


Figura 4. Reacciones de polimerización que pueden catalizar las fructosiltransferasas.

2.4.2 Estructura

De acuerdo con la base de datos de Carbohydrate-Active enZymes (CAZY), las FTFs bacterianas pertenecen a la familia 68 de las glicosil-hidrolasas (GH68). Basado en la secuencia de aminoácidos la estructura de las FTFs se divide en FTFs unidominio (figura 5) y FTFs multidominio, las cuales presentan, además del dominio responsable de la catálisis (dominio catalítico), un dominio C-terminal involucrado en el anclaje de la enzima a la pared celular y un región N-terminal de longitud variable. Tanto las enzimas unidominio como las multidominio pueden contar con un péptido señal, el cual es reconocido por la célula para excretar la proteína (Arrieta *et al.*, 2004).

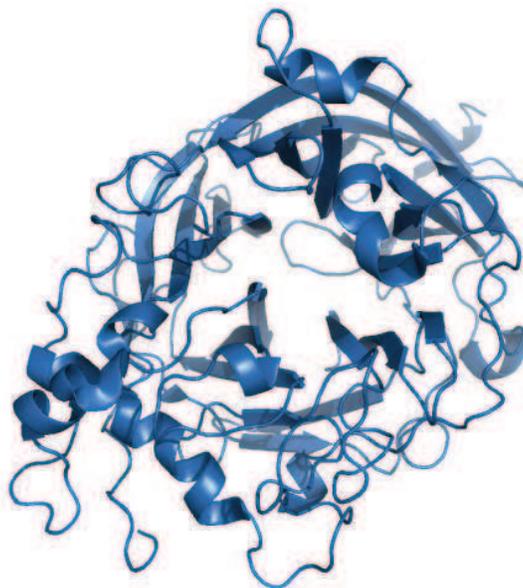


Figura 5. FTF unidominio de *Gluconoacetobacter diazotrophicus*.

El dominio catalítico presenta un plegamiento tipo β -propela de cinco hojas con una cavidad catalítica central cargada negativamente (Meng y Futterer, 2003). El pocket catalítico está compuesto por residuos altamente conservados incluidos los residuos de la triada catalítica: dos residuos aspárticos (el nucleófilo y el estabilizador del estado de transición) y el ácido glutámico (catalizador ácido-base); éstos se muestran en la figura 6. La función de los residuos catalíticos ha sido probada por el análisis mutacional de éstos y de sus equivalentes en inulo y levansacarosas (Ozimek *et al.*, 2004).

Basados en las estructuras tridimensionales de la enzima *SacB* (figura 6) de *B. subtilis* (Meng y Futterer, 2003) y en la enzima *LsdA* de *G. diazotrophicus* (Martínez-Fleites *et al.*, 2005) se observaron los residuos que están directamente relacionados con la unión de la sacarosa en el sitio activo que son nombrados subsitios +1 y -1 (Nomenclatura de acuerdo a Davies *et al.*, 1997); el subsitio -1 se encuentra altamente conservado en las estructuras dilucidadas por cristalografía, no obstante el subsitio +1 difiere entre las enzimas de gram positivas (*SacB*) y gram negativas (*LsdA*), este cambio en el subsitio +1 no está relacionado con la polimerización o la oligomerización en la síntesis enzimática (Velázquez-Hernández *et al.*, 2008).

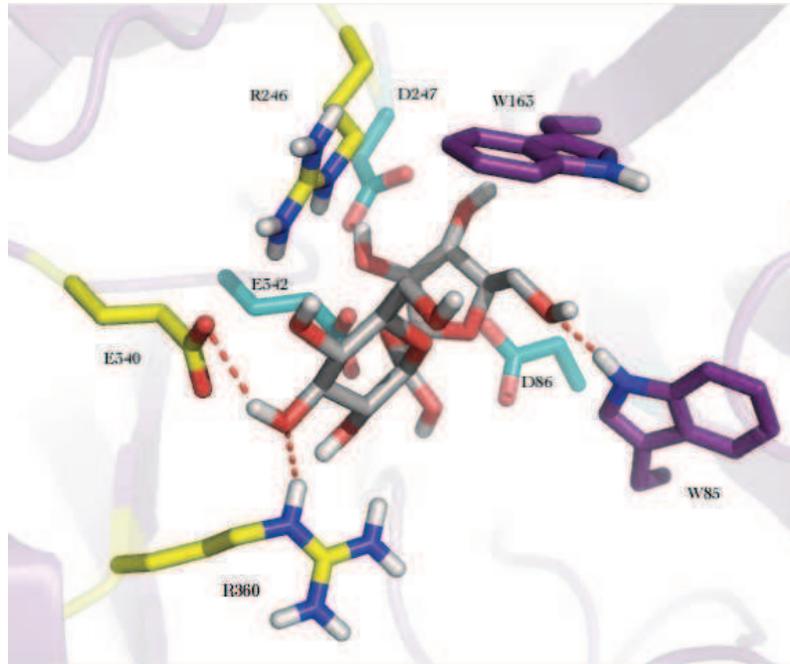


Figura 6. Primer plano del sitio activo de la Levansacarasa SacB de *B. subtilis* con una molécula de sacarosa (residuos catalíticos marcados en azul, los residuos que forman el sitio +1 en amarillo y los que forman el sitio -1 se encuentran en púrpura).

El análisis tridimensional de la estructura de SacB de *B. subtilis* muestra un enlace ion metálico en su mayoría con el catión Ca^{2+} (Meng y Futterer, 2003). Este enlace ha demostrado tener una alta participación en la estabilidad de la enzima (Jacques, 1984). Esta dependencia al calcio no es observada en la enzima LsdA de *G. diazotrophicus*, donde la estabilidad de la enzima está dada por un enlace covalente de disulfuro (Martínez-Fleites *et al.*, 2005).

2.4.3 Mecanismo catalítico

Las FTFs cuentan con un motivo ácido (Asp) y un residuo nucleofílico (Glu) esencial para la fructosilación; un mecanismo de dos pasos ha sido propuesto para las FTFs (Sinnott, 1987). En la enzima SacB el sitio activo contiene los aminoácidos catalíticos: Asp⁸⁶/Asp²⁴⁷/Glu³⁴².

Al entrar la sacarosa al sitio activo interacciona con ésta, y forma un enlace covalente entre la enzima (Asp⁸⁶) y la fructosa, lo que crea el intermediario sustrato-enzima demostrado por Chambert y Gonzy en 1976. El residuo Asp²⁴⁷ es

el motivo conservado a través de RDP en las familias GH68 y GH32 que muestra estar involucrado en la estabilización del estado de transición, explicándose por la mutación de este residuo (Asp), ya que resultó en una reducción significativa de las actividades catalíticas de las FTFs de *L. reuteri* (Ozimek *et al.*, 2004) y *S. salivarius* (Song y Jacques, 1999). Adicionalmente, Glu³⁴² se involucra en el mecanismo de transferencia protónica para el rompimiento del enlace liberando a la glucosa.

2.4.4 Propiedades catalíticas

Debido a la gran importancia que tienen las FTFs, diversos grupos de investigación se han enfocado en realizar la caracterización bioquímica y cinética de estas enzimas provenientes, tanto de bacterias gram positivas como de gram negativas. En la tabla 1 se expone un breve resumen de algunas FTFs reportadas así como algunas de sus propiedades.

Tabla 1. Principales propiedades de las levansacararas microbianas modificado de Velázquez *et al.*, 2009

Organismo	Producto*	Peso molecular (kDa)	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo
<i>Bacillus subtilis</i>	Lev	75	30	5.5
<i>Lactocacillus reuteri</i>	Lev	63	50	4.5
<i>Bacillus megaterium</i>	Lev, 1-K, 6-K, nis	52	45	6.0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lev	90	30	6.0
<i>Erwinia amylovora</i>	Lev	46	28	6.0
<i>Zymomonas mobilis</i>	Lev	56	50	6.0
<i>Pseudomonas s. phaseolicola</i>	Lev	45	18	6.2
<i>Glucnoacetobacter diazotrophicus</i>	Lev, 1-K	58	30	5.0

*Lev: levana, 1-k: 1-kestosa, 6-K: 6-kestosa, nis: nistosa

Dentro de las bacterias gram positivas se encuentra la levansacarasa *SacB* producida por el microorganismo *B. subtilis*, ésta es una de las FTFs más

estudiadas y de la cual se cuenta con la estructura cristalográfica. Esta enzima presenta propiedades físicas y catalíticas similares a las enzimas producidas por otras bacterias del género *Bacillus*. La enzima SacB cuenta con una masa molecular de 52 kiloDaltons (kDa), un punto isoeléctrico de 5, una actividad óptima a pH 6 y a una temperatura de 37 °C (Mäntsälä y Puntala 1982; Han, 1989; Takahama *et al.*, 1991; Pérez-Oseguera *et al.*, 1996). Esta levansacarasa (SacB) presenta una alta actividad específica (400 U/mg); sin embargo, su tasa de hidrólisis/transferencia es 55/45, siendo una enzima más hidrolítica que transferasa, además es considerada una enzima termosensible, ya que se inactiva a 60 °C (Chambert *et al.*, 1974). Su acción transglicolítica da lugar a la producción de un polímero de levana de alta masa molecular, aunque en concentraciones de sacarosa superiores a 1 mol L⁻¹ comienza a acumular fructooligosacáridos (Euzenat *et al.*, 1997).

En el caso de las bacterias gram negativas existen varias enzimas que han sido ampliamente estudiadas; sin embargo, la única que se ha logrado cristalizar es la levansacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (LsdA). El peso molecular de esta enzima es de 64.9 kDa con un punto isoeléctrico (pI) de 5.2. El mecanismo catalítico de esta levansacarasa ha sido estudiado y comparado con la levansacarasa de *B. subtilis* (Hernández *et al.*, 1995), demostrando que ambas enzimas forman un intermediario fructosil enzima como primer paso de la transfructosilación con similares parámetros cinéticos; no obstante, los productos finales son diferentes: mientras la levansacarasa de *B. subtilis* acumula principalmente levana de alto peso molecular, la levansacarasa de *G. diazotrophicus* acumula principalmente tri- y tetrasacáridos y en menores concentraciones polímero de levana con un alto peso molecular.

2.5. Género Burkholderia

Los rizobios son comunidades bacterianas pertenecientes a dos clases de proteobacterias (alfa y beta). Estas bacterias tienen la capacidad de fijar nitrógeno,

posterior a haberse establecido endosimbióticamente dentro de nódulos radicales, con los miembros de la familia Leguminosae.

Hoy en día existen diversos ejemplos de la amplia distribución geográfica de las especies de rizobios en asociación simbiótica con legumbres (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996). Dentro de estas bacterias endosimbióticas se encuentran diversos géneros como: *Azorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Gluconoacetobacter*, *Burkholderia*, entre otros (Minerdi *et al.*, 2001).

El género *Burkholderia*, además de ser conocido como un organismo saprófito de suelo y agua, se encuentra reportado como patógeno en plantas y humanos, aunque en su forma simbiote en plantas se considera un promotor del crecimiento (Vandamme *et al.*, 2002; Achouak *et al.*, 1999; Vandamme *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000). El género *Burkholderia* se encuentra integrado por 19 especies, dentro de las que se encuentran *Burkholderia cepacea* y *Burkholderia phymatum* (figura 7).

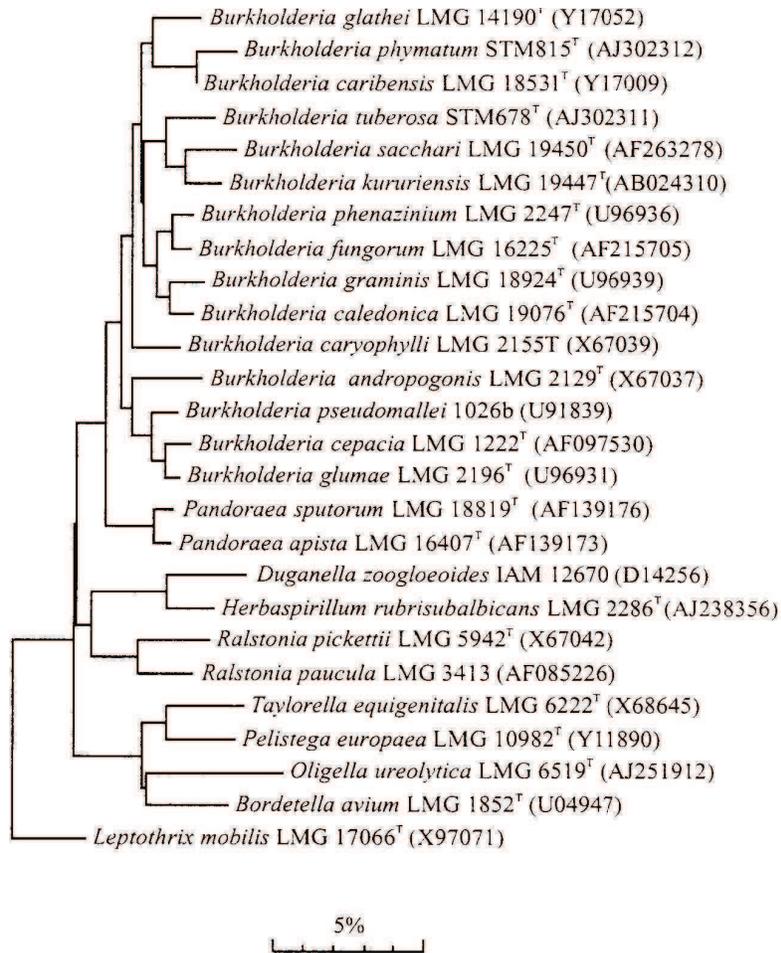


Figura 7. Árbol filogenético del género *Burkholderia* (Velázquez-Hernández *et al.*, 2008).

En los últimos años se ha incrementado el interés en estudiar a *Burkholderia cepacea*, debido a que se encuentra reportado como patógeno oportunista en pacientes con fibrosis quística (Holmes *et al.*, 1998; Vandamme *et al.*, 1997).

La cepa de *B. cepacea* BTS13 aislada de un paciente, en el Centro de Friuli de Venecia produce un perfil de exopolisacáridos, donde se identificó un polímero lineal de fructana descrito como levana. En la producción total del exopolisacárido se observa que la levana se encuentra con un porcentaje cercano al 20% peso/peso (p/p) del total de polímeros. Cabe resaltar que la producción de levana en esta especie bacteriana no se había reportado con anterioridad (Cescutti *et al.*,

2003). Actualmente, con la información recabada, se ha propuesto que este gen, junto con otros que codifican para FTFs, están involucrados en la patogenicidad de este microorganismo (Sousa *et al.*, 2007).

Por otro lado, *Burkholderia phymatum* es una especie que actúa como fijadora de nitrógeno en plantas presentes en el campo de maíz y café en grandes regiones geográficas de México (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001). La cepa *Burkholderia phymatum* STM815 fue aislada de nódulos de una legumbre *Machaerim lunatum* (palo de hoz) en la Guyana Francesa (Moulin *et al.*, 2001). *Burkholderia phymatum* es un bacilo recto, gram-negativo, no esporulado, que presenta una temperatura de crecimiento de 28 °C y cuya participación en el ciclo del nitrógeno es la reducción del nitrato; sin embargo, no es capaz de realizar todo el proceso de desnitrificación. Un punto importante de resaltar es su alto contenido de citosina-guanina (GC) el cual es de 62.1% mol (Vandamme *et al.*, 2002).

Hasta el momento no existen reportes en la literatura acerca de la presencia de FTFs en *Burkholderia*; sin embargo, recientemente una revisión de FTFs realizó un análisis filogenético de las FTFs microbianas reportadas, además de las FTFs predichas a través de los análisis de los genomas microbianos completos presentes en las bases de datos (Genbank). En este análisis se reporta la presencia de una FTF presente en el género de *Burkholderia* (figura 8).

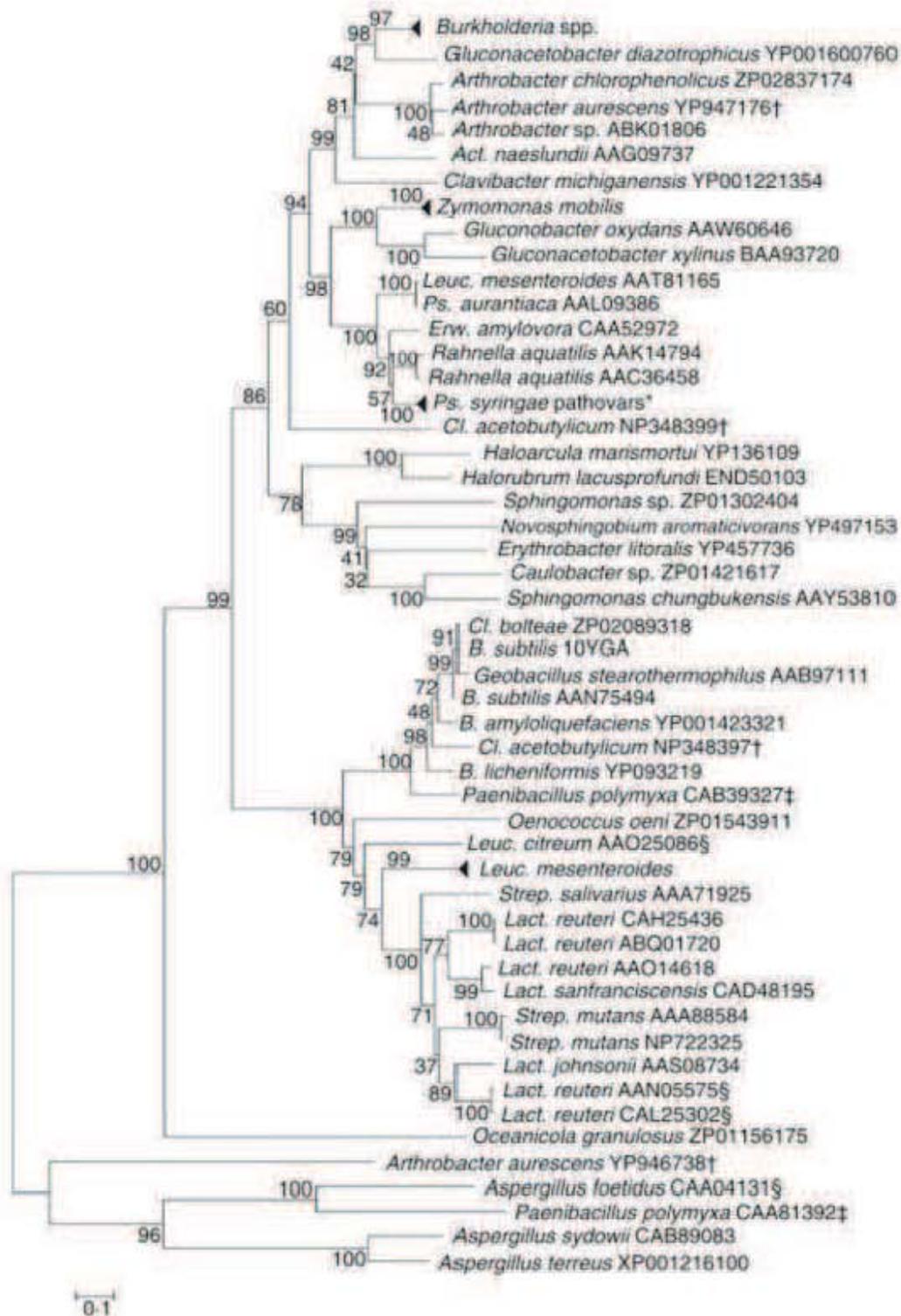


Figura 8. Análisis filogenético de las fructosiltransferas bacterianas (Modificado de Velázquez-Hernández *et al.*, 2009).

Debido al interés que se tiene en la búsqueda de nuevas fructosiltransferasas, con capacidades y especificidades diferentes a las actualmente reportadas, se decidió a enfocar el esfuerzo en la caracterización de la o las posibles FTFs del género *Burkholderia*. Gracias a una colaboración con el Dr. Jesús Caballero-Mellano (1956-2010), actualmente se cuenta con una cepa de *Burkholderia phymatum*, aislada de nódulos de *Phaseolus vulgaris* (Talbi *et al.*, 2010).

Además, desde el punto de vista básico, el estudio de la FTF de *Burkholderia phymatum* abre la posibilidad de estudiar el efecto de esta enzima en la formación de nódulos, así como, dar una idea de la capacidad de adhesión al hospedero proporcionada por las FTFs presentes en otras especies de este género, incluyendo la reportada como patógena: *Burkholderia cepacea*.

3. Justificación del trabajo

Debido a las diversas aplicaciones de los polímeros de fructosa (fructanas), existe un gran interés en la búsqueda de nuevas fructosiltransferasas con capacidades y especificidades diferentes a las actualmente reportadas. Por lo que se decidió enfocar esfuerzos en la caracterización de la o las posibles FTFs del género *Burkholderia*, ya que hasta el momento no se ha caracterizado alguna enzima de este género.

Desde el punto de vista básico, el estudio de esta enzima ayudará a generar conocimiento de las enzimas involucradas en la adherencia de *Burkholderia* para desarrollar su papel como simbionte y patógeno.

4. Hipótesis

La cepa *Burkholderia phymatum* contiene un gen que codifica para una fructosiltransferasa activa, capaz de producir un polímero de fructana y fructooligosacáridos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Identificar, aislar y caracterizar molecular y bioquímicamente las fructosiltransferasas presentes en la cepa de *Burkholderia phymatum*.

5.2 Objetivos particulares

- Identificar y analizar la(s) secuencia(s) de FTF(s) presente(s) en el genoma de la cepa *Burkholderia phymatum*.
- Aislar, clonar y expresar heterológamente el (los) gene(s) que codifica(n) para esta(s) posible(s) FTF(s).
- Purificar las proteínas recombinantes.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de la(s) FTF(s) de *B. phymatum*.
- Caracterizar los productos de reacción de la(s) FTF(s) de *B. phymatum*.
- Identificar posibles inhibidores de la(s) FTF(s) mediante análisis *in silico*.

6. Materiales y Métodos

6.1 Estudio computacional

6.1.1 Identidad con fructosiltransferasas (FTF)

Dado que no existe un registro de la presencia de una FTF identificada en el género *Burkholderia*, se decidió generar un posible modelo tridimensional que pudiese ser utilizado para demostrar que la secuencia anotada mostrada en el apéndice 1 (YP_001862155.1; NCBI) presentará en su estructura terciaria ciertos patrones estructurales característicos de este tipo de enzimas.

Para construir el modelo teórico, primero se alineó la secuencia de aminoácidos de una posible FTF del microorganismo *Burkholderia phymatum*, con la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), se solicitó se buscara una secuencia aminoacídica con alta identidad secuencial y de cobertura.

Posteriormente se realizó una búsqueda en la base de datos *Protein Data Bank* (PDB) (Bernsetin *et al.*, 1977), empleando la herramienta *Blastp* de NCBI, en donde se identificaron las *plantillas (templates)* que podrían ser utilizadas para la generación de un modelo tridimensional basado en la secuencia aminoacídica de la enzima. Considerando que estas proteínas presentan un péptido señal (Arrieta *et al.*, 2004) se realizó la identificación de éste con ayuda del programa signalP 3.0 ([http://www.cbs.dtu.dk /services/SignalP](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)), esto con el fin de realizar el modelo sin tomar en cuenta este péptido.

El alineamiento secuencial y la identificación de posibles *plantillas*, permitió identificar a una levansacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PDB: 1W18_A), como posible candidato para la construcción del modelo tridimensional. Esta *plantilla* fue seleccionada con base a los parámetros establecidos por el módulo *Blastp*, los cuales demostraron que esta *plantilla* poseía la capacidad de representar la mayor parte de la secuencia de interés (cobertura), también de presentar una nula probabilidad de haber sido seleccionado de forma azarosa

(valor E= 0.00) y, que además, posee una alta similitud en la composición aminoacídica (ID) al tener un 68% de los aminoácidos iguales y un 11% similares.

6.1.2 Predicción de la estructura de la proteína

Con base en la identificación de la *plantilla* se evaluaron las técnicas de modelado comparativo de macromoléculas para la predicción de la estructura terciaria, se abordó de forma particular las siguientes: modelado por enhebrado de proteínas y por homología, dada la alta similitud secuencial entre la secuencia de interés y la *plantilla* identificada ($40\% < ID < 90\%$). Sin embargo, al establecer la posible correlación de actividad entre la proteína de interés con la actividad catalítica de la *plantilla*, se decidió implementar la técnica de modelado por homología.

Una vez seleccionadas la *plantilla* y la técnica por homología para la construcción del modelo, se procedió a construir el modelo tridimensional, para lo cual se emplearon ocho servidores diferentes: RaptorX (RX), Swiss-Model (SM), Phyre2 (Ph2), ESyPred3D (E3D), FUGUE (F), SAM-T08 (S), GENO3D (G3D) y Modeller 9v10 (M), además del servidor I-TASSER (I), el cual fue considerado como control estadístico dado que emplea la técnica de modelado por enhebrado de proteínas. Para la generación del modelo tridimensional final, se seleccionó al mejor modelo generado, de acuerdo a los resultados de validación obtenidos con el servidor *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993).

6.1.3 Superposición de proteínas

Con el fin de comparar la conservación de la estructura terciaria y de establecer la confiabilidad del modelo construido, se realizó una superposición con el modelo generado (KesL-S) y el modelo de la *plantilla* (PDB: 1W18_A) de la enzima LsdA. Así mismo, se realizó una superposición de KesL-S con el modelo de la levansacarasa de *B. subtilis*, PDB: 1PT2, en donde se evaluó principalmente la conservación secuencial y estructural del sitio activo, además de visualizar la conformación estructural del ligando con la que esta última se encuentra co-

cristalizada. Ambas superposiciones fueron realizadas con ayuda del programa PyMOL (DeLano, 2007).

6.2 Métodos generales de biología molecular

6.2.1 Obtención de ADN genómico

La cepa de *Burkholderia phyumatum* fue proporcionada por el Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM. La cepa se propagó en medio Luria Bertani (LB) a 30 °C en un pH de 7, y con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 1.8 unidades; la composición del medio LB se muestra en el apéndice 2. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 12,230 x g durante 5 minutos usando una centrifuga Beckman Coulterm Allegra X-22R. El ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico se extrajo utilizando el sistema UltraClean Microbial ADN isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.2.2 Análisis del ADN en el gel agarosa

Una vez cuantificado el ADN cromosomal por espectrofotometría a 260nm en el equipo NanoDrop2000, se mezclaron los volúmenes de la solución que contiene al ADN, correspondiente a 10 microgramos de este con el volumen estipulado de amortiguador de carga (apéndice 2). Posteriormente se colocó en los pozos del gel de agarosa 1% peso/volumen (p/v) en amortiguador TAE 0.5X (apéndice 1). La electroforesis se desarrolló en amortiguador TAE 1X usando un campo eléctrico de 100 milivoltios (mV) durante 40 minutos. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio 0.02% durante 1 minuto y se destiñeron en agua durante 20 minutos; para la visualización de las muestras se observó el gel bajo luz ultravioleta.

6.2.3 Diseño de oligonucleótidos específicos

El diseño de los oligonucleótidos se realizó a partir de la secuencia proteica presente en el la base de datos del *GenPept* del NCBI con el número de acceso ACC75109. Una vez obtenida la secuencia proteica y usando el software

SerialCloner 2-1 se obtuvo la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína de interés.

En la tabla 2 se muestran los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo. Las secuencias diseñadas fueron sintetizadas y purificadas por la Unidad y Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para modificar la expresión del gen, los oligonucleótidos se diseñaron eliminando la región que codifica para el péptido señal, el cual fue identificado por medio del programa *signalP*. Además se incluyeron en los oligonucleótidos los sitios de restricción NdeI y XhoI con el fin de flanquear el gen *kesL* y así facilitar su posterior clonación en algún vector de expresión. La presencia de estos sitios de restricción también ayudó al reconocimiento del gen una vez insertado en el vector de expresión. Con ayuda del programa *SerialCloner 2-1* se corroboró que la construcción del gen completo no presentara un corrimiento en el marco de lectura.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen en *KesL*

Nombre	Lugar de alineación	Secuencia del Aligo	Sitio de restricción generado	TM* calculada
LevBpFw	5'(directo)	CATATG CAGACTGCAAC GCCAGGCTTCCC	Nde I: catatg	92°C
LevBpRv	3'(reverso)	CTCGAG CTGGCTGTTGC CGCCCTGCCCG	Xho I: ctcgag	98°C

* La TM (temperatura óptima de alineamiento) = $2(A + T) + 4(C + G)$

6.2.4 Reacciones de amplificación (PCR)

Las amplificaciones del gen se desarrollaron con enzima Taq platinum polymerase (Invitrogen). De manera general las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 50 μ L con 20 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), 50 pM de cada uno de los oligonucleótidos, 2 mM de $MgCl_2$ y 1X del amortiguador proporcionado por el proveedor; para complementar el volumen se usó agua tetra-

destilada. La amplificación se realizó con un gradiente de temperatura (tabla 3) con el fin de encontrar la temperatura óptima de alineación del templado con los oligonucleótidos. Las reacciones se realizaron en un termociclador Touchgene Gradient (TECHNE).

Tabla 3. Condiciones usadas en la reacción de PCR

Etapa	No. de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1	95°C	10 minutos
Desnaturalización (apertura)		94°C	30 segundos
Alineamiento	35	56, 58, 60, 64 y 66°C	35 segundos
Extensión		72°C	3 minutos
Extensión final	1	72°C	10 minutos

Los productos de la amplificación, una vez evaluados por electroforesis de ADN, se purificaron con el sistema High Pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics).

6.2.5 Clonación del gen *kesL* en el vector de clonación pJET1.2

Para la clonación del gen *kesL* se utilizó el kit de clonación pJET1.2/blunt (Fermentas); el mapa de este vector se muestra en la figura 9. El vector pJET1.2 se encuentra conformado por: un promotor T7, un iniciador de la replicación, *bla* (Ap^R) y un gen *eco47IR* (letal) inducido por el promotor, entre otros.

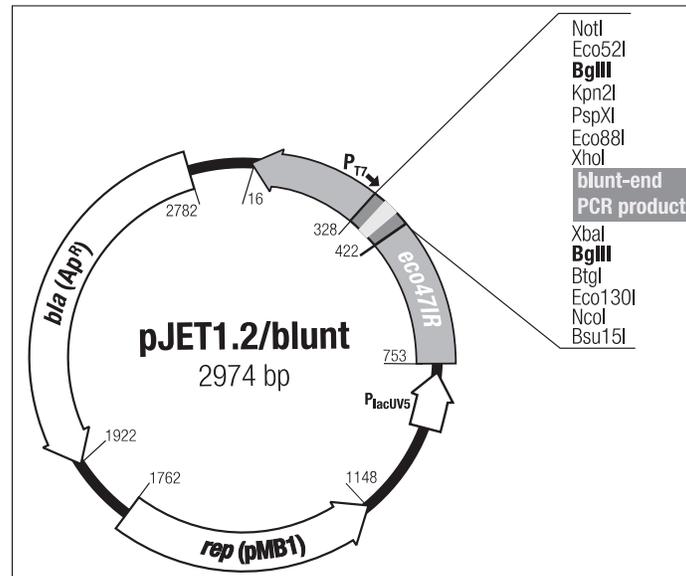


Figura 9. Mapa del vector pJET1.2/blunt

La polimerasa usada en la amplificación proporciona, en los extremos de los fragmentos generados, una etiqueta de timinas con terminación cohesiva. Para llevarse a cabo la ligación en el vector pJET1.2 requiere terminaciones como en los fragmentos amplificados, por lo que se realizó la reacción del producto cohesivo de PCR, siguiendo las indicaciones presentes en el manual del vector. Una vez terminada la reacción del producto cohesivo se realizó la ligación de los fragmentos amplificados con el vector de clonación usando una relación 3:1 respectivamente y siguiendo la metodología sugerida por el fabricante. Concluida la reacción de ligación se realizó una extracción del ADN con fenol y posteriores lavados con etanol al 70%, obteniendo así el plásmido puro denominado pFV1. El pellet obtenido se resuspendió en 10 microlitros de agua tetra-destilada y fue cuantificado por espectrofotometría UV a 260 nm.

6.2.6 Clonación del gen *kesL* en el vector de expresión

Para la construcción del plásmido recombinante se utilizó un vector pBAD /TOPO^R Thio Fusion (invitrogen). Dicho vector se encuentra linearizado y cuenta en ambos extremos con una etiqueta de timinas y una topoisomerasa acoplada que une las timinas con los residuos de adenina resultado del uso de la Taq polimerasa. Además, contiene un gen de resistencia a la ampicilina útil para la

selección de clonas positivas; incluye también un origen de replicación, un promotor de arabinosa que induce la transcripción del gen clonado. En la región de inserción del inserto cuenta un sitio codificante para una etiqueta de histidinas en el extremo 3' y un gen que codifica para una proteína thioredoxina en el extremo 5' (figura 10).

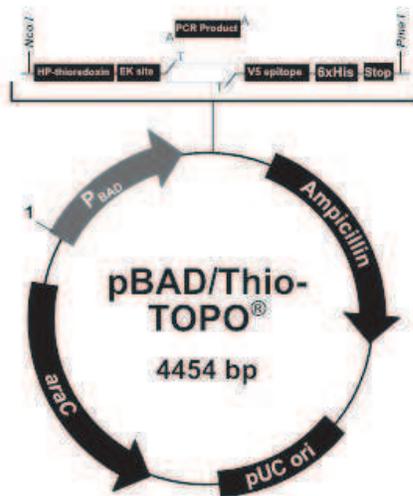


Figura 10. Mapa del vector pBAD/Thio-TOPO.

La ligación se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante, empleando un producto amplificado a partir del vector de clonación (pFV1) y los oligonucleótidos específicos diseñados previamente. Una vez terminada la ligación, se obtuvo el plásmido pFV2.

6.2.7 Extracción del plásmido.

La extracción del plásmido se realizó por medio del kit High Pure Plasmid Isolation (Roche), partiendo de cultivos con 12 horas de incubación a 37 °C en medio LB. Las células obtenidas fueron cosechadas por centrifugación a 12,230 x g y posteriormente se siguieron las indicaciones del proveedor. El plásmido aislado fue utilizado para: transformaciones posteriores, digestiones con enzimas de restricción, amplificaciones por PCR y secuenciación.

6.2.8 Transformaciones en *E. coli*.

Las transformaciones se llevaron a cabo con 100 nanogramos (ng) de la reacción de ligación en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen), las cuales fueron producidas incubando a 37 °C en medio LB hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5 unidades, posteriormente fueron cosechadas por centrifugación a 3,700 x g, lavadas y resuspendidas en glicerol 10%. El procedimiento se realizó a una temperatura de 4 °C y en condiciones asépticas.

Las transformaciones del plásmido superenrollado se realizaron usando células quimiocompetentes de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) proporcionadas por el proveedor. Las células transformadas se recuperaron en 500 μ L de medio SOC (apéndice 2) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación constante. Una vez terminado el tiempo de recuperación, el contenido celular fue distribuido en placas de agar LB con ampicilina 200 μ g/mL e incubadas a 37 °C por 12 horas.

6.2.9 Selección de clonas positivas.

El plásmido de ambos vectores confiere a las células el gen de resistencia a la ampicilina, por lo que las clonas fueron seleccionadas por su crecimiento en medio con este antibiótico. Con el objetivo de corroborar la presencia del inserto en el plásmido de las clonas seleccionadas, se llevó a cabo un análisis de su patrón de restricción. Para ello se realizaron las digestiones de los plásmidos usando los sitios de restricción Nde I y Xho I que fueron insertados al inicio y al final del gen respectivamente. Las digestiones de los vectores pJET y pBAD se realizaron con 10 U de las enzimas Nde I y Xho I (New England Biolabs) en un volumen final de 50 μ L durante 16 horas a 37°C.

6.2.10 Secuenciación.

La secuencia nucleotídica de los fragmentos de interés se determinó en un secuenciador automático Applied Biosystem 3100 en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los ensayos de secuenciación se realizaron en ambos sentidos usando los oligonucleótidos facilitados por el

proveedor y los diseñados. Las secuencias obtenidas fueron analizadas por *blastn* en la página del NCBI (<http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast>).

6.3 Expresión de la proteína recombinante en *Escherichia coli*

6.3.1 Perfil de expresión.

Partiendo de una clona previamente analizada, se determinó la concentración óptima del inductor (arabinosa), para la expresión de la proteína. Para esto se probaron las diferentes concentraciones del inductor, sugeridas por el proveedor y mostradas en la tabla 4. La clona se propagó en 10 mililitros (mL) de caldo LB con ampicilina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 37 °C con agitación constante, una vez alcanzada una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.6 unidades se agregó la cantidad de arabinosa correspondiente y se realizó la inducción a 18 y 37 °C por 12 horas para cada concentración del inductor.

Tabla 4. Concentraciones de inductor utilizadas para el análisis de la expresión

Tubo	Concentración final de arabinosa
1	0%
2	0.2%
3	0.02%
4	0.002%
5	0.0002%
6	0.00002%

Terminado el lapso de inducción, las células fueron separadas del sobrenadante por centrifugación a 3,700 x g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. El paquete celular fue lavado en tres ocasiones con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 (por último se centrifugaron en las mismas condiciones) para lograr la recuperación de la pastilla celular, misma que se resuspendió en 500 μL de amortiguador de fosfatos pH 6.5.

Las células se rompieron por sonicación en frío utilizando un sonicador Branson Soniflter 250; se realizaron con 3 ciclos con pulsos de 15 segundos de sonicación y 30 segundos de reposo. Con el fin de separar el detritus celular y las proteínas insolubles de las proteínas solubles, el extracto obtenido se centrifugó a 3,700 x g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante (extracto enzimático) se almacenó en refrigeración a 4 °C y se analizaron por electroforesis desnaturizante de proteínas y para la medición de su actividad específica.

6.3.2 Expresión de la proteína KesL

A partir de las células transformadas y analizadas, se propagó un pre-inóculo de 15 mL en caldo LB ampicilina 200 µg/mL durante 12 horas. Después se realizó un pase (1.5 % v/v de pre-inóculo) en matraces tipo Fernbach (2.8 litros) con 1L de caldo LB ampicilina 200 µg/mL incubando a 37 °C; cuando el inóculo alcanzó una densidad óptica de 0.6 unidades a 600nm, se realizó la inducción con 0.2% de arabinosa y se continuó la fermentación a 18°C, en agitación constante por 12 horas.

Una vez transcurrida la inducción, las células fueron separadas del sobrenadante por centrifugación a 3,700 x g y lavadas en 3 ocasiones con amortiguador de fosfatos pH 6.5 50 mM. Finalmente fueron resuspendidas en 6 mL de amortiguador con lisozima (1 g/L) para llevar a cabo la lisis celular.

Además las muestras fueron congeladas con ayuda de dióxido de carbono (CO₂) sólido y posteriormente se realizó una sonicación con 3 pulsos de 15 segundos y descansos de 30 segundos. El sobrenadante fue obtenido por centrifugación a 3,700 x g durante 30 minutos a 4 °C.

6.4 Métodos generales de análisis de proteínas

6.4.1 Cuantificación de proteína.

La proteína total del extracto enzimático fue cuantificada mediante el sistema Protein Assay (Bio-Rad) basado en el método de Bradford (1976),

utilizando una curva de seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Los ensayos se realizaron por duplicado.

6.4.2 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en un gel (1 mm de espesor) de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Laemmli (1970). La electroforesis se llevó a cabo en una cámara mighty small II para geles de 8x7 cm. El gel concentrador se realizó con bis acrilamida al 5% p/v, mientras que el gel separador se llevó a cabo a una concentración de 10%; la formulación de los geles se muestra en el apéndice 2.

Para la separación por migración de las proteínas se generó un campo eléctrico a 20 mA. Las muestras usadas contaron con 20 miligramos (mg) de proteína que se mezclaron con amortiguador de carga para proteínas (apéndice 2) adicionado con 10% de β -mercaptoetanol y posteriormente las muestras se calentaron a 94 °C por 5 minutos. Una vez terminada la electroforesis, los geles fueron lavados en agua, con el fin de eliminar el SDS presente, enseguida se utilizó el colorante GelCode Blue Stain Reagent (Thermo Scientific) por 20 minutos para teñir las proteínas y se lavaron en agua por un periodo de 30 minutos.

6.4.3 Geles de actividad *in situ*

Las muestras usadas para el zimograma no se trataron a alta temperatura y no se empleó β -mercaptoetanol, esto con el propósito de no comprometer la integridad de las proteínas. Después de la migración por electroforesis se realizaron 3 lavados de 20 minutos con amortiguador Tween (amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 y Tween al 2%) que actúa lavando el SDS para lograr la renaturalización de la proteína. Posteriormente los geles se incubaron en una solución con sacarosa y rafinosa al 10% p/v en amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 6.5. El tiempo de incubación se estableció hasta la visualización del polímero (12 horas).

6.4.4 Purificación de la proteína

La purificación de la enzima nativa partió del extracto enzimático, empleando cromatografía de afinidad a níquel, gracias a la presencia una etiqueta de 6 histidinas presente en la enzima recombinante. La fase estacionaria usada fue una columna HiTrap Chelating HP de 1 mL (Amersham Biosciences) previamente equilibrada con 5 ml de sulfato de níquel 0.1 M.

La purificación se realizó bajo las especificaciones del manual, usando un gradiente con las siguientes concentraciones de imidazol: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM a pH 7.4. La proteína recuperada se dializó con el fin de eliminar el imidazol residual utilizando una membrana de corte molecular de 10 kDa y realizándose 5 cambios de tampón de fosfatos 50 mM pH 6.5.

6.4.5 Inmunodetección

La proteína fue transferida a partir de un gel de poliacrilamida al 10% 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 45 minutos. La membrana fue bloqueada durante una hora en solución PBS 1X (apéndice 2) con 0.5% (p/v) de leche en polvo (Svelty) y lavada 2 veces con PBS 1X durante 10 min.

Posteriormente, se incubó con el anticuerpo Penta-His HRP Conjugate (Quiagen) diluido 1:5000 en PBST (PBS 1X con Tween 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 presencia de las bandas.

6.5 Caracterización enzimática

6.5.1 Ensayo estándar de actividad

La actividad enzimática global se obtuvo a partir de reacciones a las siguientes condiciones: pH 6.5, 37°C, en amortiguador de fosfatos 50 mM. Usando sacarosa (120 g/L) como sustrato, se midió la velocidad inicial de liberación de

poder reductor (glucosa y fructosa) mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) reportado por Millar (1959). Una unidad de actividad global fue definida como la cantidad de enzima requerida para obtener un μmol de azúcar reductor equivalente a fructosa por minuto.

6.5.2 Efecto de la temperatura y pH

El estudio del efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima fue evaluado con el ensayo de actividad estándar a pH 6.5 usando diferentes temperaturas (21, 25, 30, 35, 39, 42, 45, 50, 55, 60, 65 y 70 °C), mientras que el efecto del pH se determinó a la temperatura óptima obtenida y con valores de pH en el rango de 5.5 a 8, utilizando amortiguadores de 50 mM de acetatos (pH 5.5 y 6.0) y fosfatos (pH 6.0-8.0). Las reacciones fueron elaboradas usando 1 U/mL de la enzima purificada y el estudio de ambos efectos se realizó por triplicado.

6.5.3 Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de la FTF fue evaluada incubando la enzima a temperatura y pH óptimo tomando muestras de 50 μL de la solución de enzima cada 12 horas por 6 días de incubación. La actividad residual se determinó utilizando el ensayo de actividad estándar. El ensayo se realizó por duplicado.

6.5.4 Determinación de los parámetros cinéticos

Se determinó el comportamiento cinético de la fructosiltransferasa con la enzima pura, midiendo la velocidad inicial global de la reacción en presencia de diferentes concentraciones de sacarosa (1-50 mM), los azúcares reductores producidos se midieron por el método de azúcares reductores (DNS). Las reacciones se llevaron a cabo en las condiciones de reacción estándar (37 °C, pH 6.0) y las condiciones óptimas de pH y temperatura de la enzima (50°C, pH 6.5). Los ensayos se realizaron por triplicado empleando 1 U/mL. Las constantes enzimáticas se determinaron usando el programa Origin 6.0 (MicroCal Software, Northampton, Mass., USA)

6.6 Métodos generales de identificación y análisis de productos

6.6.1 Cromatografía en capa fina

Los productos de reacción fueron analizados a las 18 horas mediante cromatografía en capa fina, utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel 60 (MERCK) y como fase móvil una solución de etanol, butanol y agua (15:9:6 v/v). Las placas fueron eluidas dos veces y reveladas con α -naftol y calor. Como estándar se utilizó Raftilosa P95 que consiste en una mezcla de FOS obtenidos de inulina.

6.6.2 Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC)

Las muestras se analizaron en un equipo de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) de Waters, con un detector de IR 410 (Diferencial refractometer) automuestreador 171plus y una bomba controladora 1525. Se utilizó una columna aminada para la determinación de carbohidratos (4.6 x 250 mm) a 35°C. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo: agua con relación 75:25 v/v, con un flujo de 1 mL/min.

En este equipo se analizó la especificidad enzimática hacia la reacción de hidrólisis y transferencia. Para este ensayo se utilizó una concentración de sacarosa de 120 g/L incubando a 3, 6, 9, 18, 21 y 24 horas en condiciones óptimas de reacción y 12, 18 y 24 horas en condiciones de actividad estándar, usando 1 U/mL de enzima.

Para la determinación se midieron las concentraciones de fructosa, glucosa y sacarosa en el medio de reacción, el cálculo de la relación hidrólisis, transferencia, así como la conversión de la sacarosa, se realizaron usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Actividad total} = \text{Conversión de sacarosa}$$

$$\% \text{ Hidrólisis} = (\text{fructosa/glucosa}) * 100\%$$

$$\% \text{ de transferencia} = 100\% - \text{Hidrólisis}$$

6.6.3 Cromatografía de intercambio iónico (HPAEC)

La identificación de los oligosacáridos se realizó partiendo de las muestras obtenidas a diferentes tiempos de reacción (18 y 24 horas), las cuales se centrifugaron a 12,230 x g, se sonicaron y se analizaron mediante cromatografía de intercambio iónico (HPAEC) en un equipo Dionex equipado con un detector electroquímico (ED50 Dionex) y utilizando una columna CarboPac PA-100 (2 x 250 mm). Como estándar se empleó: glucosa, fructosa, sacarosa, 1-kestosa, 1-nistosa y 1-fructosil-nistosa.

6.6.4 Producción del polímero

La reacción para la producción del polímero se llevó a cabo en un matraz tipo Fernbach (2.8 litros), usando la enzima recombinante, en un volumen de 0.5 litros, utilizando un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.5 a 37 °C con agitación constante, usando una concentración de sacarosa de 120 g/L y 1 U/mL de enzima, la reacción se llevó a cabo por 24 horas.

6.6.5 Precipitación del polímero

El polímero se recuperó mediante precipitación con etanol a partir del medio de reacción previamente mencionado, utilizando etanol en una relación: etanol, solución de 3:1 (v/v) a una temperatura de 4 °C por un periodo de 12 horas en agitación continua. Después de filtrar, el polímero se resuspendió en agua y se precipitó nuevamente usando las mismas condiciones. El polímero recuperado por centrifugación a 1,650 x g fue resuspendido en 50 mL de agua y fue dializado con membranas de celulosa de 2.5 cm de diámetro (M. W. 12.400 D9777/SIGMA), con el propósito de eliminar los restos de etanol, glucosa, fructosa, sacarosa y FOS. Posteriormente el polímero fue liofilizado en una liofilizadora LABCONCO (Freezone 4.5) y almacenado.

6.6.6 Cromatografía de permeación en gel (GPC)

El análisis de la distribución de peso molecular (PM) de las fructanas se llevó a cabo en un sistema de columnas de permeación en gel conectadas en

serie: Ultrahydrogel Linear (7.8 x 300 mm) y Ultrahydrogel 500 (7.8 x 300mm), con un índice de exclusión entre 0.50 y 10,000 KDa, empleando como eluyente nitrato de sodio 0.1 M a un flujo de 1 mL/min y a una temperatura de 35°C.

6.7 Estudio de acoplamiento molecular

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio 122 del edificio E, de la Facultad de Química de la UNAM.

6.7.1 Preparación del modelo

Se optimizó la geometría del modelo KesL-S empleando el campo de fuerza GROMOS96 43a1 de carga puntual, con el programa *GROMACS 4.5.3*. (Van Der Spoel *et al.*, 2005). Posteriormente se preparó con la interfaz gráfica de *AutoDock Tools 1.5.4* (Sanner, 1999), en donde se agregaron los hidrógenos polares y se corrigieron las cargas de los aminoácidos.

6.7.2 Preparación de los ligandos

La estructura de la glucosa, sacarosa, rafinosa y 1-kestosa fueron construidas y optimizadas con el programa Spartan'2 (Deppmeir *et al.*, 2002), optimizando su geometría con un campo de fuerza MMFF94x, en el cual se retuvieron las cargas y la quiralidad de las estructuras. Después, se utilizó el programa *AutoDock Tools 1.5.4* para agregar los hidrógenos polares y detectar automáticamente los centros de torsión y enlaces rotables.

6.7.3 Acoplamiento molecular

Con base en la identificación del sitio activo del modelo KesL-S, se procedió a la determinación de una caja de búsqueda (*Grid*) utilizando el programa *Autogrid* de *AutoDock Tools 1.5.4*, la cual permitió estandarizar la región de evaluación para el acoplamiento. La caja se centró en el aminoácido Asp⁸⁶ (aminoácido que conforma la triada catalítica), con una dimensión 80 x 80 x 80 armstrongs (Å).

Posteriormente, se realizó el cálculo de acoplamiento molecular de los ligandos, dentro de las dimensiones establecidas por el *grid*, con el programa

AutoDock 4.0, empleando un algoritmo genético tipo Lamarckiano, con un tamaño de población de 150 estructuras con 5×10^6 evaluaciones y 20 corridas. Finalmente, se realizó el análisis de los resultados obtenidos, seleccionando aquel compuesto que presentara las conformaciones energéticamente más estables (menor $\Delta G_{\text{unión}}$).

6.7.4 Validación del protocolo de acoplamiento molecular

Con el fin de corroborar la confiabilidad de la metodología de acoplamiento molecular, se evaluó la conformación estructural del acoplamiento perteneciente a la sacarosa en el sitio activo, confirmando que ésta se encontrara disponible para llevar a cabo la reacción enzimática. Para esto fue necesario superponer los complejos proteína-ligando, obtenidos durante el estudio de acoplamiento, con las estructuras cristalizadas reportadas de la levansacarasa de *Bacillus subtilis*. El complejo con sacarosa se comparó con el PDB: 1PT2, mientras que el complejo con rafinosa se comparó con el PDB: 3BYN (ambos con la mutación puntual E342A).

6.7.5 Búsqueda de posibles inhibidores

Se realizó el estudio de *screening* virtual evaluando la biblioteca de moléculas de EDULISS (Hsin *et al.*, 2010) con el servidor LIDAEUS (Taylor *et al.*, 2008), estudiando más de 4 millones de compuestos provenientes de 27 bases de datos diferentes. Se empleó el modelo optimizado para la identificación del sitio de unión usando el servidor, en el cual se calculó la distribución superficial del potencial electrostático para la formulación de un mapa farmacofórico representado por átomos de nitrógeno, oxígeno y carbono, denominados *puntos de sitio* (*site points*).

Posteriormente, se analizó la base de datos de *EDULISS 2 Unique*, almacenando sólo los 5,000 mejores acoplamientos con una tolerancia de desviación de 0.02 Å de los puntos de sitio. Del resultado obtenido con el servidor LIDAEUS se seleccionaron 500 de las moléculas que obtuvieron un acoplamiento preferencial por el sitio. Las estructuras fueron optimizadas usando el campo de

fuerza MMFF94x, para realizar una segunda evaluación de acoplamiento molecular empleando el programa *AutoDock 4.0*, en el cual se empleó un algoritmo genético tipo Lamarckiano, con un tamaño de población de 150 estructuras con 5×10^6 evaluaciones y 20 corridas. Al final del estudio, se seleccionaron las moléculas con menor energía de unión, las cuales fueron identificadas en ZINC (Irwin y Shoichet, 2005), a fin de seleccionar aquellas estructuras que no presentaran toxicidad en mamíferos.

Sabiendo que las estructuras terciarias de las FTFs y las invertasas son muy parecidas, se realizó una búsqueda en la base de datos de *PubChem Bioassay* de posibles moléculas inhibidoras de las invertasas presentes en mamíferos, pero que experimentalmente no presentaron dicha actividad, sin exhibir problemas de toxicidad en los estudios reportados. Las estructuras encontradas fueron sometidas al mismo estudio de acoplamiento molecular, en donde de igual forma se seleccionaron a aquellas que obtuvieron una menor energía de unión.

Una vez obtenidas todas las moléculas con menor $\Delta G_{\text{unión}}$, como resultado del estudio de acoplamiento molecular, se procedió a evaluar las conformaciones estructurales de los diferentes ligandos en el sitio de unión, esto con el fin de observar la localización espacial de los ligandos, así como para comprobar la posible afinidad por el sitio activo, de tal forma que se pudiese inferir su capacidad como posibles inhibidores competitivos.

7. Resultados y discusión

7.1 Identificación de la fructosiltransferasa de *B. phymatum*

Con el objetivo de identificar genes que codifican para proteínas hipotéticas con actividad fructosiltransferasa en *B. phymatum*; se analizó el genoma anotado de *B. phymatum* STM 815 (ID:YP_001862155.1) en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), buscando secuencias anotadas como posibles levansacararas. Se obtuvo una secuencia coincidente con número de acceso ACC75109, la cual fue denominada KesL, esta secuencia consta de 531 aminoácidos, incluido un péptido señal de 36 aminoácidos; la enzima madura (sin incluir el péptidos señal) tiene un peso molecular deducido de 57.314 kDa y un punto isoelectrico de 5.99.

Al comparar la secuencia aminoacídica de esta probable FTF (KesL) con otras levansacarasa reportadas, esta enzima presenta un 68% de identidad con la fructosiltransferasa LsdA de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, como se muestra en la figura 11, y un 28% de identidad con la levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis*.



Figura 11. Alineamiento de las secuencias peptídicas de la posible FTF de *Burkholderia phymatum* y de la levansacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Con el objetivo de obtener mayor información acerca del plegamiento e identificar los aminoácidos implicados en la catálisis de esta posible fructosiltransferasa, se llevó a cabo un modelamiento molecular. Se realizó la comparación e identificación de secuencias aminoacídicas homólogas empleando el módulo *Blastp* del NCBI. Se solicitó realizar la búsqueda comparativa utilizando la base de datos de estructuras cristalizadas del PDB, en la tabla 5 se muestran las secuencias más representativas.

Tabla 5. Resultados de la búsqueda de plantillas

Templado	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)	Positivos (%)	Gaps (%)
1W18-A	96	0	68	79	1
3OM6_A	80	1.00E-34	29	44	16
3OM5_A	80	1.00E-34	29	44	16
3OM4_A	80	1.00E-34	29	44	16

Consistente con los resultados antes obtenidos, la plantilla con mayor homología fue la 1W18_A, que corresponde a la levansacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*; dado que tiene la capacidad de representar la mayor parte de la secuencia de interés (Cobertura), posee una nula probabilidad de haber sido seleccionado de forma azarosa (Valor E), presenta una alta similitud aminoacídica (% ID) al poseer un 68% de los aminoácidos iguales y 11% similares, además de tener un bajo índice de ruptura secuencial (Gaps).

LsdA, presenta 3 cisteínas Cys¹⁵⁷, Cys³³⁹ y Cys³⁹⁵, las dos últimas están relacionadas con su estabilidad, que en la mayoría de las FTFs está dada por la presencia del ion Ca²⁺ (Martínez-Fletes *et al.*, 2005). La secuencia de la enzima de *B. phymatum* presenta sólo 2 cisteínas (Cys³¹³ y Cys³⁷⁴), las cuales se sugiere interactúan formando un puente disulfuro para conferirle estabilidad a la enzima.

Existen varios tipos de modelado de proteínas, entre las cuales se encuentran: modelado *de novo*, modelado por enhebrado, modelado por

homología y modelado por reemplazo de residuos. Si la identidad es superior al 40%, no es necesario realizar el modelado *de novo* y si la identidad es menor del 90% no se puede utilizar el modelado por reemplazo de residuos.

Ya que la identidad aminoacídica se encuentra dentro del intervalo de 40 al 90%, y además, dada la similitud en la actividad enzimática que existe entre la enzima LsdA y la propuesta, se concluye que la técnica de modelado que debe usarse es: modelado por homología, ya que esta técnica se basa en que dos proteínas homólogas compartirán estructuras muy similares, puesto que el plegado proteico está evolutivamente más conservado que su secuencia.

En la tabla 6 se muestran los modelos obtenidos utilizando la técnica de modelado por homología empleando los siguientes servidores gratuitos: RaptorX (RX), Swiss-Model (SM), Phyre2 (Ph2), ESyPred3D (E3D), FUGUE (F), SAM-T08 (S), GENO3D (G3D) y Modeller 9v10 (M), además del servidor I- TASSER (I) que genera un modelado por enhebrado.

Todos los modelos fueron comparados y evaluados, a fin de seleccionar aquel cuyos resultados de validación fueran lo más aproximados a los parámetros establecidos.

Tabla 6. Resultado de los modelos generados con la técnica de modelado por homología

Servidor	Template	No. Modelo	Qmean score	Z-score	RMS D	Diagrama de Ramachandran (%) [*]			
						F	P	G	NP
I	1W18_B	1	0.584	-2.204	0.392	83.7	12.6	3	0.8
RX	1W18_A	1	0.651	-1.398	0.109	89.9	9	0.8	0.3
SM	1W18_A	1	0.71	-0.688	0.07	83.5	15.5	1	0
Ph2	1W18_A	1	0.66	-1.297	0.181	86.7	10.6	2.3	0.5
E3D	1W18_A	1	0.704	-0.758	0.12	89.4	10.1	0.5	0
F	1W18_A	1	0.647	-1.448	0.024	85.1	14.1	0.8	0
S	1W18_A	1	0.693	-0.895	0.46	84.3	14.7	1	0
		2	0.675	-1.111	0.002	84.5	14.4	1	0
		3	0.692	-0.885	0.001	84.4	14.5	1.2	0
G3D	1W18_A	1	0.623	-1.764	0.836	71.8	26.9	0.8	0.5
		2	0.632	-1.653	0.899	74.2	23.9	0.8	1.1
		3	0.484	-3.44	18.59	36.9	43.1	14.9	6.1
	1W18_B	1	0.587	-2.193	0.821	74.5	24.1	1.3	0
		2	0.596	-2.089	0.948	68.7	29.2	1.1	1.1
		3	0.596	-2.081	0.788	73.2	25.5	0.8	0.5
M	1W18_A	1	0.651	-1.398	0.12	89.2	10.3	0.5	0
		2	0.671	-1.16	0.111	87.7	12.1	0.3	0
		3	0.654	-1.362	0.124	88.2	10.6	0.8	0.5
		4	0.652	-1.389	0.11	88.9	10.1	0.8	0.3
	1W18_B	5	0.658	-1.316	0.123	89.4	10.3	0.3	0
		1	0.666	-1.218	0.119	90.7	8.8	0.5	0
		2	0.686	-0.982	0.133	89.7	9.5	0.5	0.2
		3	0.669	-1.18	0.105	89.4	9.8	0.5	0.5
	1W18_B	4	0.668	-1.196	0.127	89.2	9	0.8	1
		5	0.691	-0.918	0.106	90.2	8.3	0.8	0.8

* Regiones del diagrama de Ramachandran: F) Favorecida, P) Adicionalmente permitida, G) Generosamente permitida y NP) No permitida.

Con base en los resultados anteriores, se concluyó que el modelo más adecuado es el generado por el servidor Swiss-Model, ya que su Q-mean-score fue el más aproximado a 1.0 (0.71); el Z-score fue el más próximo al 0.0 (-0.688), al igual que el RMSD (0.070), además el diagrama de Ramachandran (apéndice 3) mostró que el 100% de los ángulos rotables de los aminoácidos se encuentran dentro de las regiones permitidas. Con este análisis se propone que la enzima KesL está compuesta por un solo dominio, con un plegamiento tipo β -propela de 5 hojas similar a los reportados para otras FTFs (Velázquez-Hernández *et al.*, 2009).

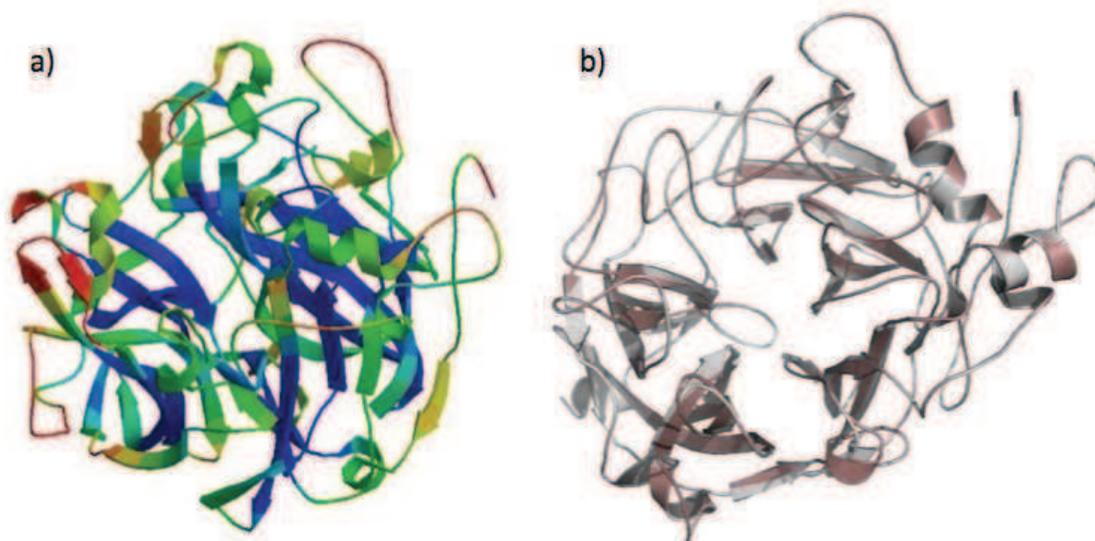


Figura 12. Resultados de los modelos generados por modelado por homología: a) estructura del modelo generado, y b) superposición del modelo KesL-S (café) y del template 1W18_A (gris).

En la figura 12a se muestra la estructura tridimensional del modelo generado de KesL, se observan en color rojo las regiones con un grado de desviación aproximado de 3.5Å, donde se encuentran las asas y giros de la estructura, que por lo general, poseen alto dinamismo y son poco específicas; en azul las regiones con un grado de desviación menor de 1Å, que son posiciones más conservadas, dentro de las cuales se localizan los aminoácidos del sitio activo. Así mismo, en la figura 12b se observa alto grado de similitud estructural, entre el modelo de KesL-S generado por el servidor Swiss-Model y el modelo de la enzima LsdA de *Gluconoacetobacter diazotrophicus*.

Con el fin de observar la conservación dimensional de los residuos catalíticos, se realizó una comparación con base en la superficie molecular de la levansacarasa de *G. diazotrophicus* y KesL-S

En la figura 13 se demuestra que existe una conservación estructural entre el sitio activo de la levansacarasa LsdA de *G. diazotrophicus* y el de la enzima KesL-S.

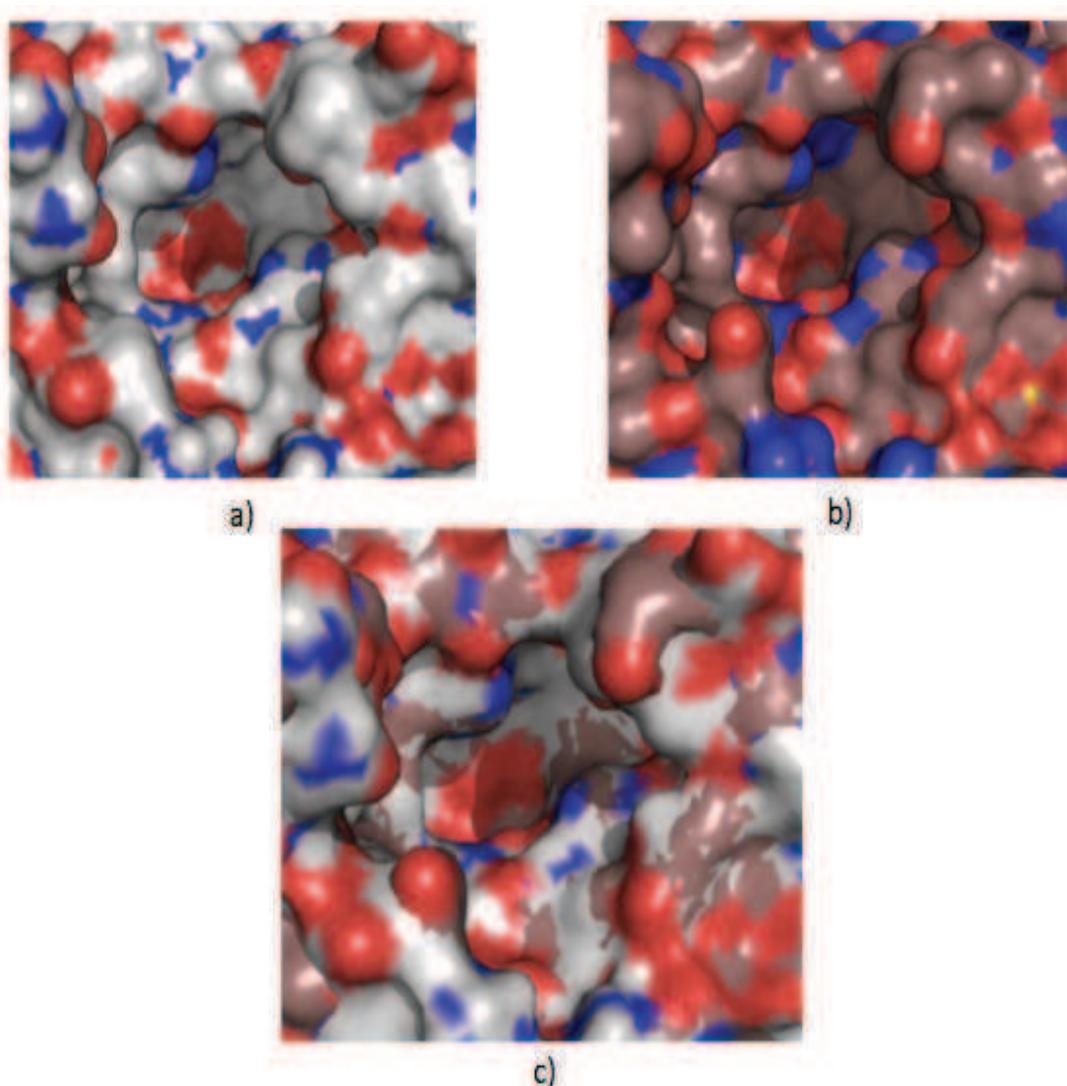


Figura 13. Localización del sitio activo: a) 1w18_A, b) KesL-S, y c) superposición de ambos sitios.

En la figura 14 se muestran algunos de los aminoácidos presentes en el sitio catalítico, se puede apreciar una clara conservación secuencial y espacial entre ellos; sin embargo, existen algunas diferencias aminoacídicas que podrían ser puntos claves en la selectividad de ligandos, y por lo cual pueden poseer diferencias en la afinidad hacia éstos.

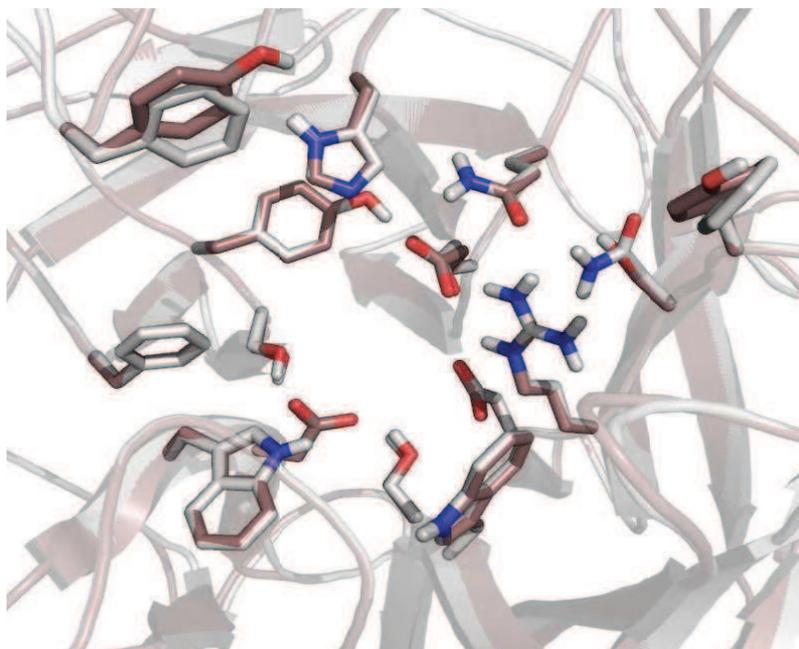


Figura 14. Superposición del sitio activo de 1w18_A mostrado en gris y KesL-S mostrado en café.

Para identificar los aminoácidos presentes en el sitio activo que intervienen en la catálisis, se realizó una comparación secuencial (*SerialCloner 2-1*) y estructural (*PyMOL*) del modelo de KesL-S con la levansacarasa de *B. subtilis*, de la cual existe una estructura co-cristalizada con sacarosa (Meng y Futterer, 2003) y donde están identificados los residuos catalíticos (figura 15).

Con base en estos resultados, y en los artículos relacionados con los estudios de cristalización (Meng y Futterer, 2008), se reconocen los siguientes aminoácidos involucrados en la catálisis (tabla 7).

Tabla 7. Comparación estructural y secuencial de aminoácidos presentes en el sitio catalítico

SacB	Aminoácidos	KesL-S	Observaciones
D86	D	D76	
E342	E	E341	Triada catalítica
D247	D	D249	
R246	R	R248	
W85	W	W75	
W163	W	W165	Intervienen en la estabilización del sustrato en el sitio catalítico
S164	S	S166	
R360	R/H	H359	
E340	E/Q	Q339	
S412	S	S425	Otros
Y429	Y/F	F437	

En la figura 15 se muestran imágenes de la superposición del sitio catalítico de SacB de *B. subtilis* con el modelo KesL-S. Se observa la existencia de una similitud secuencial de aminoácidos y estructural del sitio activo en ambos modelos. Con base en las evidencias antes discutidas, se propone que la proteína es una fructosiltransferasa. Para demostrar esta hipótesis, fue necesario determinar de manera experimental su actividad de fructosiltransferasa, para lo cual lo que se llevó a cabo la clonación y expresión heteróloga de la proteína.

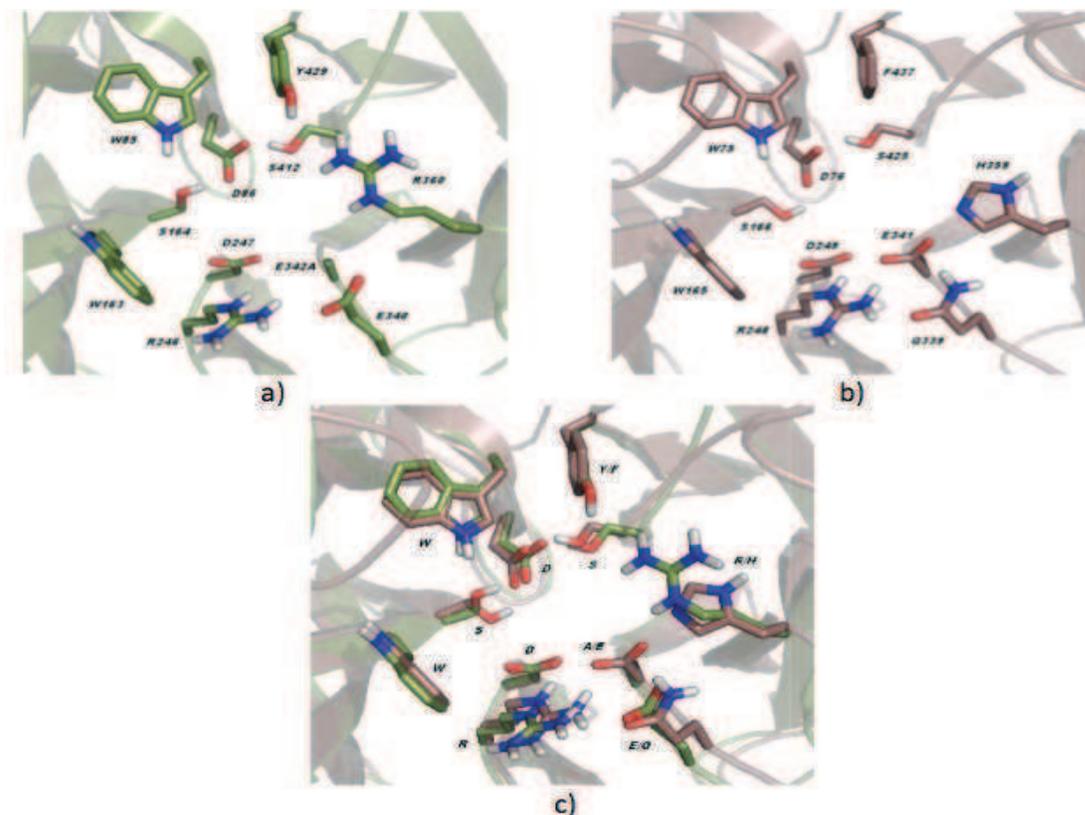


Figura 15. Sitio activo: a) 1PT2, b) KesL-S, y c) superposición de ambos sitios.

7.2 Obtención y clonación del gen *kesL*

Con el objetivo de aislar el gen *kesL*, se diseñaron oligonucleótidos específicos (materiales y métodos) para amplificar mediante PCR el fragmento que codifica para este gen, utilizando como templado el DNA cromosomal de la cepa *Burkholderia phymatum*. Se obtuvo un fragmento de DNA mayoritario que como se esperaba, presentó un peso molecular de aproximadamente 1.5 kpb (figura 16). El fragmento obtenido fue clonado en el vector de clonación pJET (Invitrogen) y la construcción resultante (pFV1) se analizó mediante enzimas de restricción (Nde I y Xho I). Finalmente, el fragmento fue secuenciado para corroborar que fuera el gen *kesL* y que no presentara mutaciones.

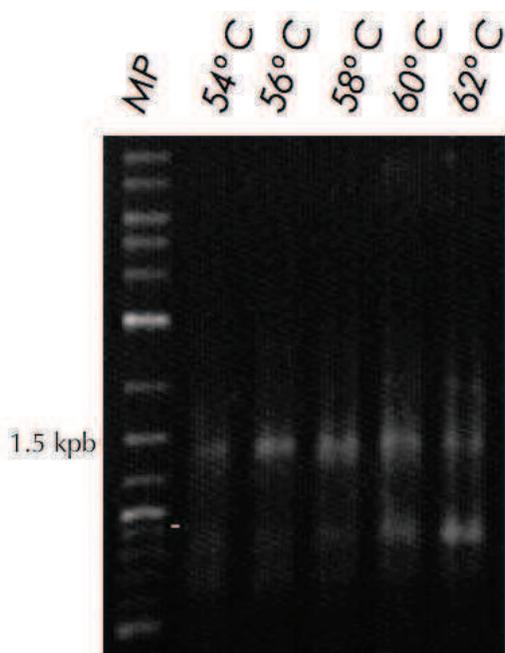


Figura 16. Fragmentos amplificados por PCR. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular y del carril 2 al 6 se muestra las diferentes temperaturas de alineamiento usadas respectivamente: 54, 56, 58, 60 y 62°C.

Posterior al aislamiento se realizó una subclonación del gen *kesL* en el vector de expresión TOPO pBad/Thio (Invitrogen); en este vector el gen está bajo el control del promotor Ara, inducible por arabinosa. La construcción resultante, denominada pVF2, fue analizada mediante PCR y secuenciación donde se corroboró que se trataba del gen *kesL*, sin mutaciones y se encontraba en la orientación correcta.

7.3 Expresión de la fructosiltransferasa KesL recombinante

Para llevar a cabo la expresión heteróloga de la proteína KesL, la construcción pVF2 fue transformada a células *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen), las cuales fueron crecidas en medio suplementado con arabinosa como inductor de la expresión; al finalizar el cultivo se obtuvo el extracto intracelular por lisis celular y se realizó la determinación de la actividad estándar de levansacarasa utilizando sacarosa como sustrato. La actividad enzimática fue detectada en este extracto, lo que indicó que la enzima KesL recombinante fue expresada de forma soluble y activa.

Para determinar las mejores condiciones de expresión de esta enzima recombinante se llevó a cabo un análisis para encontrar las concentraciones más adecuadas de inductor. Se probaron diferentes concentraciones del inductor arabinosa durante la fermentación. Así mismo, se probaron dos temperaturas de inducción: 37°C, según las recomendaciones del proveedor, y 18°C, la cual se encuentra ampliamente reportada como la temperatura optima de inducción de FTFs recombinantes. Una vez finalizado el tiempo de inducción (12 horas) se obtuvo el extracto intracelular de estos cultivos y se determinó la actividad enzimática global mediante el método de DNS como se describe en materiales y métodos.

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de estos análisis. Se observa que la concentración de arabinosa 0.2% y 18 °C fueron las mejores condiciones para la producción de enzima recombinante; por lo tanto, fueron utilizadas para las posteriores fermentaciones.

Tabla 8. Actividad enzimática de la optimización de las condiciones de inducción

Temperatura (°C)	Concentración de arabinosa (%)	Actividad enzimática (U/ml _{fermentación})	Porcentaje de Actividad enzimática (%)
18 °C	0.2	4.67	100.00
	0.02	4.06	86.94
	0.002	3.22	68.95
	0.0002	2.62	56.10
	0.00002	2.52	53.96
37 °C	0.2	4.02	86.08
	0.02	3.13	67.02
	0.002	2.29	49.04
	0.0002	1.96	41.97
	0.00002	1.87	40.04

Una vez obtenidas las mejores condiciones de inducción se realizó la producción de la proteína recombinante en 1 litro de fermentación, en donde se obtuvo una actividad de 5.06 U/ml de fermentación y una actividad específica de 11.0 U/mg de proteína.

La proteína recombinante fue visualizada mediante geles de SDS-PAGE (figura 17a). El peso molecular estimado para KesL es de 57.3 kDa; sin embargo, la proteína recombinante se encuentra fusionada a la tiorredoxina en el N-terminal y a una etiqueta de histidinas en la región C-terminal útil para su posterior purificación; estos fragmentos fusionados son los responsables del aumento en el peso molecular de la enzima recombinante a 70kDa.

Así mismo, se llevaron a cabo geles de actividad *in situ* (zymogramas) incubados con sacarosa y rafinosa (sustrato específico de las fructosiltransferasas) y así demostrar la capacidad de esta enzima para producir polímero de fructana (Elisashvili, 1980). En la figura 17b, es posible identificar una ligera banda del peso molecular esperado que demuestra que la enzima es capaz de producir polímero a partir de ambos sustratos utilizados, por lo que se puede concluir que la enzima aislada es una fructosiltransferasa productora de polímero.

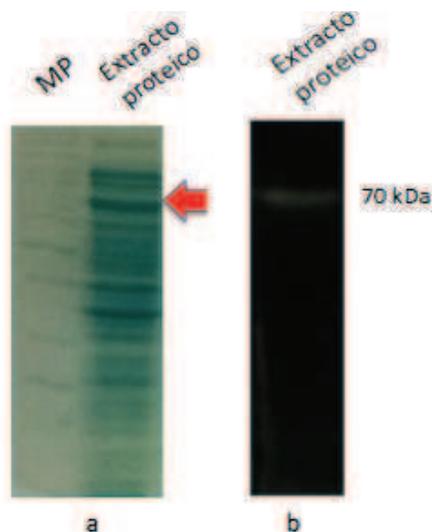


Figura 17. a) Gel SDS-PAGE teñido con GelCode: en el carril 1 se observa el marcador de peso molecular y en el segundo carril se presenta con una flecha roja a la proteína KesL en el extracto soluble, y b) Zimograma incubado con rafinosa al 10%.

7.4 Purificación de la proteína KesL

Como se mencionó anteriormente el vector de expresión en el que se encuentra clonada KesL deja una etiqueta de histidinas en el carboxilo terminal (Schmitt *et al.*, 1993), lo que permitió su purificación por medio de una columna de afinidad a níquel.

En la figura 18, se observan dos bandas, una correspondiente al peso molecular estimado de la enzima, con la fusión de la thioredoxina y la etiqueta de histidinas, y una segunda banda de menor peso molecular, la cual corresponde al peso molecular de la enzima con la etiqueta de histidinas, por lo que se decidió realizar un análisis de Western blot utilizando anticuerpos anti-histidinas. El análisis de Western blot demostró que las dos bandas contienen la etiqueta de histidinas, por lo tanto, se propone que la banda de menor peso molecular corresponde al producto de la proteólisis la proteína fusionada a la tiorredoxina.



Figura 18. Gel de purificación de la proteína por columna de afinidad.

Carril 1.- Extracto proteico, carril 2.- Lavados con 50 mM de imidazol, carriles 4-8.- Fracciones recolectadas a concentración de 150 y 200 mM de imidazol, y carril 10.- Marcador de peso molecular.

En la tabla 9 se reportan los resultados del proceso de purificación. Se recuperó el 37% de la enzima inicial, con un factor de purificación de 22 y una actividad específica de 247 U/mg de proteína. Este resultado es comparable a los

resultados reportados para otras purificaciones nativas realizadas por columna de afinidad en las que se alcanza una pureza mayor al 95% (Janknecht *et al.*, 1991)

Tabla 9. Datos de purificación de la enzima KesL

Muestra	Volumen (mL)	U/mL	Unidades totales (U)	Proteína (mg/mL)	U/mg proteína	Rendimiento de actividad (%)	Factor de purificación
Extracto enzimático	1.0	670.5	670.5	60.7	11.0	100.0	1.0
Columna Ni ²⁺	1.8	137.8	248.0	0.6	247.3	37.0	22.4

Unidades (U): Conversión de 1 μ mol de sacarosa por minuto a 37 °C y a un pH de 6.5

7.5 Caracterización bioquímica

Una vez establecidas las condiciones de producción y purificación de la enzima, se investigaron los parámetros óptimos de reacción.

Para la determinación de temperatura óptima se midió la actividad enzimática inicial global a 12 diferentes temperaturas en un intervalo de 21 a 70 °C, en las condiciones descritas en materiales y métodos, se usó como control negativo el una reacción estandar sin la muestra enzimática. Los valores de máxima actividad se muestran en la figura 19, donde se observa que la temperatura óptima resulto ser 60°C, la actividad enzimática presenta una caída drástica al llegar a los 70°C; muy probablemente por la inestabilidad de la enzima a esta temperatura. Considerando el factor de la inestabilidad de la enzima se realizó un nuevo ensayo pre-incubando la enzima 5 minutos a cada temperatura y posteriormente se midió la actividad inicial.

Los resultados de estas mediciones se presentan en la figura 20, en la cual se observa que la temperatura de máxima actividad en estas condiciones es de 50°C. Este resultado de temperatura concuerda con los reportados para las enzimas de *L. reuteri* con una temperatura de 50 °C (Ozimek *et al.*, 2005); *L.*

sanfranciscensis, la cual muestra una temperatura en un intervalo de 35-45 °C (Tieking et al., 2005), y 50 °C para *Bacillus* sp (Ben Ammar et al., 2002).

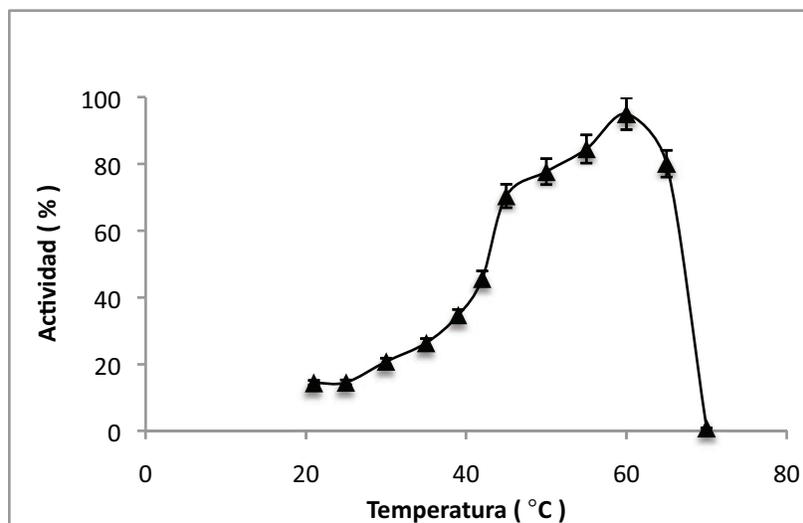


Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la actividad de KesL. Las condiciones de reacción fueron pH 6.5, 12% de sacarosa, 1 unidad de enzima y un volumen de reacción de 1 mL, la desviación estándar de los datos mostrados en la figura son en cada punto menores al 5%.

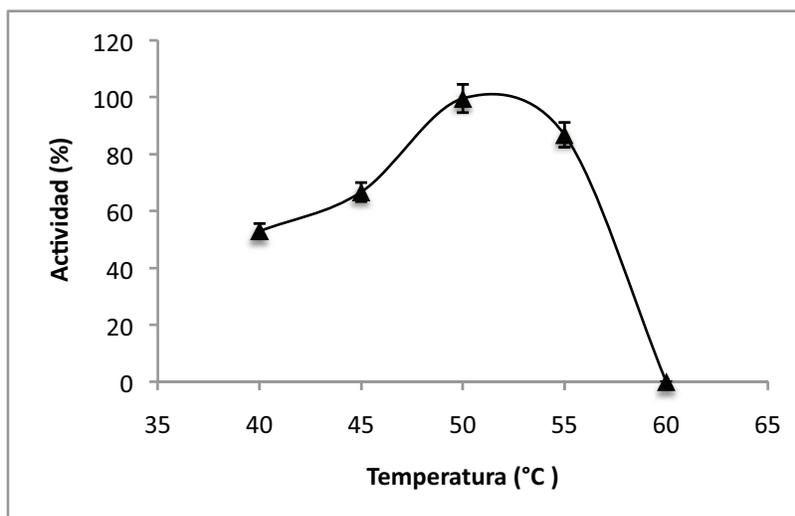


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la enzima KesL realizando una incubación previa de 5 minutos. Las condiciones de reacción fueron pH 6.5, 12% de sacarosa, 1 unidad de enzima, la desviación estándar de los datos mostrados en la figura son en cada punto menores al 5%.

Para determinar el pH óptimo de reacción se llevó a cabo la medición de actividad a 5 diferentes pHs en un intervalo entre 5.5 y 8, utilizando la temperatura óptima de la enzima determinada anteriormente (50 °C).

Los resultados se presentan en la figura 21 se observa que la máxima actividad se alcanza a pH 6, decayendo de manera gradual hasta llegar a pH 8, donde la actividad de la enzima disminuyó más del 60%. Estos resultados se encuentran dentro de los valores reportados para la levansacarasa de *Z. mobilis*, la cual tiene un pH de 6.5 (Liness y Doelle, 1983); la inulosacarasa de *L. reuteri* 121, la cual tiene un pH de 5.5 (van Hijum *et al.*, 2003); la levansacarasa de *B. subtilis*, la cual tiene un pH de 6 (Chambert *et al.*, 1974), y la levansacarasa de *G. diazotrophicus*, que tiene un pH de mayor eficiencia de 5 (Hernandez *et al.*, 1995).

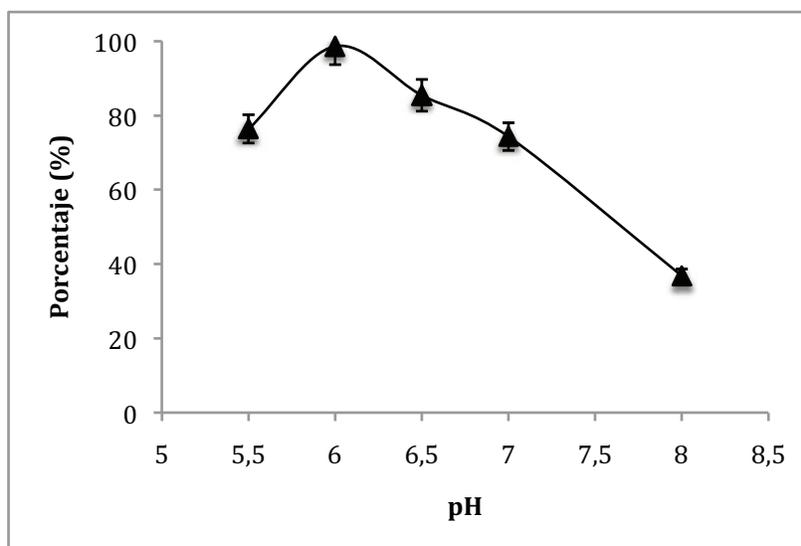


Figura 21. Efecto del pH en la actividad enzimática de kesL. Las condiciones de reacción fueron 50 °C, 12% de sacarosa, 1 unidad de enzima y un volumen de reacción de 1 mL, la desviación estándar de los datos mostrados en la figura son en cada punto menores al 5%.

Posteriormente se determinó el tiempo de vida media en las condiciones óptimas de reacción, es decir 50 °C y pH 6.0, el cual es de 35 horas. En comparación con otras FTFs de organismos mesófilos la estabilidad de la enzima es muy buena. Por ejemplo, en FTFs de bacterias gram positivas como la levansacarasa de *Bacillus circulans*, la cual tiene un tiempo de vida media de 2

horas a 50 °C (Pérez-Osegueda *et al.*, 1996) y la levansacarasa de *Bacillus natto*, a 50 °C tiene un tiempo de vida media de 55 minutos (Ben Ammer *et al.*, 2002).

En bacterias gram negativas como la levansacarasa de *Zymomonas mobilis*, presenta un tiempo de vida media de 14 minutos a 40 °C (Jang *et al.*, 2001); *Erwinia herbicola*, a 50 °C tiene un tiempo de vida media de 30 minutos (Cotee Iman, 1989), y la enzima LsdA de *G. diazotrophicus*, tiene una actividad residual del 90% una vez transcurrida 1 hora de incubación a 50 °C (Hernández *et al.*, 2005). Por lo tanto, se puede considerar que la enzima KesL es una de las fructosiltransferasas más termoestables identificadas hasta ahora.

7.6 Determinación de la especificidad de la reacción (relación hidrólisis-transferencia)

Con el fin de determinar la especificidad de la enzima KesL para transferir el residuo fructosilo de una molécula de sacarosa a una molécula de agua, (reacción conocida como hidrólisis), o hacia otra molécula de sacarosa o de levana en crecimiento, (reacción de transferencia), se cuantificó la glucosa y fructosa producidas y la sacarosa consumida mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La evolución de la reacción se determinó bajo las condiciones óptimas para KesL (50 °C a pH de 6.0) y se comparó con una reacción realizada a las condiciones reportadas en la literatura para diversas FTFs (37 °C y pH de 6.5), a tiempos de 12, 18 y 24 horas.

Se calculó el porcentaje de conversión de sacarosa durante la reacción, encontrando que a las 18 horas de reacción, la conversión de sustrato fue de 75.0 % a 37 °C y pH de 6.5 y de 78.1 % para 50 °C a pH de 6.0. La reacción se realizó, en su mayoría, en las primeras 3 horas, llegando a un 58% de conversión.

Posteriormente se calculó la relación hidrólisis-transferencia como se explica en la sección de materiales y métodos.

En las figuras 22 y 23 se observa que el porcentaje hidrólisis:transferencia se mantiene constante durante el tiempo de reacción y se observa que la relación hidrólisis:transferencia es en promedio de 75:25% para la reacción realizada a 37 °C y de 80:20% para la reacción desarrollada a 50 °C, ligeramente mayor la tasa de hidrólisis a mayor temperatura. Este resultado concuerda con lo reportado por Pérez-Oseguera *et al.* (1996), quienes indican que a 40 °C la transferencia es mayor que la reportada a 45 °C, ya que al aumentar la temperatura, la actividad hidrolasa se ve favorecida sobre la actividad transferasa en la levansacarasa de *Bacillus circulans*.

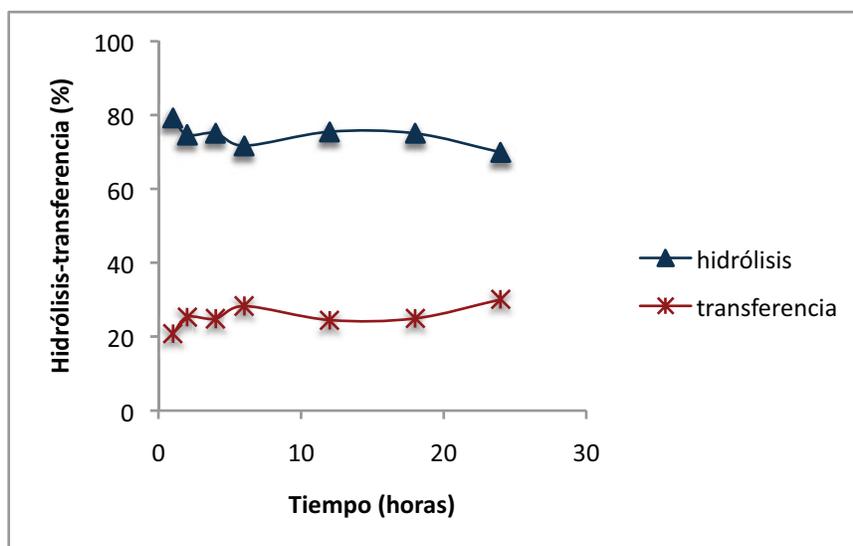


Figura 22. Porcentaje de hidrólisis-transferencia a 37 °C y pH de 6.5, utilizando 12% de sacarosa inicial y una unidad de enzima en un volumen de reacción de 1 mL.

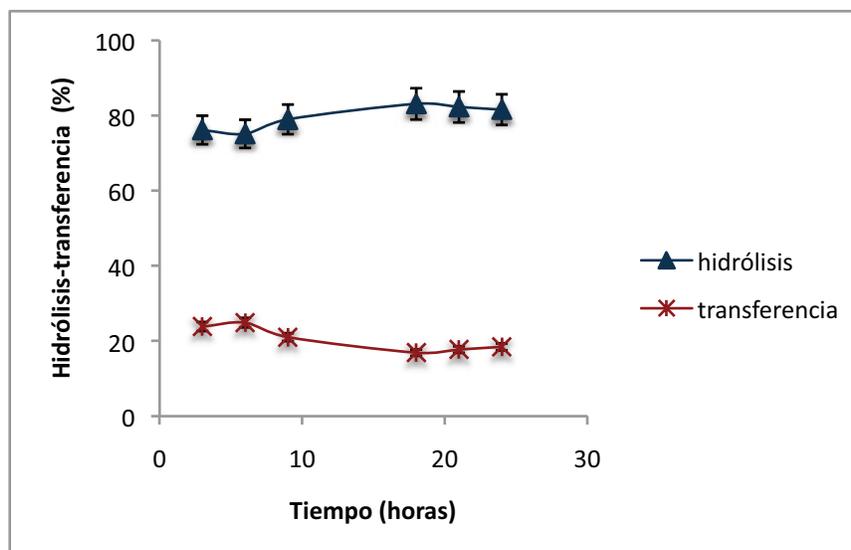


Figura 23. Porcentaje de hidrólisis transferencia a 50 °C y pH de 6.0, utilizando 12% de sacarosa inicial y una unidad de enzima en un volumen de reacción de 1 mL, la desviación estándar de los datos mostrados en la figura son en cada punto menores al 5%.

7.7 Caracterización enzimática

Con el objetivo de determinar el comportamiento cinético de la de la enzima KesL y calcular las constantes cinéticas correspondientes se realizó la medición de la actividad inicial catalítica en presencia de diferentes concentraciones de sacarosa. En las figuras 24 y 25 se observa que las cinéticas presentan un comportamiento que si bien tiende a la saturación como predice el modelo cinético de Michaelis Menten (MM) la zona de baja concentración de sustrato no parece de primer orden. Los datos fueron ajustados tanto con el modelo Micheliano, como con la ecuación de Hill determinando las constantes cinéticas para ambos modelos usando el programa Origin.

Los valores obtenidos para las condiciones óptimas de reacción (50 °C y pH6) con ambos modelos coincidieron, con una velocidad máxima (V_{max}) de $348.37 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{proteína}}$ y una constante de afinidad para la sacarosa (K_m) de 27.09 mM, esto con un valor para “n” en el modelo de Hill de uno. Sin embargo, para el caso de los valores a 37 °C y pH 6.5, en el que se aprecia una desviación al comportamiento de Michaelis Menten, como era de esperarse, se encontró una diferencia entre los parámetros cinéticos calculados para ambos modelos. En el

ajuste con el modelo de MM se obtuvo una velocidad máxima y una constante de afinidad de $204.52 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{proteína}}$ y 30.88 mM respectivamente, mientras que el ajuste utilizando la ecuación de Hill la K_m disminuye hasta 11.64 mM de sacarosa y la V_{max} a $164.69 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}_{\text{proteína}}$ pero con un valor de “n” de 2. Es claro que el modelo de Hill es solo un ajuste matemático de los datos experimentales ya que es sabido que una molécula de KesL contiene únicamente un sitio catalítico. Curiosamente, los valores de K_m obtenidos mediante la ecuación de Hill concuerdan con los reportados para la levansacarasa LsdA de *G. diazotrophicus*: 11.8 mM a 30°C (Hernández *et al.* 1995).

Es importante mencionar que las cinéticas fueron obtenidas, midiendo la actividad global, es decir, la evolución de los azúcares reductores (glucosa + fructosa) producidos como resultado de 2 de las reacciones que cataliza la enzima: la hidrólisis de la sacarosa liberando fructosa y la transferencia de la fructosa al polímero que se sintetiza. La magnitud relativa de estas dos reacciones varía en función de la concentración de sustrato a lo largo de la reacción así como por el cambio de temperatura, afectando directamente la aparición de azúcares reductores. Esta podría ser la razón por la cual los parámetros cinéticos obtenidos no coincidan al cambiar la temperatura.

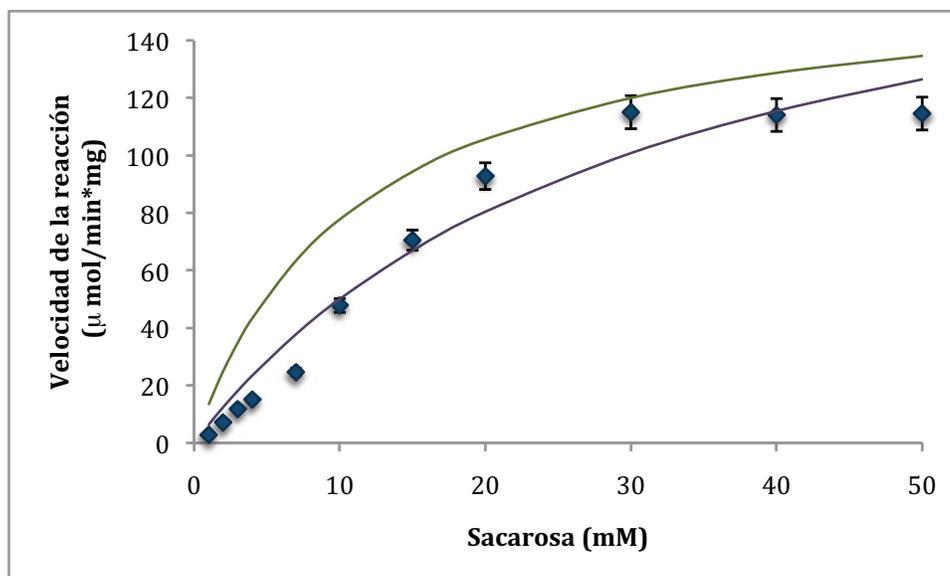


Figura 24. Representación gráfica del Modelo enzimático a pH 6.0 y con una temperatura de 37 °C (Azul: experimental, púrpura: calculada por MM y verde: calculada por Hills)., la desviación estándar de los datos mostrados en la figura son en cada punto menores al 5%.

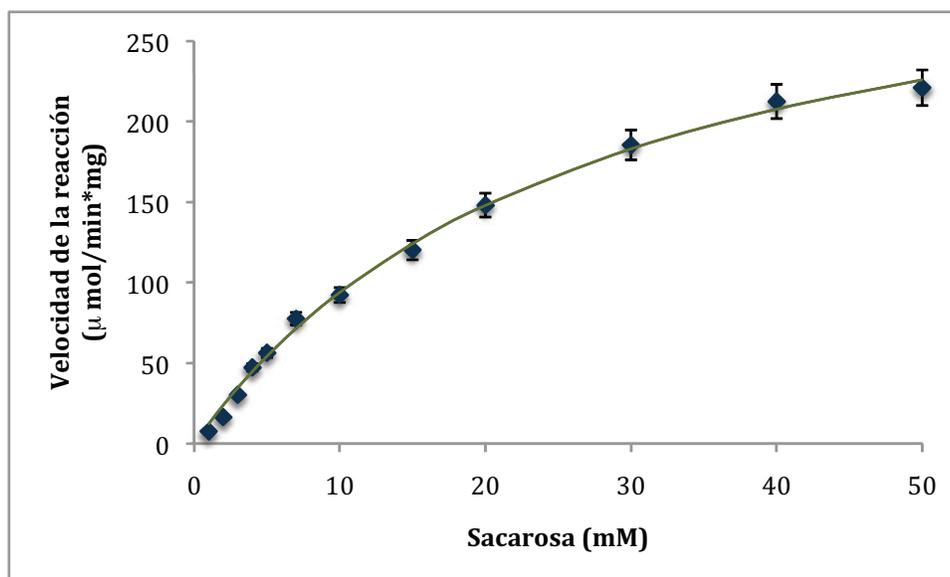


Figura 25. Representación gráfica del Modelo enzimático a pH 6.5 y con una temperatura de 50 °C (Azul: experimental, púrpura: calculada por MM y verde: calculada por Hills)., la desviación estándar de los datos mostrados en la figura son en cada punto menores al 5%.

Finalmente, con los datos descritos correctamente por el modelo de MM, se calculó la k_{cat} con un valor de 309.04 seg^{-1} para el cálculo de este valor se

consideró la presencia de la tioredoxina y la etiqueta de histidinas, este ensayo se realizó a 50 °C con un pH de 6.0.

7. 8 Caracterización de los productos de reacción

Con el fin de caracterizar los productos de reacción de la enzima KesL, primeramente se realizaron análisis mediante cromatografía en capa fina. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 26 y corresponden a una reacción estándar donde se alcanzó el 64% de conversión de sacarosa.

Como podemos observar, la enzima KesL produce tanto polímero como fructooligosacáridos de diferentes grados de polimerización (GF₃-GF₇), y en una mayor proporción un fructooligosacarido con un grado de polimerización cercano a 3 unidades. Con base a estos resultados, se decidió realizar una caracterización más fina, tanto del polímero como de los FOS producidos por esta enzima.

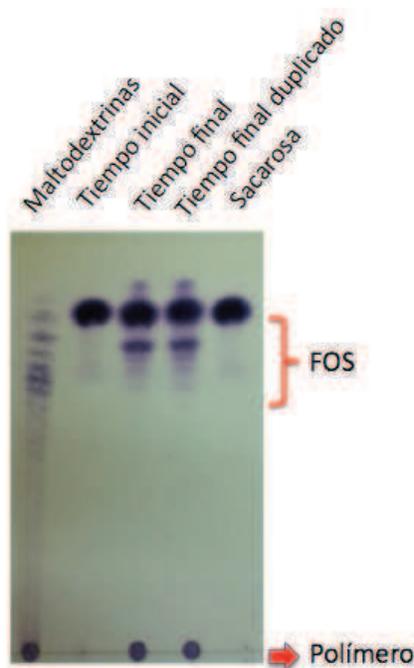


Figura 26. Cromatografía del perfil de producción por KesL a 18 horas

7.8.1 Caracterización del polímero

Con el propósito de identificar y determinar el peso molecular del polímero producido por la FTF de *B. phymatum*, se llevó a cabo un análisis mediante HPLC

en una columna de exclusión molecular y por resonancia magnética nuclear (C^{13} -RMN) del polímero producido en una reacción a 37 °C por 24 horas.

La cromatografía de exclusión molecular (figura 27) demostró que este polímero tiene una distribución normal con un peso molecular promedio de 3500 kDa, que corresponde a un grado de polimerización de 19,444 moléculas de fructosa.

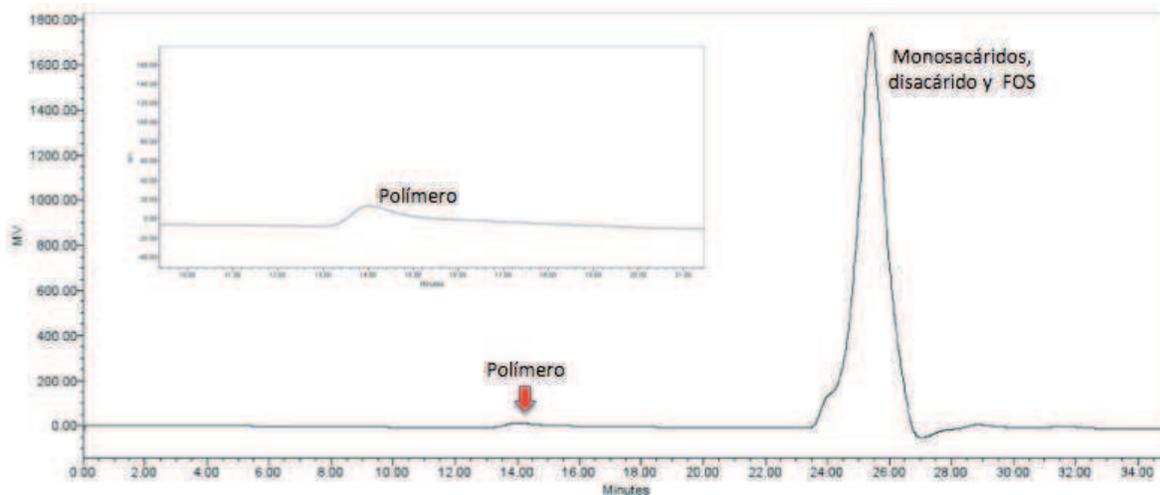


Figura 27. Cromatograma obtenido por HPLC con detector IR, utilizando columna de permeación en gel.

La identificación de la estructura del polímero producido por la enzima KesL recombinante fue determinada mediante resonancia magnética nuclear (RMN) del C^{13} . En la figura 28 se muestran seis señales de carbono a 59.83, 104.13, 76.22, 75.11, 80.23 y 63.30 partes por millón (ppm); por otro lado, la resonancia del carbono C-2 (N=104) indica la presencia de L-fructofuranosa. Al analizar este perfil con el reportado por Morales-Arrieta *et al.* (2006) y Van Hijum *et al.* (2006) se observa que son similares, por lo que se concluye que el polímero producido por la proteína KesL es de tipo levana debido a que las señales del carbono anomérico C2, los carbonos primarios C1 y C6 y, además, los carbonos del anillo C3, C4 y C5 son muy cercanos a las ppm reportadas en otros polímeros de levana (tabla 11).

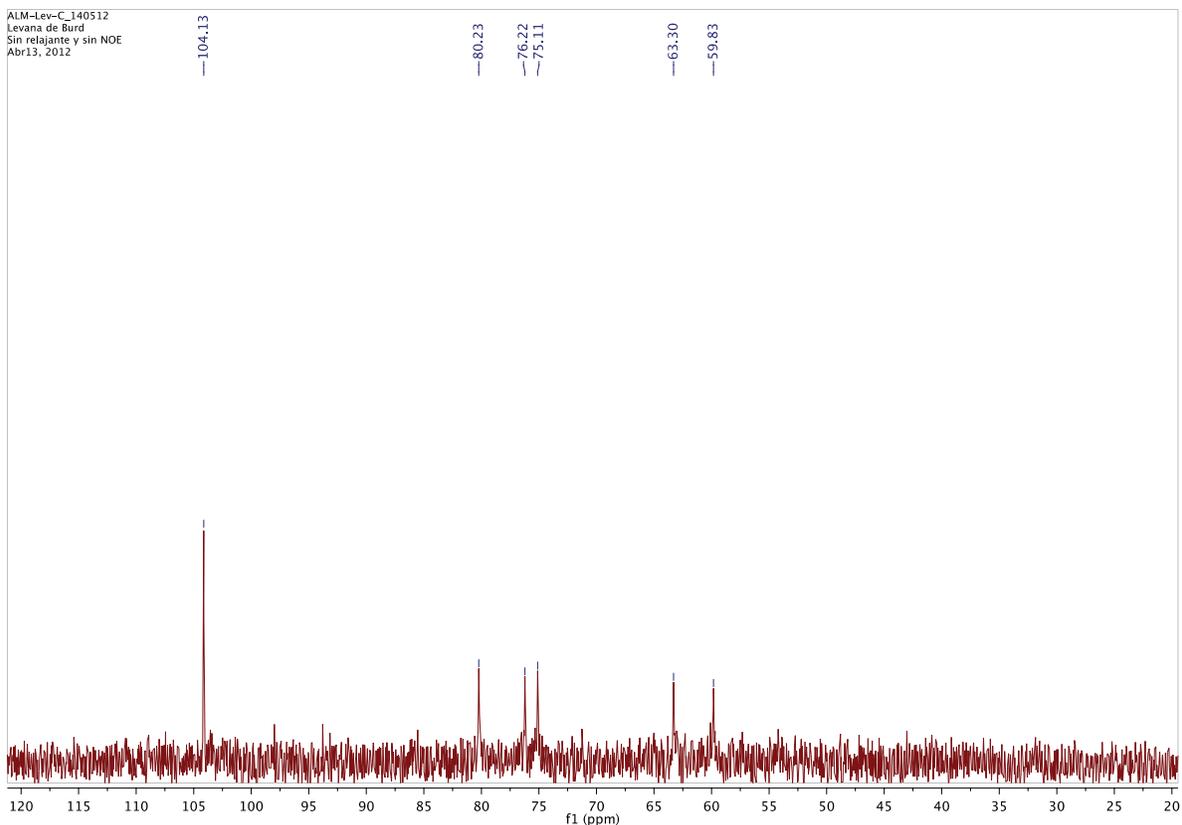


Figura 28. Espectro del RMN de la levana producida por la enzima KesL.

Tabla 10. Desplazamientos químicos del espectro de C^{13} -RMN de levana, inulina y el polímero de *B. phymatum*

Átomo de carbono	Levana (ppm)		Inulina (ppm)		Polímero de KesL (ppm)
	<i>L. reuteri</i> 121 ^a	<i>L. mesenteroides</i> ^b	<i>L. reuteri</i> 121 ^a	<i>L. johnsonii</i> ^c	
C-1	61.7	60.1	62.2	62.2	59.8
C-2	105.0	104.3	104.2	104.2	104.1
C-3	78.1	76.5	78.9	78.9	76.2
C-4	76.6	75.4	75.6	75.6	75.1
C-5	81.2	80.5	82.1	82.1	80.2
C-6	64.3	63.6	63.1	63.2	63.3

^a Van Hijum *et al.*, 2006

^b Morales-Arrieta *et al.*, 2006

^c Anwar *et al.*, 2010

7.8.2 Caracterización de FOS producidos por KesL

La producción de FOS y el polímero de bajo peso molecular fueron analizados mediante cromatografía líquida de intercambio aniónico de alta eficiencia con detector amperométrico de pulsos (HPAEC-PAD). Para este estudio se tomaron productos de reacción a 18 y 24 horas, así como estándares de 1-nistosa, 1-kestosa y 1-furanosil nistosa. El cromatograma obtenido se muestra en la figura 29.

Como se observa en el análisis cromatográfico, durante la reacción se generan 1-kestosa, 1-nistosa y 1-furanosil nistosa, se observan otras señales no identificadas, siendo el principal producto de reacción la 1-kestosa. Estos productos son similares a los reportados por Hernández *et al.* (1995) para la levansacarasa LsdA de *Gluconoacetobacter diazotrophicus*.

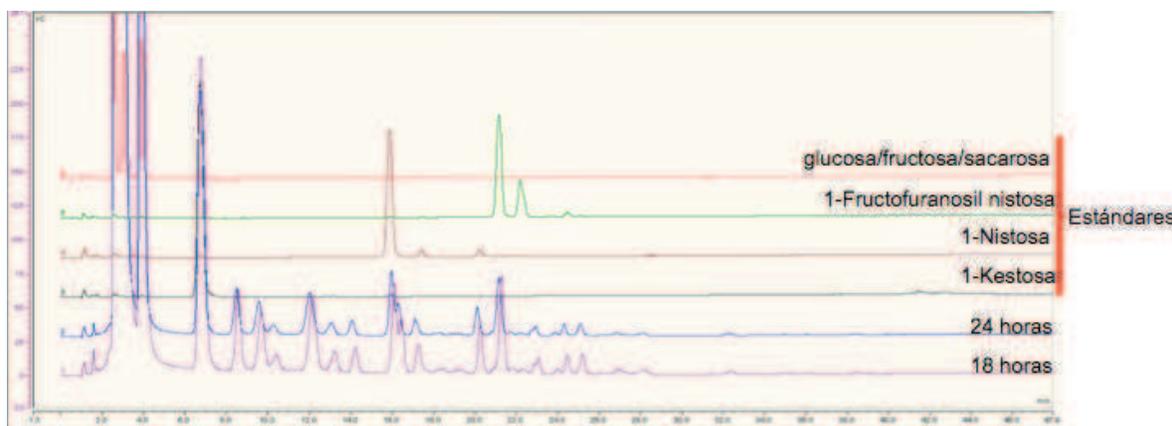


Figura 29. Cromatograma de FOS. En color rojo se muestra el estándar de sacarosa, glucosa y fructosa, de color verde se tiene la 1-fructosilnistosa, de color café se encuentra el estándar de 1-nistosa, en color negro se observa el estándar de 1-kestosa y en los colores púrpura y azul se observa el producto de reacción a las 18 y 24 horas, respectivamente.

7.8.3 Cinética de reacción

Para analizar la evolución de la producción de FOS durante la reacción, se llevó a cabo la cuantificación de los FOS durante 24 horas de reacción a dos condiciones de temperatura: 37 y 50 ° C. Se observó que la mayor cantidad de FOS se obtiene cuando la conversión de la sacarosa es del 64%, a 37 °C y en ambas condiciones existe un decaimiento de la concentración de 1-kestosa

posterior al 68% de conversión, probablemente debido a la hidrólisis de dicho producto.

Finalmente, con la idea de determinar cuánto sustrato transferido es dirigido hacia la síntesis de 1-kestosa (principal FOS producido por KesL), a la síntesis de polímero y a otros FOS, se cuantificó sustrato y productos. En la tabla 11 se describen los resultados de este ensayo, en ésta podemos observar que en condiciones de pH 6.5, a 37 °C, y cuando se logra un 64% de conversión de sacarosa, es donde se obtiene la mayor concentración de 1-kestosa cuantificada (19.72%); estos resultados concuerdan con los reportados para *G. diauzotrophicus* que tiene una concentración 15% de FOS producidos del total de sustrato consumido (50%).

Tabla 11. Porcentaje de los productos de reacción (hidrólisis y transferencia)

Porcentaje de conversión de la sacarosa (%)	Condición a 37 °C, pH 6.5			Condición a 50 °C, pH 6.0		
	Hidrólisis (%)	1-kestosa (%)	Polímero y otros FOS (%)	Hidrólisis (%)	1-kestosa (%)	Polímero y otros FOS (%)
58	-	-	-	76.16	13.99	9.85
64	75.49	19.72	4.79	-	-	-
66	-	-	-	75.12	12.89	11.99
68	-	-	-	78.98	12.98	8.04
69	75.04	16.45	8.52	83.11	11.43	5.46
82.0	-	-	-	82.28	11.06	6.66
77	69.91	13.16	16.93	81.55	10.21	8.24

- Valor no dado

Con estos resultados se puede proponer que la mejor temperatura para la producción de FOS es a 37 °C y no de 50 °C, que es la temperatura óptima de la enzima. Para llevar a cabo la determinación de la actividad global se midieron los azúcares reductores mediante DNS; por lo tanto, si la especificidad de la enzima se inclina hacia la hidrólisis se apreciará una actividad aumentada debido a que se cuantificó, tanto fructosa como glucosa derivados de la hidrólisis de la sacarosa.

Por otro lado, si la enzima modifica su especificidad hacia la transferencia, se cuantificaría una menor cantidad de azúcares reductores debido a que por cada molécula de sacarosa, sólo una molécula de glucosa sería liberada, mientras que la molécula de fructosa se integraría al FOS en crecimiento; por lo tanto, se propone que a 50°C es probablemente la temperatura óptima de hidrólisis y no de transferencia, por lo que será necesario determinar la actividad de hidrólisis y de transferencia a las diferentes condiciones de reacción.

7.9 Identificación de posibles inhibidores de la levansacarasa de *Burkholderia phymatum*

Como se mencionó anteriormente, se ha propuesto que las levanas en el género de *Burkholderia* están involucradas en el mecanismo de adhesión de este microorganismo al huésped, ya sea para desarrollarse como patógeno o como simbiote, por lo que su estudio podría ayudar a comprender el proceso de colonización de este microorganismo.

Una forma de comprobar lo anterior es a través de la inhibición de la actividad de las levansacarasas responsables de la producción de las levanas, determinando si esto afecta la capacidad *Burkholderia* para colonizar. Con base en lo anterior, se decidió realizar un estudio de acoplamiento molecular *in silico* (*docking*) con el fin de identificar inhibidores de esta enzima, el cual está basado en la analogía estructural del sustrato (sacarosa).

7.9.1 Validación del método del screening virtual

Para esta parte del trabajo, se llevó a cabo el estudio de acoplamiento de la molécula de sacarosa (sustrato natural) en el modelo de KesL-S (generado anteriormente), ambos previamente preparados y optimizados.

A partir de este análisis se seleccionó al confórmero de sacarosa, acoplado a KesL-S, de menor energía ($\Delta G_{\text{unión}}$), correspondiente a -10.30 kcal/mol, el cual es un indicativo de una alta afinidad del ligando por el sitio de unión. Este

acoplamiento fue comparado con la estructura de la levansacarasa (SacB) de *B. subtilis* PDB: 1PT2, misma que se encuentra co-cristalizada con sacarosa (Meng y Futterer, 2003). En la figura 30, se observa que el conformero de la sacarosa del acoplamiento teórico presenta una alta similitud con la sacarosa co-cristalizada en la estructura 1PT2. Este análisis permite confirmar que la metodología de *docking* empleada es consistente y emite un resultado teórico confiable, para ampliar su evaluación a otra serie de moléculas.

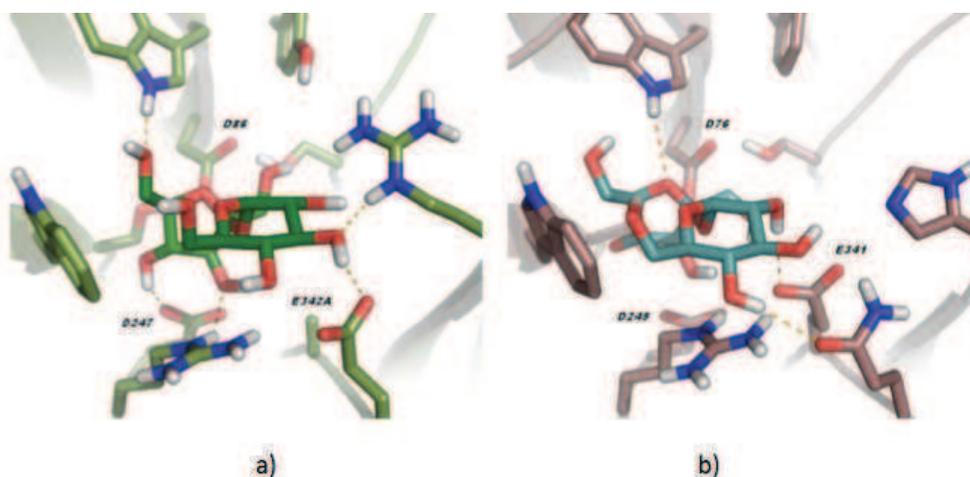


Figura 30. Comparación entre la sacarosa co-cristalizadas en la levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis* (a) y el acoplamiento teórico con KesL (b).

El acoplamiento de la sacarosa con KesL-S también es congruente con el mecanismo de reacción de la levansacarasa de SacB , en donde se describe que al ingresar al sitio activo, la sacarosa se estabiliza, vía formación de puentes de hidrógeno, con los aminoácidos estructurales, reacciona con el ácido aspártico 86 (Asp⁷⁶ para el modelo de KesL) y forma un enlace covalente entre la sacarosa y la enzima, mientras que los ácidos aspártico 247 y glutámico 342 (Asp²⁴⁹ y Glu³⁴¹) estabilizan el estado de transición durante la separación de la glucosa para la formación del complejo fructosil-enzima y la transferencia de la fructosa a una nueva molécula de sacarosa.

Así mismo, este acoplamiento muestra la proximidad de los residuos Glu³⁴² (Glu³⁴¹) y Arg²⁴⁸, los cuales favorecen el mecanismo de transferencia protónica para el rompimiento del enlace glucosa-fructosa de la sacarosa (Yuan *et al.*, 2012). En la figura 31 se muestra la representación esquemática de dicho proceso.

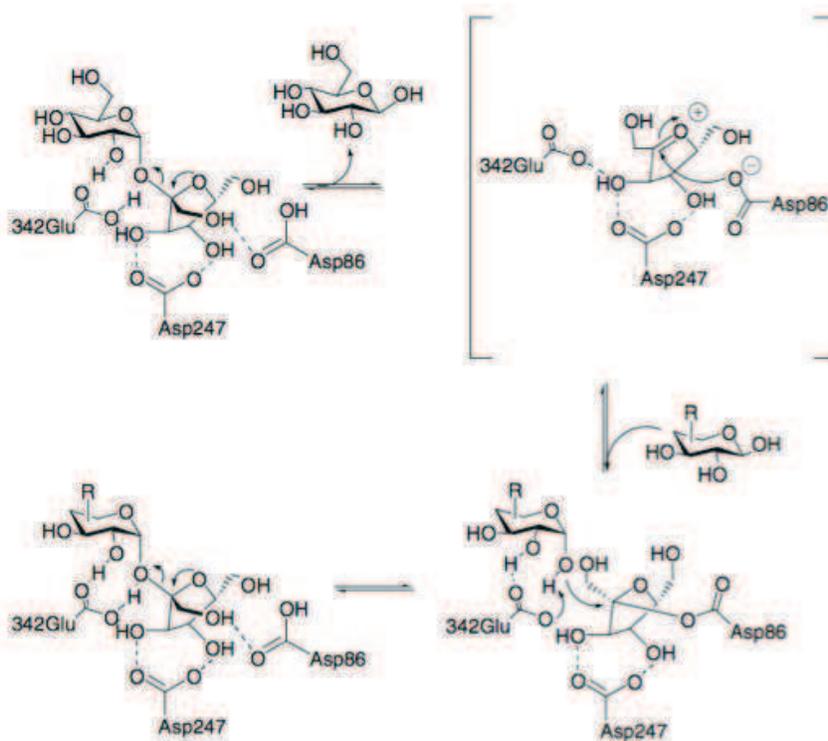
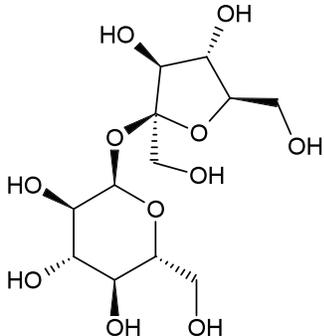
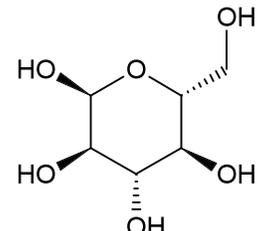
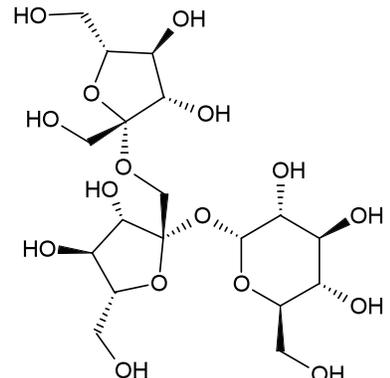
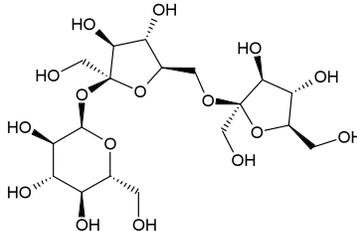


Figura 31. Representación esquemática del mecanismo enzimático de la levansacarasa SacB
Modificado de Seibel *et al.* 2006.

Con base en la validación del estudio de acoplamiento molecular con la de la sacarosa, se realizó un estudio de acoplamiento molecular con diversas moléculas relacionadas con los productos y subproductos de dicha enzima, tales como la glucosa, 6-kestosa y la 1-kestosa (tabla 13), a fin de conocer las posibles conformaciones estructurales que estos cuatro azúcares adquirirían en el sitio activo (figura 32 y 33).

Tabla 12. Acoplamiento de carbohidratos en el sitio activo de la enzima

Compuesto	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	Compuesto	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)
 <i>sacarosa</i>	-10.30	 <i>glucosa</i>	-5.57
 <i>1-kestosa</i>	-7.90	 <i>6-kestosa</i>	-8.45

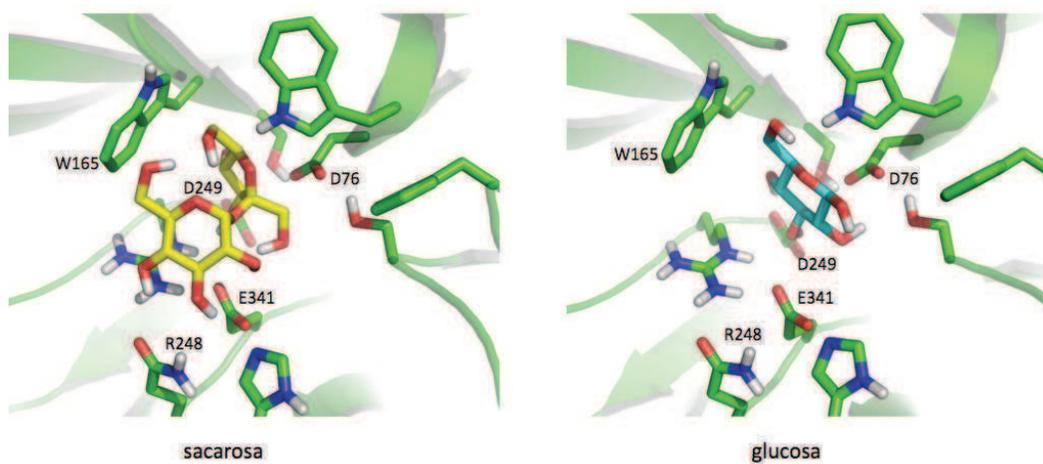


Figura 32. Representación esquemática de los acoplamientos moleculares calculados para las estructuras de la sacarosa y la glucosa.

Los resultados reportados en la tabla 12 muestran que la energía de unión ($\Delta G_{\text{unión}}$) de la sacarosa es menor a la de la glucosa; sin embargo, en el acoplamiento molecular se observa como la glucosa enmascara el sitio activo de la enzima, por lo que la glucosa podría ser un posible inhibidor de la enzima KesL, además, nuestros cálculos demuestran que una vez alcanzado el 76% de conversión de sacarosa en el medio de reacción, existe una concentración de 28.8 g/L de sacarosa residual y una concentración estimada de 48 g/L de glucosa, motivo por el cual se puede proponer que existe una alta competencia por el sitio activo entre la sacarosa y la glucosa; sin embargo, la glucosa no es usada como sustrato.

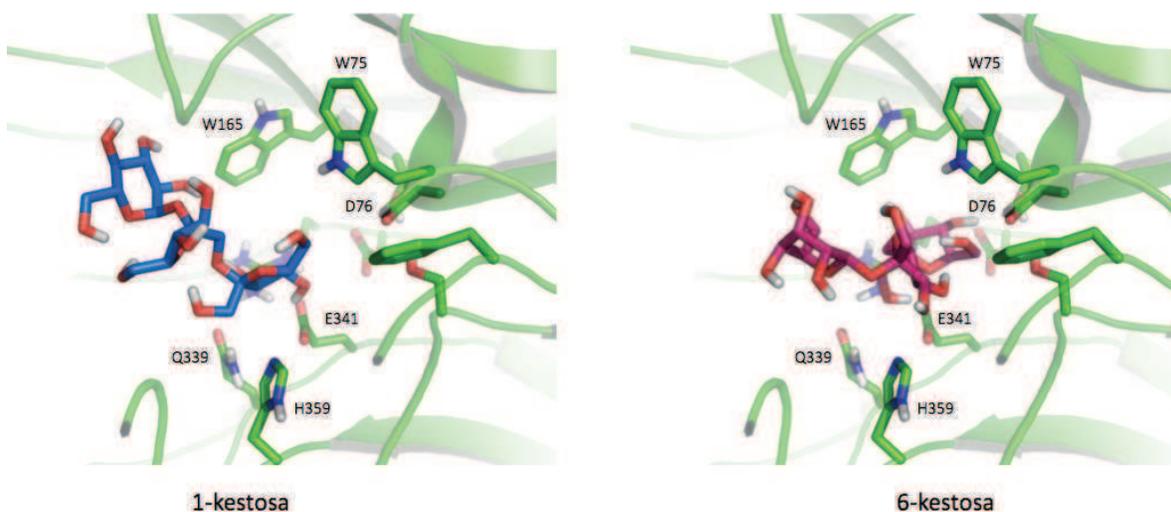


Figura 33. Representación esquemática de los acoplamientos moleculares calculados para las estructuras de la 1-kestosa y la 6-kestosa.

En el acoplamiento generado con la 1-kestosa se obtuvo una energía de unión baja (-7.9 kcal/mol) comparado con las otras estructuras; sin embargo, en la visualización del acoplamiento (figura 33) se puede observar que la fructosa terminal no se encuentra próxima al aminoácido Asp⁷⁶ y al sitio +1 de la enzima en comparación con la 6-kestosa, la cual presenta una conformación estructural preferencial para su enlongación.

Tomando en cuenta esta información, se puede suponer que 1-kestosa se encuentra expuesta como aceptor del grupo fructosilo y la 6-kestosa podría actuar

como donadora del grupo fructosilo. Sin embargo, este estudio es preliminar ya que los acoplamientos mostrados se dan de acuerdo a la menor energía de unión.

Observando el acoplamiento del sustrato y productos de la reacción podemos validar el método con los resultados de los acoplamientos obtenidos, y es por esto que se decidió realizar la búsqueda de los posibles inhibidores de la enzima KesL.

7.9.2 Estudios para la identificación de los posibles inhibidores

Con el fin de identificar posibles inhibidores de la enzima KesL, se optó por realizar un estudio de *screening* virtual empleando el servidor LIDAEUS. Este servidor nos permitió generar un mapa farmacofórico basado en el potencial electrostático del sitio activo, para ser empleado en la evaluación de la biblioteca de moléculas de EDULISS. Los *puntos de sitio* generados a partir del cálculo de la distribución superficial del potencial electrostático se situaron a lo largo del sitio de unión propuesto, tal como se muestra en la figura 34.

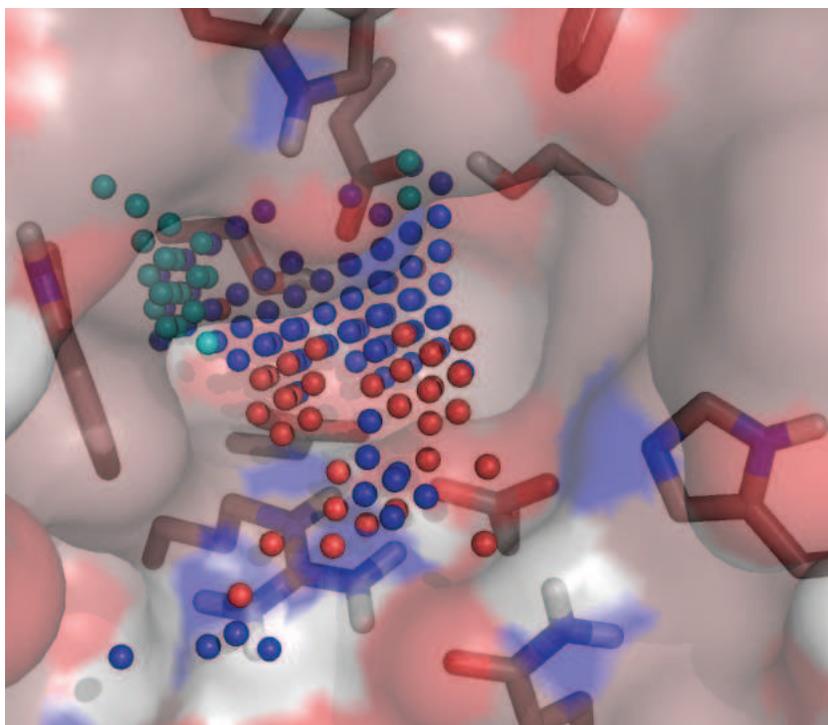


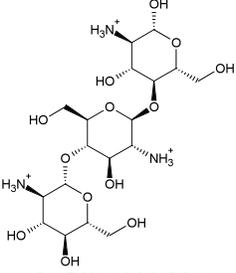
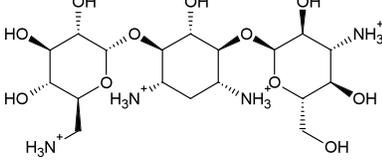
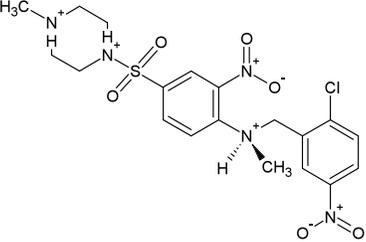
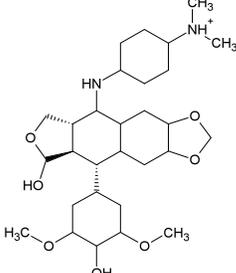
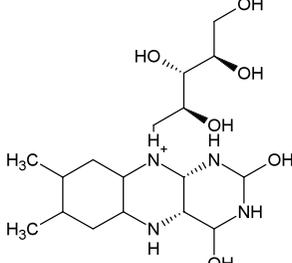
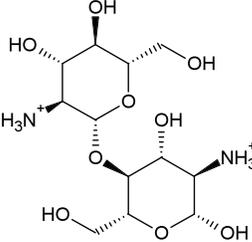
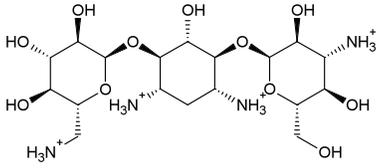
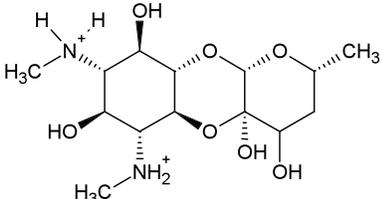
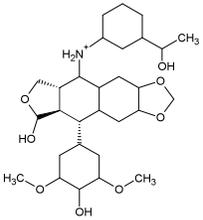
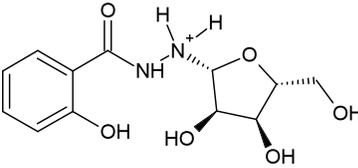
Figura 34. Representación de los puntos de sitio en el modelo del KesL.

Con base en este mapa farmacofórico, el servidor LIDAEUS logró identificar 5,000 moléculas, de las cuales se seleccionaron a las primeras 50 que presentaron una baja energía de unión. Estas moléculas se descargaron y optimizaron para ser evaluadas con *AutoDock 4.0*, para finalmente seleccionar las 20 estructuras con la menor energía de unión, el nombre IUPAC de las estructuras seleccionadas se muestran en el apéndice 4.

En la tabla 13 se reportan las 20 estructuras que presentaron mayor afinidad por el sitio activo de la enzima, las cuales se encuentran identificadas con la clave alfanumérica de la biblioteca de EDULISS, y en donde se reporta su energía de unión y la constante de inhibición teórica ($K_{i_{teo}}$). La energía de unión y la K_i teórica son parámetros útiles para ser empleados en estudios comparativos con resultados experimentales, permitiendo explicar la posible causa de diferencias de afinidad. Se revisaron los acoplamientos a fin de identificar las posibles interacciones enzima-ligando en el sitio activo de la enzima, con el objetivo de predecir e identificar el posible mecanismo de inhibición competitiva.

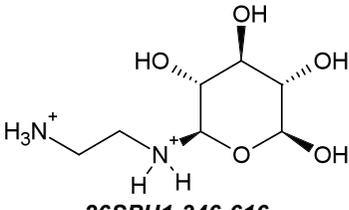
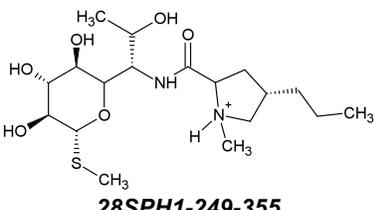
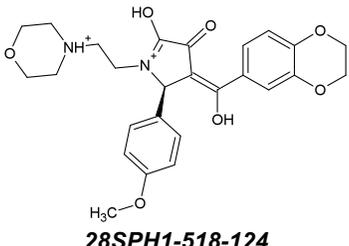
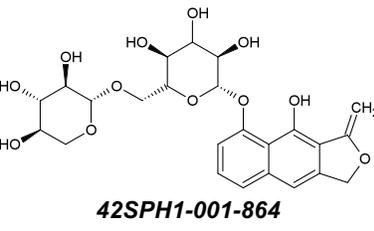
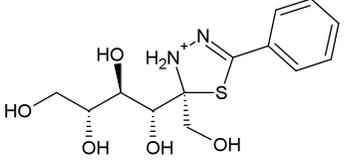
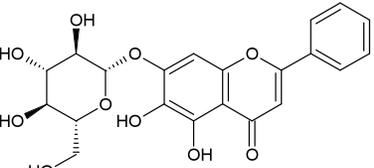
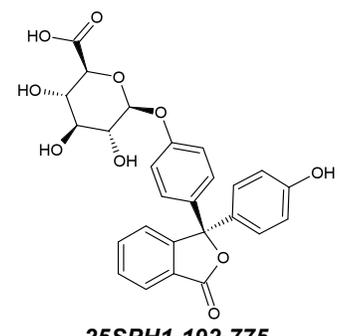
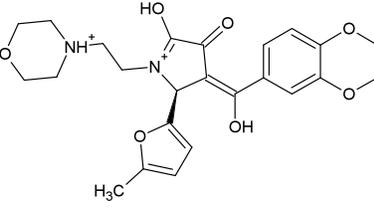
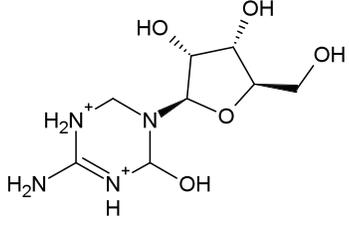
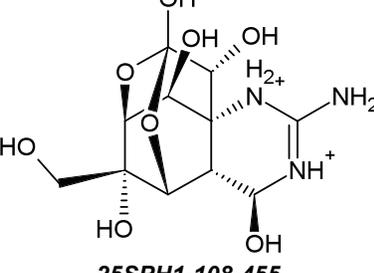
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 13. Moléculas obtenida

Compuesto	ΔG (kcal/mol)	$K_{i_{teo}}$ (nM)	Compuesto	ΔG (kcal/mol)	$K_{i_{teo}}$ (nM)
 8SPH1-144-931	-13.42	0.15	 8SPH1-152-434	-11.71	2.59
 31DRH1-853-297	-11.38	4.52	 35SPH1-104-225	-10.33	26.98
 39SPH1-015-991	-10.21	32.66	 25SPH1-188-314	-10.16	35.87
 8SPH1-140-994	-9.71	76.86	 28SPH1-249-427	-9.60	91.48
 35SPH1-093-633	-9.60	91.91	 26SPH1-695-498	-9.56	97.97

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

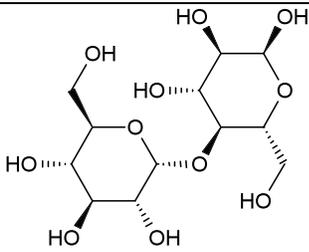
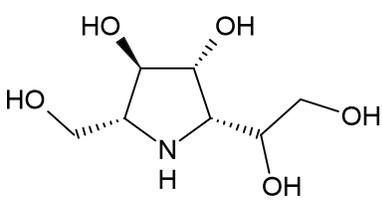
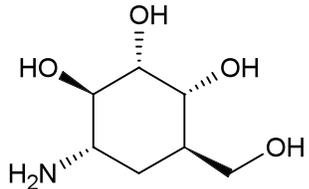
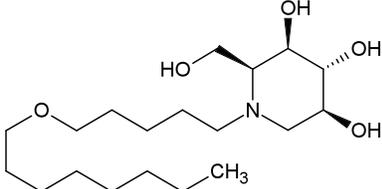
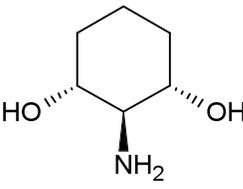
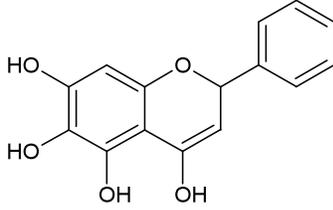
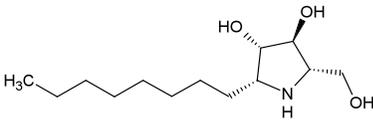
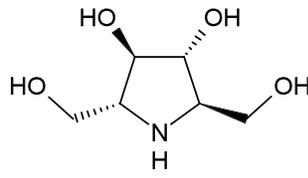
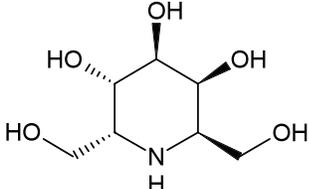
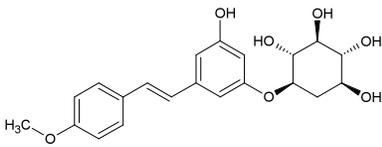
Continuación tabla 13

Compuesto	ΔG (kcal/mol)	$K_{i_{teo}}$ (nM)	Compuesto	ΔG (kcal/mol)	$K_{i_{teo}}$ (nM)
 26SPH1-346-616	-9.54	101.05	 28SPH1-249-355	-9.14	199.85
 28SPH1-518-124	-9.08	219.38	 42SPH1-001-864	-8.99	255.57
 26SPH1-286-328	-8.99	256.86	 26SPH1-676-594	-8.94	281.49
 25SPH1-192-775	-8.93	285.66	 28SPH1-563-794	-8.90	298.24
 35SPH1-029-097	-8.73	399.35	 25SPH1-108-455	-8.71	414.90

Adicional a la búsqueda de inhibidores por *screening* virtual, se realizó un estudio de acoplamiento molecular con inhibidores no activos de las invertasas y sacarosas de mamíferos presentes en la biblioteca de *PubChem*, además se corroboró que no presentaran toxicidad en los ensayos realizados con mamíferos. Esta propuesta se planteó considerando la alta similitud de las levansacarosas con estas enzimas, y con el fin de identificar un posible inhibidor que no interfiera en la actividad de las enzimas de mamífero. En la tabla 14 se reportan 10 de las moléculas con menor energía de unión obtenidas de la biblioteca de *PubChem*, el nombre IUPAC de dichas estructuras se muestra en el apéndice 4. En el apéndice 5 se reportan los bioensayos que corroboran la inactividad de dichas moléculas en mamíferos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 14. Moléculas de la biblioteca de PubChem como posibles inhibidores de la KesL.

Compuesto	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	$K_{i\text{teo}}$ (mM)	Compuesto	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)	$K_{i\text{teo}}$ (mM)
 439341	-7.95	1.48	 13005892	-7.68	2.33
 44265828	-7.61	2.66	 53325720	-7.40	3.77
 13375420	-7.35	4.10	 5281605	-7.29	4.55
 53317742	-7.25	4.88	 124702	-7.09	6.34
 6475030	-7.07	6.56	 44350032	-6.94	8.19

Observando la tabla 14 es notable hacer hincapié en que a pesar del tamaño de la biblioteca evaluada (4 millones de moléculas) los inhibidores más representativos presentan estructuras similares al sustrato.

Observando los valores energéticos de unión de las moléculas expuestas anteriormente se decidió considerar únicamente las que presentaran una energía de unión menor a la de la sacarosa (-10.30 kcal/mol), los acoplamientos de las cuatro moléculas seleccionadas se muestran en las figuras 35-38.

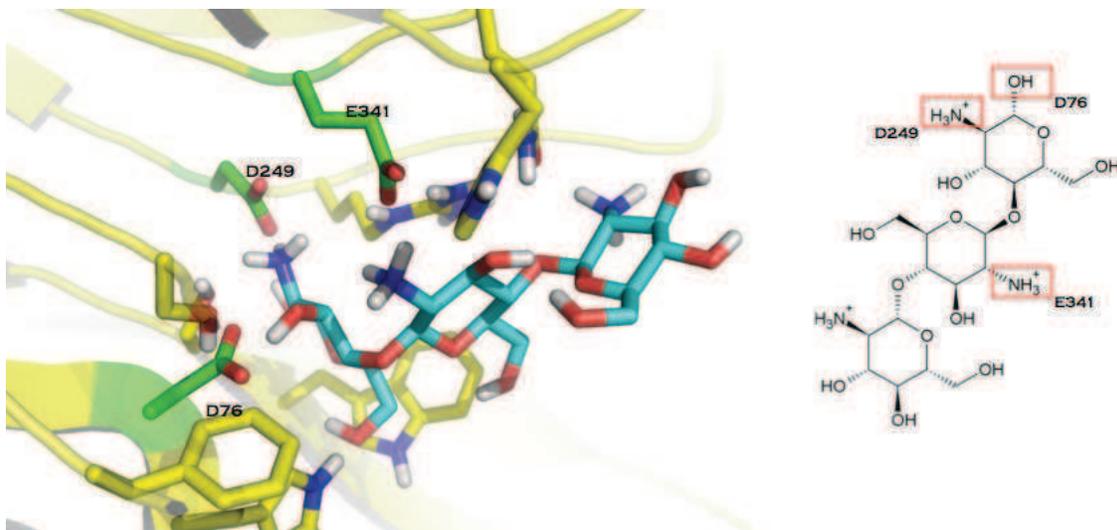


Figura 35. Modelamiento molecular del quitosán en el sitio activo del modelo KesL-S (8SPH1-144-931).

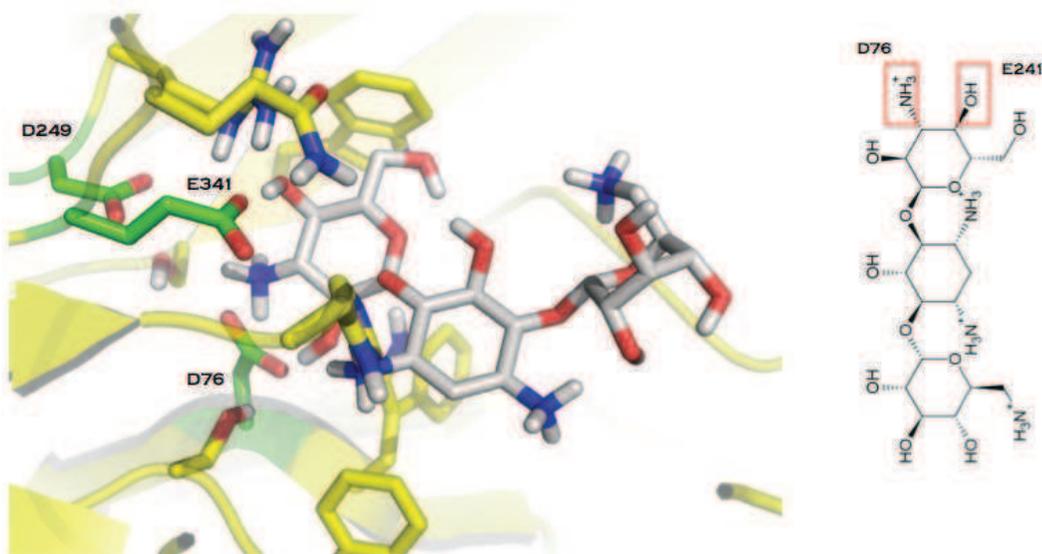


Figura 36. Modelamiento molecular de la kanamicina en el sitio activo del modelo KesL-S (8SPH1-152-434).

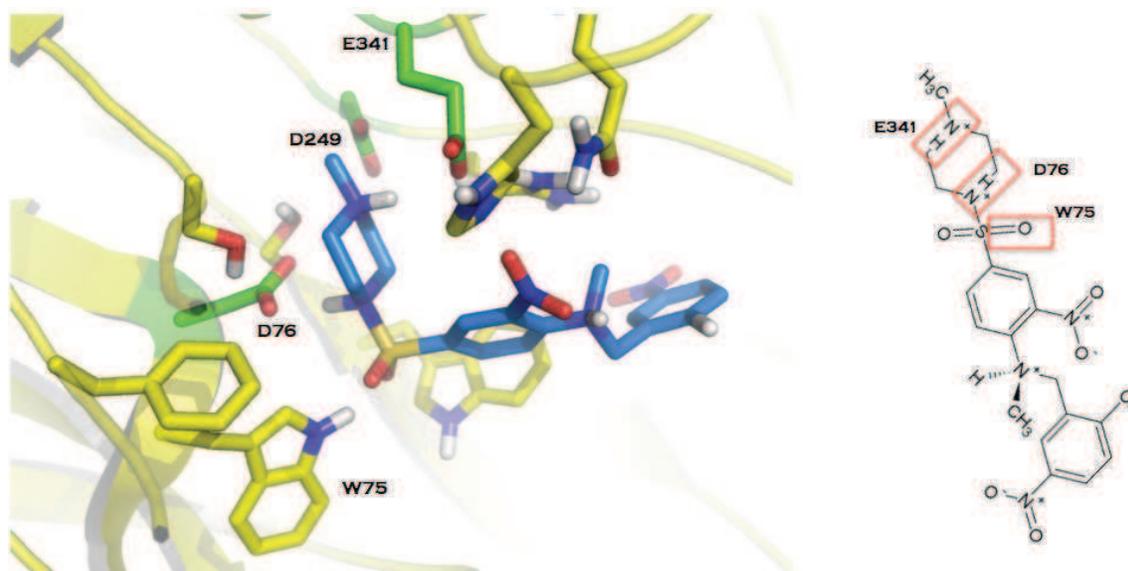


Figura 37. Modelamiento molecular del compuesto *N*-[(2-cloro-5-nitro-fenil)metil]-*N*-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)sulfonil-2-nitro-anilina en el sitio activo del modelo KesL-S (39SPH1-015-991).

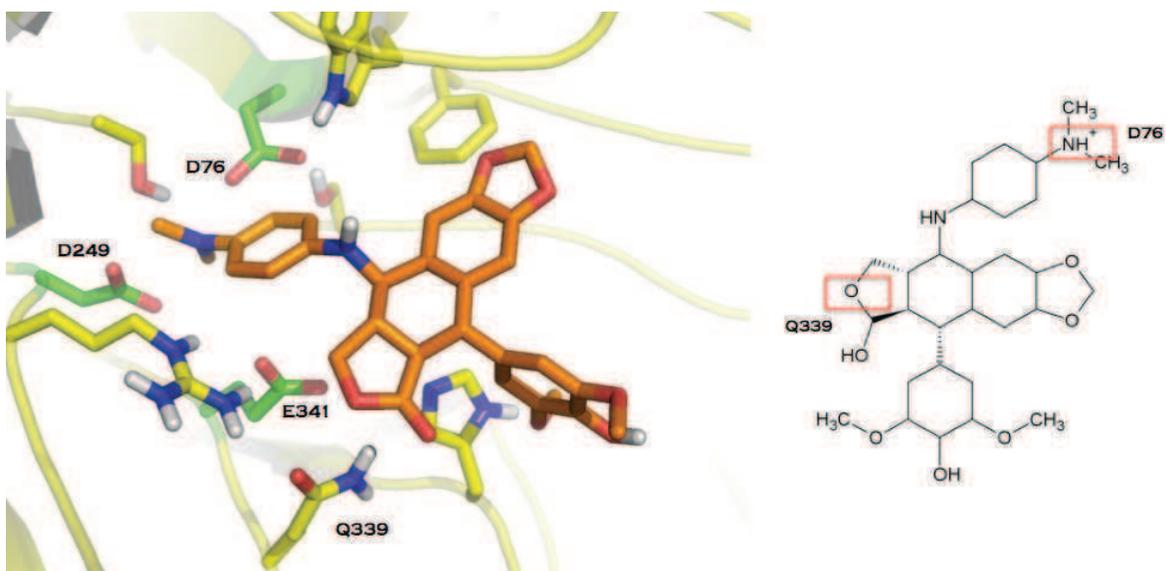


Figura 38. Modelamiento molecular del compuesto (5S,5aS)-5-[4-(dimetilamino)anilino]-9-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-5^a,6,8^a,9-tetrahidro-5H-[2]benzofuro[5,6-f][1,3]benzodioxol-8-uno-clorhidrato en el sitio activo del modelo KesL-S (35SPH1-104-225).

Observando todos los acoplamientos, el chitosan es el que tiene una mayor interacción con el sitio activo, es por esto que como perspectiva de este trabajo proponemos hacer ensayos con chitosan y kanamicina.

8. CONCLUSIONES

- Se identificó la secuencia de una FTF en el genoma de la cepa *Burkholderia phymatum* denominada KesL.
- Mediante ensayos *in silico* y el análisis de los residuos catalíticos se propuso que el posible plegamiento de la FTF es una beta propela y presenta los residuos catalíticos propios de las FTFs reportadas en la interfase de la enzima.
- Se aisló y clonó el gen que codifica para KesL no reportada anteriormente.
- La enzima se expresó heterológamente en *E. coli*, se llevó a cabo la producción de la ésta por fermentación obteniendo una actividad volumétrica de 4.67 U/ml de fermentación.
- La enzima se purificó por afinidad a columnas de níquel, con un rendimiento de 37%, un factor de purificación 22.4 y una actividad específica de 247.3 U/mg de proteína.
- La enzima purificada presenta las siguientes propiedades bioquímicas: condiciones óptimas de actividad catalítica a pH 6.0 y 50 °C, en estas condiciones la enzima mostró una alta estabilidad, con un tiempo de vida media de 35 horas y una Km de 27.09 mM de sacarosa y una kcat de 309.04 seg⁻¹.
- Los productos de reacción de KesL usando sacarosa como sustrato son; glucosa, fructosa, polímero de fructosa y fructooligosacáridos. La relación de hidrólisis/transferencia a 69% de conversión fue de 80/20. El polímero producido, caracterizado por RMN resultó ser levana con un PM promedio de 3,500 kDa. Los FOS caracterizados por cromatografía de intercambio aniónico con pulso amperométrico, fueron identificados como de 1-kestosa, 1-nistosa y 1-furanonistosa, por comparación con estándares. El producto mayoritario de estos

últimos fue la 1-kestosa ya que del 20% de transferencia el 65% se dirigió hacia la síntesis de 1-kestosa.

- Mediante un screening virtual, se lograron identificar posibles inhibidores de la fructosiltransferasa donde se mesura al oligosacárido de chitosan y la kanamicina como inhibidores competitivos más probables ya que su energía de unión teórica fue la menor (-13.42kcal/mol) y en el acoplamiento molecular muestra su correcta interacción dentro del sitio activo.

9. PERSPECTIVAS

- Estudiar el mecanismo de reacción de KesL, con el fin de poder comprender su especificidad a la síntesis de FOS.
- Obtener los valores de K_m y k_{cat} de hidrólisis y transferencia, así como determinar las condiciones óptimas de pH y temperatura en la reacción de transferencia.
- Buscar estrategias para disminuir la hidrólisis aumentando la transferencia de la sacarosa en la reacción catalizada por KesL.
- Realizar la caracterización de fructooligosacáridos, así como su aplicación como prebióticos.
- Probar los compuestos propuestos (chitosan y kanamicina) como inhibidores de la enzima KesL.

10. REFERENCIAS

- Achouak W, Christen R, Barakat M, Martel H y Heulin T (1999) *Burkholderia caribensis* sp. nov., and exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique. *Int J Syst Bacteriol* 49(2):787-294.
- Anwar MA, Kralj S, Pique AV, Leemhuis H, van der Maarel MJEC y Dijkhuizen L (2010) Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology* 156(4):1264-1274.
- Arrieta J, Hernández L, Coego A, Suárez V, Bamori E, Menéndez C, Petit-Glatron MF, Chambert R y Selman-Housein G (1996) Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology* 142(5):1077-1085.
- Arrieta JG, Sotolongo M, Menéndez C, Alfonso D, Trujillo LE, Soto M, Ramírez R y Hernández L (2004) A type II protein secretor pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Journal of Bacteriology* 186(15):5031-5039.
- Banguela A y Hernández L (2006) Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotechnología Aplicada* 23(3): 202-210.
- Ben Ammar Y, Matsubara T, Ito K, Iizuka M, Limpaseni T, Pongsawasdi P y Minamiura N (2002) Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *J Bioechnol* 99(2):111-119.
- Bergeron LJ, Morou-Bermudez E y Burne RA (2000) Characterization of the fructosyltransferase gene of *Actinomyces naeslundii* WVU45. *J Bacteriol* 182(13):3649-3654.
- Bereswill S, Jock S, Aldridge P, Janse JD y Geider K (1997) Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. *Physiol Mol Plant Path* 51:215-225.
- Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJ, Meyer EF Jr, Brice MD, Rodgers JR, Kennard O, Shimanouchi T y Tasumi M (1977) The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol* 112(3):535-542.
- Beylot M (2005) Effects of inuline-type fructans on lipid metabolism in man and in animal models. *Br J Nutr* 93(1):S163-S168.
- Bezzate S, Steinmetz M y Aymerich S (1994) Cloning, sequencing, and disruption of a levansucrase gene of *Bacillus polymyxa* CF43. *J Bacteriol* 176(8):2177-2183.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bulkholder WH (1950) Sour skin, a bacterial rot onion bulbs. *Phytopathology* 40(1):115-117.

- Talbi C, Delgado MJ, Girad L, Ramírez,-Trujillo A, Caballero-Mellano J y Bedmar BJ (2012) *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in moroccan soils. *Appl Environ Microbiol* 78(6):1692-1700.
- Cescutti P, Impallomeni G, Garozzo D, Sturiale L, Heresimenka Y, Lagatolla C y Rizzo R (2003) Exopolysaccharides produced by a clinical strain of *Burkholderia cepacea* isolated from a cystic fibrosis patient. *Carbohydr Res* 338(23):2687-2695.
- Chambert R, Gonzy-Treboul G (1976) Levansucrase of *Bacillus subtilis*: kinetic and thermodynamic aspects of transfructosylation processes. *Eur J Biochem* 62(1):55-64.
- Chambert R, Treboul G y Dedonder R (1974) Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* 41:285-300.
- Cote GL (1988) Production of a constitutive, extracellular levansucrase from *Erwinia herbicola* NRRL B-1678. *Biotechnol Lett* 10(12):879-882.
- Cote GL y Ahlgren JA (1993) Metabolism in microorganisms, Part I. Levan and levansucrase. In M Suzuki, N J Chartetton, eds, *Science and Technology of Fructans*, CRC Press, Boca Raton, FL pp 141-68.
- Davies GJ, SWilson K y Henrissat B (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hidrolases. *Biochem J* 321(2):557-559.
- Dedonder R (1966) Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol* 8:500-506.
- Del Moral S, Olvera C, Rodríguez ME y López-Munguía A (2008) Functional role of the additional domains in inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28. *BMC Biochemistry* 9:6.
- DeLano WL (2007) The PyMOL Molecular Graphics System; DeLano Scientific LLC: Palo Alto, CA. <http://www.pymol.org>.
- Deppmeir BJ, Driessen AJ, Hehre TS, Johnson JA, Klunzinger PE, Leonard JM, Pham IN, Prieto WJ y Yu J (2002) Spartan'02, version 115a. Wavefunction, Inc: Irvine, CA.
- Elishashvili VI (1980) Purification and properties of levansucrase of *Gluconobacter oxydans* L-1. *Biokhimiya* 45(1): 20-27.
- Esawy MA, Ahmed EF, Helmy WA, Mansour NM, El-Senousy WM, El-Safty MM (2011) Production of levansucrase from novel Honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans *Carbohydr Polymers*. 86(2):823-830.
- Estrada-de Los Santos P, Bustillos-Cristales R, y Caballero-Mellado J (2001) *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol* 67(6):2790-2798.
- Euzenat O, Guibert A y Combes D (1997) Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochem* 32(3):237-243.
- Fooks LJ y Gibson GR (2002) In vitro investigations of the effect of prebiotics and probiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol Ecol* 39(1):67-75.

- Geier G y Geider K (1993) Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Path* 42(6):387-404.
- Gross M, Geier G, Rudolph K y Geider K (1992) Levan and levansucrase synthesized by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiol Mol Plant Path* 40(6):371-381.
- Han YW (1989) Levan production by *Bacillus polymyxa*. *J Ind Microbiol* 4:447-452.
- Han YW (1990) Microbial levan. *Adv Appl Microbiol* 35:171-194.
- Hendry JAF (1993) Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol* 123:3-14.
- Hernández L, Arrieta J, Menéndez C, Vázquez R, Coego A, Suárez V, Selman G, Petit-Glatron MF y Chambert R (1995) Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem J* 309(1):13-18.
- Hettwer U, Gross M y Rudolph K (1995) Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. *J Bacteriol* 177: 2834-9.
- Hettwer U, Jaeckel FR, Boch J, Meyer M, Rudolph K y Ullrich MS (1998) Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. syringae* pv. *phaseolicola*. *Appl Environ Microbiol* 64(9):3180-3187.
- Heyer AG y Wendenburg R (2001) Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowi*. *Appl Environ Microbiol* 67(1):363-370.
- Hsin K, Morgan H P, Shave SR, Hinton AC y Walkinshaw MD (2010) EDULISS: a small-molecule database with data-mining and pharmacophore searching capabilities *Nucleic Acids Res* doi: 10.1093/nar/gkq878.
- Holmes A, Govan J y Goldstein R (1998) Agricultural use of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacea*: a treat to human health? *Emerg Infect Dis* 4(2):221-227.
- Irwin JJ y Shoichet BK (2005) ZINC – A free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model* 45(1):177-82.
- Jaques NA (1984) Calcium dependence of the cell-associated fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*. *Carbohydr Res* 127(2):349-355.
- Jang KH, Song KB, Park BS, Kim CH, Chung BH, Choue RW, Lee KS, Lee C, Chun UH y Rhee SK (2001) Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite. *Process Biochem* 37(4):339-343.
- Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, Hipskind RA, Nordheim A y Stunnenberg HG (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(20):8972-8976.

- Kassapis S, Morris ER, Gross M y Rudolph K (1994) Solution properties of levan polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*, and its possible primary role as a blocker of recognition during pathogenesis. *Carbohydr Polymers* 23(1):55-64.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS y Thornton JM (1993) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystal* 26(2):283-291.
- Leigh JA y Coplin DL (1992) Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annl Rev Microbiol* 46:307-346.
- Li Y, Triccas JA y Ferenci T (1997) A novel levansucrase-levanase gene cluster in *Bacillus stearothermophilus* ATCC12980. *Biochim Biophys Acta* 1353(3):203-208.
- Lyness EW y Doelle H W (1983) Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology letters*. 5(5):345-350.
- López MG, Mancilla-Margalli NA y Mendoza-Díaz G (2003) Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. Azul. *J Agric Food Chem* 51(27):7835-7840.
- Mancilla-Margalli NA y Lopez MG (2006) Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasylirion species. *J AgricFood Chem* 54(20):7832-7839.
- Mäntsälä P y Puntala M (1982) Comparison of levansucrase from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*. 13(4):395-399.
- Martínez-Fleites C, Ortíz-Lombardia M, Pons T, Tarbouriech N, Taylor EJ, Arrieta JG, Hernández L y Davies G (2005) Crystal structure of levansucrase from Gram-negative bacterium *Gluconoacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J* 390(1):19-27.
- Martínez-Romero E y Caballero-Mellado J (1996) Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit Rev Plant Sci* 15(2):113-140.
- Meng G y Fütterer K (2003) Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struc Biol* 10(11):935-941.
- Miller GL (1959) Dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31(3):426-428.
- Milward CP y Jacques NA (1990) Secretion of fructosyltransferase by *Streptococcus salivarius* involves the sucrose-dependent release of the cell-bound form. *J Gen Microbiol* 136(1):165-169
- Minerdi L, Fani R, Gallo R y Bonafante P (2001) Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Appl Environ Microbiol* 67(2):725-732.
- Morales-Arrieta S, Rodríguez ME, Segovia L, López-Munguía A y Olvera-Carranza C (2006) Identification and functional characterization of *levS*, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene* 376(1):59-67.

- Niness KR (1999) Inulin and Oligofructose: What Are They? *J Nutr* 129(7):1402S-1406S.
- Ozimek LK, van Hijum SAFT, van Koningsveld GA, van der Maarel MJEC, van Geel-Schutten GH y Dijkhuizen L (2004) Site-directed mutagenesis study of the three catalytic residues of the fructosyltransferases of *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase. *FEBS Lett* 560:131-133.
- Ozimek LK, Euverink GJ, van der Maarel MJEC y Dijkhuizen L (2005) Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Lett* 579(5):1124-1128.
- Pabst MJ (1977) Levan and levansucrase of *Actinomyces viscosus*. *Infect Immun* 15(2):518-526.
- Pérez-Oseguera MA, Guereca A y López-Munguía A (1996) Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 45(4):465-471.
- Rehm J, Willmitzer L y Heyer AG (1998) Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J Bacteriol* 180(5):1305-1310.
- Ritsemá T y Smeeckens S (2003) Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr Opin Plant Biol* 6(3):223-230.
- Roberfroid M (2007) Prebiotics: The concept revisited. *J Nutr* 137(3):830S-837S.
- Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J y Zoon P (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 12(2-3):163-171.
- Sanner MF (1999) Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *J Mol Graph Model* 17(1):57-61.
- Sato S, Koga T y Inoue M (1984) Isolation and some properties of extracellular D-glucosyltransferases and D-fructosyltransferases from *Streptococcus mutans* serotypes c, e, and f. *Carbohydr Res* 134(2):293-304.
- Seible J, Moraru R, Götze S, Buchholz K, Na'arnieh S, Pawlowski A y Hecht HJ (2006) Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydr Res* 341(14): 2335-2349.
- Sinnott ML (1987) Glycosyl group transfer. *In* MI Page y A, Williams Ed., *Enzyme mechanisms*. Royal Society of Chemistry, London pp 259-297.
- Song KB, Joo HK y Rhee SK (1993) Nucleotide sequence of levansucrase gene (levU) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988). *Biochem Biophys Acta* 173(3):320-324.
- Song KB, Seo JW, Kim MG y Rhee SK (1998) Levansucrase of *Rahnella aquatilis* ATCC33071. Gene cloning, expression, and levan formation. *Ann N Y Acad Sci* 864(13):506-311.
- Song DD y Jacques NA (1999) Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem J* 341(2): 285-291.

- Sousa SA, Ulrich M, Bragonzi A, Burke M, Worlitzsch D, Leitao JH, Meisner C, Eberl L, Sá-Correia I. y Doöring G (2007) Virulence of *Burkholderia cepacia* complex strains in gp91phox ^{-/-} mice. *Cell Microbiol* 9(12):2817–2825.
- Tajima K, Tanio T, Kobayashi Y, Kohno H, Fujiwara M, Shiba T, Erata T, Munekata M y Takai M (2000) Cloning and sequencing of the levansucrase gene from *Acetobacter xylinum* NCI 1005. *DNA Res* 7:237-242.
- Takahama A, Kuze J, Okano S, Akiyama K, Nakane T, Takahashi H y Kobayashi T (1991) Production of lactosucrose by *Bacillus natto* levansucrase and some properties of the enzyme. *J Jpn Soc Food Sci Technol* 38: 789-96.
- Talbi C, Delgado MJ, Girard L, Ramírez-Trujillo A, Caballero-Mellano J y Bedmar EJ (2010) *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. *Appl Environ Microbiol* 76(13):4587-4591.
- Tanaka T, Oi S, y Yamamoto T (1980) The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase. *J Biochem* 87(1):297-303.
- Tang LB, Lenstra R, Borchert BT y Nagarajan V (1990) Isolation and characterization of levansucrase encoding gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Gene* 96(1):89-93.
- Taylor P, Blackburn E, Sheng YG, Harding S, Hsin K-Y, Kan D, Shave S y Walkinshaw MD (2008) Ligand discovery and virtual screening using the program LIDAEUS. *Br J Pharmacol* 153(S1):S55-S67.
- Tieking M, Ehrmann MA, Vogel RF y Gänzle MG (2005) Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl Microbiol Biotechnol* 66(6):655-663.
- Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE y Berendesen HJ (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26(16):1701-1718.
- van Hijum SAFT, Bonting K, van der Maarel MJEC y Dijkhuizen L (2001) Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiol Lett* 205(2):323-8.
- van Hijum SAFT, van der Maarel MJEC y Dijkhuizen L (2003) Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. *FEMS Lett* 534(1-3):207-210.
- van Hijum SAFT, Kralj S, Ozimekn LK, Dijkhuizen L y van Geel-Schutten IGH (2006) Structure-function relationship of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(1):157-176.
- Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, Revest H, Lauwers S, Gillis M, Kersters K y Govan JRW (1997) Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47(4):1188-1200.

- Vandamme P, Goris J, Chen W-M, de Vos P y Willems A (2002) *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. *Sist Appl Microbiol* 25(4):507-512.
- Velázquez-Hernández ML, Baizabal-Aguirre V, Bravo-Patiño A, Cajero-Júarez M, Chávez-Moctezuma MP Y Valdez-Alarcón J (2009) Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *J Appl Microbiol* 106(6):1763-1778.
- Vijin I y Smeekens S (1999) Fructan: More than a reserve Carbohydrate? *Plant Physiol* 120(2):351-359.
- Yuan S, Le RK, Venken T, Lammens W, Van der Ende W y van den Maeyer M. (2012) pKa Modulation of the Acid/Base Catalyst within GH32 and GH68: A Role in Substrate/Inhibitor Specificity? *Plosone*. 7(5):1-12.
- Zhang H., Hanada S., Shigematsu T., Shibuya K., Kamagata Y., Kanagawa T. y Tiedje J. M. 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. nov. a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *Int J Syst Evol Microbiol* 50(2):743-749.

11. APÉNDICES

Apéndice 1

```

1  mnvghhprvp ritprlrahf lsaavlsava lpalaqtatp gfpaptphsq qaydpessft
61 mrwtradirq ikaqshaata adknsplsl tmpdipqdfp linpnvwwd twpladmran
121 qlaykgwevi fsltadphag ytfddrhvha rigffyrzag ipasqrpang gwtwgghlfp
181 dgasvkvfgt spmtdnaews gsarlthgdn vslyytatsf nrsapggadi tppqaiitra
241 dghihaddsh vwfsgfddhq allkpdgtyy qtgeqntyfs yrdpfvfidp ahpgktymvf
301 egntggprga rtcteadlgy apndpqedl navmnsaay qkanvglava tnpqltewkf
361 lppilsancv ddqterpqi y lkdgkyylyft ishrttmaag vdgpdgvvygf vnggirsdf
421 plnggsgl vl gnptdfsapa gapyaqdpnq nprefqsysh yvmpggives fidaigsrrg
481 gtlaptvkin ingdttvdr tygkglgy gdipanqsap gngngggns q

```

Figura A1. Secuencia proteica de la FTF anotada en el genoma del microorganismo *Burkholderia phymatum* STM815

Apéndice 2

Medio Luria Bertani (LB). Triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L y cloruro de sodio 10 g/L a pH 7.5.

Medio SOC. Triptona 20 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, 8.5 mM de cloruro de sodio, 2.5 mM de cloruro de potasio, 10 mM de cloruro de magnesio y 10 mM de sulfato de magnesio.

Amortiguador TAE 1X. 40 mM de Tris base, 20 mM de ácido acético y 1 mM de EDTA a pH 8.

Amortiguador de carga para ADN 10X. 1M de EDTA (pH 8), Ficoll 400 20%, dodecilsulfato sódico (SDS) 1.0%, azul de bromofenol 0.25% y Xineol cianol 0.25%.

Amortiguador de carga para proteínas. 0.125 M de tris-Cl pH 6.8, SDS 4%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.25%.

Gel SDS-PAGE concentrador. Acrilamida 4.86%, Bis-acrilamida 0.13%, 0.125 M de tris básico (pH 6.8), SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1% y N,N,N',N'-tetrametildiamina (TEMED) 0.001% v/v.

Gel SDS-PAGE separador. Acrilamida 9.73%, Bis-acrilamida 0.26%, 0.375 M de tris básico (pH 8.8), SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1% y N,N,N',N'-tetrametildiamina (TEMED) 0.004% v/v.

Amortiguador PBS 10X. 1.37 mM de cloruro de sodio, 27 mM de cloruro de potasio, 100 mM de hidrogen fosfato de sodio y 18 mM de dihidrogen fosfato de potasio.

Reactivo DNS. 1 M de tartrato de sodio y potasio, 0.4 M de hidroxido de sodio y 43 Mm de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Apéndice 3

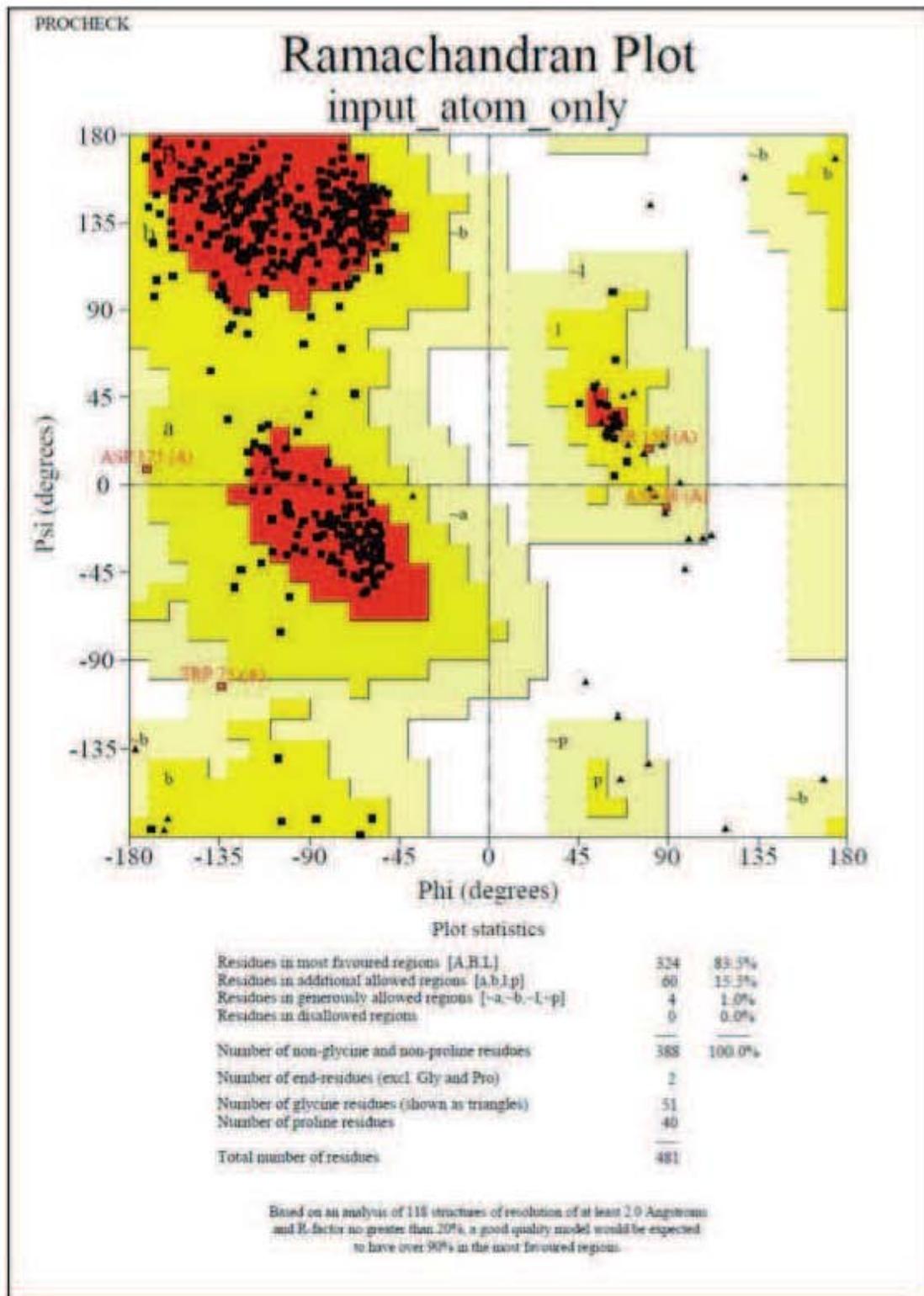


Figura A2. Diagrama de Ramachandran del modelo KesL-S

Apéndice 4

Tabla A1. Nombre IUPAC de los probables inhibidores obtenidos de la base de datos EDULISS

Compuesto	Nombre IUPAC
8SPH1-144-931	(2R,3S,4R,5R,6S)-5-amino-6-[(2R,3S,4R,5R,6S)-5-amino-6-[(2R,3S,4R,5R)-5-amino-4,6-dihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]oxi-4hidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-yl]oxi-2-(hidroximetil)oxano-3,4-diol
8SPH1-152-434	(2S,3R,4R,5S,6S)-2-(aminometil)-6-[(1R,2R,3S,4R,6S)-4,6-diamino-3-[(2R,3S,4R,5R,6S)-4-amino-3,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-yl]oxi-2-hidroxiciclohexil]oxioxano-3,4,5-triol
31DRH1-853-297	<i>N</i> -[(2-cloro-5-nitro-fenil)metil]- <i>N</i> -metil-4-(4-metilpiperazinil)sulfonil-2-nitro-anilina
35SPH1-104-225	Clorhidrato de (5S,5aS)-5-[4-(dimetilamino)anilin]-9-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-5a,6,8a,9-tetrahidro-5 <i>H</i> -[2]benzofuro[5,6- <i>f</i>][1,3]benzodioxol-8-ona
39SPH1-015-991	7,8-dimetil-10-[(2R,3R,4S)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil]-4a,5-dihidrobenzo[<i>g</i>]pteridin-2,4-diona
25SPH1-188-314	beta-D-glucosaminil-(1->4)-D-glucosamina
8SPH1-140-994	(2R,3S,4S,5R,6R)-2-(aminometil)-6-[(1R,2R,3S,4R,6S)-4,6-diamino-3-[(2R,3S,4R,5R,6S)-4-amino-3,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi-2-hidroxiciclohexil]oxioxano-3,4,5-triol
28SPH1-249-427	metil-bis(metilamino)BLAHpentol
35SPH1-093-633	(5S,8aR)-5-(3-acetilanelin)-9-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-5a,6,8a,9-tetrahydro-5 <i>H</i> -[2]benzofuro[5,6- <i>f</i>][1,3]benzodioxol-8-ona
26SPH1-695-498	(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)tetrahidrofuran-2-il-2-(2-hidroxi-benzoil)diazonio
28SPH1-518-124	5-(4-metoxifenil)-4-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-ilcarbonil)-3-hidroxi-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1,5-dihidro-2 <i>H</i> -pirrol-2-ona
28SPH1-249-355	Clorhidrato de (2S,4R)- <i>N</i> -((1R,2R)-2-hidroxi-1-((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(metiltio)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)propil)-1-metil-4-propilpirrolidina-2-carboxamida
42SPH1-001-864	4-hidroxi-5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-[(2S,3R,4S,5R)-3,4,5-trihidroxitetrahidropiran-2-il
26SPH1-286-328	1-[2-(hidroximetil)-5-fenil-2,3-dihidro-1,3,4-tiadiazol-2-il]butano-1,2,3,4-tetrol
26SPH1-676-594	Hidrato de 7-[(2S,4S,5S,3R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)(2 <i>H</i> -3,4,5,6-tetrahidropiran-2-iloxi)]-5,6-dihidroxi-2-fenilcromen-4-ona
25SPH1-192-775	Ácido fenolftalein-beta-D-glucurónico

Continuación tabla A1

Compuesto	Nombre IUPAC
28SPH1-563-794	4-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-ilcarbonil)-3-hidroxi-5-(5-metil-2-furil)-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1,5-dihidro-2 <i>H</i> -pirrol-2-ona
35SPH1-029-097	6-amino-3-[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]-1,4-dihidro-1,3,5-triazin-2-ona
25SPH1-108-455	Octahidro-12-(hidrometil)-2-imino-5,9:7,10a-dimetano-10a <i>H</i> -[1,3]dioxocino[6,5- <i>d</i>]pirimidino-4,7,10,11,12-pentol

Tabla A2. Nombre IUPAC de los probables inhibidores obtenidos de la base de datos de PubChem

Compuesto	Nombre IUPAC
439341	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6-[(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-4,5,6-trihidroxi-2-(hidroximetil)oxan-3-il]oxioxano-3,4,5-triol
13005892	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(1,2-dihidroxi)etil-5-(hidroximetil)pirrolidina-3,4-diol
44265828	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-6-amino-4-(hidroximetil)ciclohex-4-ano-1,2,3-triol
53325720	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2-(hidroximetil)-1-(5-octoxipentil)piperidin-3,4,5-triol
13375420	(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2-aminociclohexano-1,3-diol
5281605	5,6,7-trihidroxi-2-fenilcromen-4-ona
53317742	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-5-octilpirrolidin-3,4-diol
124702	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,5- <i>bis</i> (hidroximetil)pirrolidin-3,4-diol
6475030	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-2,6- <i>bis</i> (hidroximetil)piperidin-3,4,5-triol
44350032	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-4-[3-hidroxi-5-[(<i>E</i>)-2-(4-metoxifenil)etenil]fenoxi]-6-(hidroximetil)ciclohexano-1,2,3-triol

Apéndice 5

En la tabla A3 se reportan las claves de las moléculas y del bioensayo (subrayadas), en el cual, se determinó la inactividad de las moléculas evaluadas contra la sacarasa de intestino de rata. [<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>]

Tabla A3. Claves de bioensayos y moléculas de PubChem

Bioensayo	CID
	53248870
593349	53248841
	<u>54580232</u>
	<u>11710941</u>
550397	<u>53321828</u>
	<u>53317742</u>
338548	<u>446222</u>
	10419725
	53325720
553255	<u>53324417</u>
	25010186
307313	<u>44437669</u>
	<u>44437667</u>
620761	<u>439341</u>
104666	<u>446685</u>
	<u>44265828</u>
	<u>52938731</u>
578320	53318569
	53317283
	<u>25110936</u>
400759	<u>13005892</u>
	<u>445074</u>
324680	<u>11073391</u>
	10419725
	<u>124702</u>

Continuación **Tabla A3**

Bioensayo	CID
324679	11423684
240843	72258
	<u>432827</u>
320784	13375420
	<u>1057</u>
	<u>5281605</u>
	<u>451990</u>
208985	<u>464728</u>
	464727
	<u>24867638</u>
	<u>5375252</u>
37282	44350032
	<u>3220</u>
550393	53317742
338567	11106555
338560	10057640
338558	<u>12085983</u>
91639	<u>124702</u>
Ar	<u>103277564</u>
338569	<u>441314</u>
338545	<u>12085983</u>
37291	<u>6475030</u>