



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA ENZIMA DEL TIPO  
GLUCOSILTRANSFERASA DEL GÉNERO *Weissella sp.* PROVENIENTE DEL POZOL

# TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

I.B. ANDRÉS ESPÍRITU GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL

DR. AGUSTÍN LÓPEZ-MUNGUÍA CANALES  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. CLAUDIA RODRÍGUEZ ALMAZAN  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

DRA. CLAUDIA MARTÍNEZ ANAYA  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de Cuernavaca, Morelos. mayo, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Enzimas del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

"Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante la beca de maestría con número 957172 y se desarrolló en el marco del proyecto de Ciencia Básica CONACYT AS-S-21209, sobre funcionalidad de glicosiltransferasas.

## **Dedicatoria**

Por darme la vida, amor y, sobre todo enseñanzas de vida. Los quiero papás.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Agustín López, por permitirme formar parte del maravilloso grupo ALM, el apoyo y muy, muy especialmente por sus enseñanzas.

A los miembros del comité tutor, Dra. Claudia Martínez y Dra. Claudia Rodríguez por sus comentarios, sugerencias y discusiones durante los tutorales de avances.

A Fernando Gonzáles Muñoz y a la M.C. María Elena Rodríguez Alegría, por su soporte técnico en el uso de equipos y asesoramiento durante esta investigación.

Al Dr. Alfonso Miranda por su ayuda en la resolución de estructuras por RMN y a la Biol. Erika Patricia Meneses por su apoyo en el análisis de proteómica.

A las laboratoristas Aurelia Ocampo y Judith Uribe, gracias a su trabajo y soporte al correcto funcionamiento del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio (Beto, Sol, Raziél, Cris, Alejandra, Jaime, Silvia, Raúl) por los consejos y excelente amistad.

A Karla Pantoja, por estar siempre ahí apoyándome en todo momento. No cabrían las palabras para describir lo agradecido que estoy por tenerte como compañera de vida.

## ÍNDICE

1.	Introducción .....	- 10 -
2.	Antecedentes.....	- 12 -
2.1	Las Glucansacararas .....	- 12 -
2.1.1	Distribución de las glucansacararas .....	- 13 -
2.1.2	Estructura de las GS.....	- 14 -
2.1.3	Mecanismo de reacción.....	- 20 -
2.1.4	Productos: polisacáridos y gluco-oligosacáridos .....	- 21 -
2.2	Papel de la dextrana y GOS en la industria .....	- 23 -
2.2.1	Dextrana en alimentos fermentados.....	- 25 -
3.	Hipótesis .....	- 28 -
4.	Objetivos.....	- 28 -
4.1	Objetivo general:.....	- 28 -
4.2	Objetivos particulares: .....	- 28 -
5.	Metodología .....	- 29 -
6.	Resultados y discusiones .....	- 35 -
6.1	Expresión heteróloga en <i>E. coli</i> de la enzima Dsr_Wcp-3a .....	- 35 -
6.2	Cinética de formación de polímero.....	- 41 -
6.3	Producción del polisacárido .....	- 43 -
6.4	Producción de gluco-oligosacáridos.....	- 45 -
6.5	Caracterización del polisacárido .....	- 48 -
6.6	Especificidad de producto .....	- 57 -
6.7	Comparación <i>in silico</i> de la estructura de la enzima.....	- 60 -
6.7.1	Delimitación de la estructura primaria.....	- 60 -
6.7.2	Selección de la plantilla .....	- 63 -
6.7.3	Modelamiento 3D y validación.....	- 64 -
7.	Conclusiones.....	- 69 -
8.	Perspectivas.....	- 70 -
9.	Anexos .....	- 71 -
9.1	Anexo A: Multialineamiento de secuencias .....	- 71 -
9.2	Anexo B: Técnicas 2D RMN .....	- 77 -
10.	Bibliografía .....	- 82 -

## CONTENIDO DE FIGURAS

- Figura 1.** Los tres tipos de reacción llevadas a cabo por las dextransacararas (una GS con especificidad de enlace  $\alpha$ -(1-6))..... - 12 -
- Figura 2.** Estructura general de la glucansacarasa de *Lactobacillus reuteri* 180 GTF180- $\Delta$ N..... - 14 -
- Figura 3.** a) Vista de la organización de los dominios de la estructura cristalina de *Leuconostoc citreum* DSR-M (PDB ID: 5NGY), zoom en los dominios A y B (mismos colores que la Figura 2) y representación de la estructura secundaria de los “Loops” conservados en las GS. b) Representación esquemática de los elementos estructurales del sitio catalítico (domino A) barril TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> permutado..... - 17 -
- Figura 4.** Representación de la estructura primaria de diferentes GS con estructura cristalográfica..... - 18 -
- Figura 5.** Mecanismo de reacción general de las GS..... - 20 -
- Figura 6.** Estructuras básicas de glucanas sintetizadas por GS (adaptada de Leemhuis *et al.*, 2013)..... - 23 -
- Figura 7.** Análisis del proceso de purificación parcial de la enzima Dsr\_Wcp-3a mediante SDS-PAGE..... - 36 -
- Figura 8.** Estudio del nivel de expresión del gen y síntesis la enzima Dsr\_Wcp-3a en función del tiempo de inducción analizado mediante SDS page (a) y estudio de la estabilidad de la enzima Dsr\_Wcp-3a en el extracto enzimático en función del tiempo de incubación a 28 °C mediante un zimograma (b).. - 37 -
- Figura 9.** SDS-page y Zimograma de actividad de las formas en que se produce Dsr\_Wcp-3a empleadas en el proyecto..... - 40 -
- Figura 10.** Análisis comparativo de los fragmentos 1, 2, 3 conteniendo información derivada de la secuenciación de péptidos de las tres fracciones por LC-MS/MS..... - 41 -
- Figura 11.** Evolución de una reacción de síntesis de dextrana empleando 2 U/mL de Dsr\_Wcp-3a, a 30 °C, pH 6, buffer de acetatos 50 mM y una concentración de 100 g/L de sacarosa. .... - 42 -
- Figura 12.** Evolución de la síntesis de gluco-oligosacáridos de la reacción catalizada por Dsr\_Wcp-3a, a 30°C, pH 6 en buffer de acetatos 50 mM y 100 g/L de sacarosa, mostrada en cromatogramas de HPAEC-PAD..... - 43 -
- Figura 13.** Evolución de la síntesis de dextrana durante la reacción medida mediante HPLC-GPC. (Panel superior) polímero a los tiempos de reacción 0, 30, 60 y 180 min; dextrana purificada (Panel inferior) ..... - 44 -
- Figura 14.** Detección de los gluco-oligosacáridos por Cromatografía de capa fina (TLC) sintetizados en las reacciones con aceptor maltosa y una mezcla de isomaltosa e isomaltotriosa..... - 45 -

<b>Figura 15.</b> Detección de la formación de IMOS y MOS por HPAEC-PAD de las reacciones con aceptor. Panel superior) reacción con el aceptor de una mezcla de isomaltosa e isomaltotriosa (ISO); Panel inferior) reacción con el aceptor maltosa (MAL)..	- 47 -
<b>Figura 16.</b> Detección de la formación de IMOS y FIMOS por HPAEC-PAD de la reacción con aceptor glucosa.....	- 48 -
<b>Figura 17.</b> Reacción de hidrólisis del control de Dextrana de 5,000 Da con dextranasa. ....	- 50 -
<b>Figura 18.</b> Reacción de hidrólisis del polímero (sintetizado por Dsr_Wcp-3a) con dextranasa. ....	- 51 -
<b>Figura 19.</b> Reacción de hidrólisis de los IMOS (producidos en la reacción del aceptor) con dextranasa... ..	- 52 -
<b>Figura 20.</b> Detección de la degradación de la sacarosa inicial por HPAEC-PAD. ....	- 54 -
<b>Figura 21.</b> a) Espectros de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de la dextrana sintetizada por la enzima Dsr_Wcp-3a. b) Espectros de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de la dextrana comercial de <i>L. mesenteroides</i> B512-F. ....	- 55 -
<b>Figura 22.</b> Síntesis de IMOS observada por HPAEC-PAD, obtenida de las tres formas purificadas de la enzima aislada de las bandas de electroforesis. ....	- 58 -
<b>Figura 23.</b> Multialineamiento de secuencias altamente conservadas de las enzimas GH70 con estructura cristalizada y representación de la estructura primaria de la enzima Dsr_Wcp-3a, mostrando los motivos conservados (representados en secuencia LOGO). ....	- 61 -
<b>Figura 24.</b> Multialineamiento de secuencias de los “pockets” de unión a glucana identificadas en las GS DSR-M, ASR y GBD-CD2 y con los supuestos “pockets” identificados en la enzima Dsr_Wcp-3a.-	63 -
<b>Figura 25.</b> Representación animada de la enzima DsrT_Wcp-3a modelada de la secuencia 223 a 1313 aa.....	- 65 -
<b>Figura 26.</b> Panel superior. Dominios A, B y C de la proteína modelada DsrT_Wcp-3a donde se muestra la ubicación de unión a calcio (esfera cyan). Panel inferior. Representación bidimensional de los residuos que interactúan con el calcio en la estructura de la enzima modelada DsrT_Wcp-3a (enlaces generados por LIGPLOT).....	- 67 -



## CONTENIDO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Origen e importancia de las GS caracterizadas bioquímicamente de acuerdo a la base de datos CAZy ( <a href="http://www.cazy.org">http://www.cazy.org</a> ). .....	- 13 -
<b>Tabla 2.</b> Estructuras cristalográficas de las GS reportadas en la base de datos del PDB (Protein Data Bank: <a href="https://www.rcsb.org">https://www.rcsb.org</a> ). .....	- 15 -
<b>Tabla 3.</b> Estructura y origen de los principales polisacáridos tipo glucana sintetizados por GS. ....	- 22 -
<b>Tabla 4.</b> Cepas del género <i>Weissella</i> aisladas de alimentos (en su mayoría fermentados). .....	- 26 -
<b>Tabla 5.</b> Actividad enzimática obtenida en el proceso de producción y purificación parcial de la enzima Dsr_Wcp-3a expresada en <i>E. coli</i> BL21 DE3. ....	- 36 -
<b>Tabla 6.</b> Actividad enzimática obtenida del proceso de producción de la enzima Dsr_Wcp-3a expresada en <i>E.coli</i> BL21 DE3 star <sup>TM</sup> a diferentes tiempos de inducción. ....	- 38 -
<b>Tabla 7.</b> Actividad enzimática obtenida del proceso de incubación a 28 °C de la enzima Dsr_Wcp-3a expresada en <i>E.coli</i> BL21 DE3 star <sup>TM</sup> . ....	- 38 -
<b>Tabla 8.</b> Revisión de la integridad estructural de las enzimas GS expresadas heterológamente reportadas en la base de datos CAZY. ....	- 39 -
<b>Tabla 9.</b> Rendimiento de los productos de síntesis de Dsr_Wcp-3a en presencia de 100 g/L de sacarosa. ....	- 45 -
<b>Tabla 10.</b> Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de <sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C de las dextranas de Dsr_Wcp-3a y B-512F. ....	- 53 -
<b>Tabla 11.</b> Templados obtenidos del BLASTp con la mayor similitud de secuencia para el modelado de la enzima Dsr_Wcp-3a. ....	- 64 -

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**GS:** Glucansacarasa.

**LAB:** Bacterias ácido lácticas.

**PS:** Péptido señal.

**RV:** Región variable.

**CD:** Dominio catalítico conservado.

**GBD:** Dominio de unión a glucana.

**PDB:** *Protein Data Bank*.

**aa:** Aminoácidos.

**GOS:** Gluco-oligosacáridos.

**DP:** Grado de polimerización.

**GRAS:** Generalmente reconocido como seguro.

**EPS:** Exopolisacáridos.

**ALAB:** Bacterias ácidas lácticas amilolíticas.

**NALAB:** Bacterias ácidas lácticas no amilolíticas.

**LB:** Medio de cultivo Luria-Bernati

**TB:** Medio de cultivo Terrific-Broth

**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiagalactopiranosido.

**BSA:** Seroalbúmina bovina.

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

**DNS:** Ácido 3,5-dinitrosalicílico.

**U:** Unidad de actividad dextransacarasa.

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficiencia.

**GPC:** Cromatografía de permeación en gel.

**RMN:** Resonancia magnética nuclear.

**ppm:** Partes por millón.

**HPAEC-PAD:** Cromatografía de intercambio aniónico con detector de pulso amperométrico.

**LC-MS/MS:** Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.

**TLC:** Cromatografía de capa fina.

**IMOS:** Isomalto-oligosacáridos.

**MOS:** Malto-oligosacáridos.

**ISO:** Una mezcla de isomaltosa e isomaltoriosa.

**MAL:** Maltosa

**FIMOS:** Ismolato-oligosacáridos con grupo fructosilo en un extremo.

**I2:** Isomaltosa.

**I3:** Isomaltotriosa.

**M2:** Maltosa.

**M3:** Panosa.

**DOPE:** Puntuación de energía proteica optimizada discreta.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas que intervienen en los procesos biológicos catalizando las reacciones del metabolismo celular. Su aplicación tiene grandes ventajas sobre los catalizadores químicos al presentar mayor especificidad, un control eficiente sobre la calidad y rendimientos, con un mínimo de subproductos no deseados. La biocatálisis es la rama de la enzimología que cubre los aspectos aplicados de las enzimas. En la industria las enzimas se emplean puras, libres o inmovilizadas, en extractos, o bien, como parte de células completas (enzimas intracelulares), siendo la biocatálisis el tema central de interés del grupo de investigación del Dr. Agustín López-Munguía del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en el que se ubica este proyecto. En particular, el grupo se ocupa de desarrollar proyectos alrededor de la producción y caracterización de enzimas de diversos orígenes, resolviendo los problemas de disponibilidad, estabilidad y especificidad para hacer viable su aplicación potencial en la industria, a partir de estrategias como la ingeniería de reacción, identificando y caracterizando las mejores condiciones para que la biocatálisis se lleve a cabo. Uno de los temas centrales de investigación del grupo se centra en las enzimas glicosiltransferasas con actividades enzimáticas que permiten la síntesis de polisacáridos de interés, como la inulina, levana, dextranas, así como la producción de fructo-oligosacáridos y gluco-oligosacáridos, estos últimos con un gran interés dentro de la industria farmacéutica y alimentaria por sus características funcionales.

Las glucansacarasas (GS), son enzimas con capacidad para producir glucana a partir de sacarosa. Estas enzimas catalizan la transferencia de un residuo glucosídico desde un sustrato donante a una molécula aceptora formando enlaces glucosídicos. A este grupo pertenecen las glucansacarasas (EC 2.4.1.X) dentro de las cuales destacan las enzimas dextranasa, alternansacarasa, reuteransacarasa y mutansacarasa. La dextrana es el polisacárido más estudiado debido a sus aplicaciones en la industria, por lo que muchos estudios se han centrado en identificar las bacterias ácido lácticas que lo producen y las enzimas involucradas, particularmente por la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, una aplicación desarrollada desde mediados del siglo pasado. Los estudios se han centrado también en la caracterización estructural de los polímeros producidos por diversos géneros y especies de bacterias, su grado de polimerización y en optimizar su producción y condiciones de síntesis. Hasta la fecha se conocen enzimas con actividad GS provenientes de los géneros: *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Weissella* (Bejar *et al.*, 2013; Leemhuis *et al.*, 2013).

El mecanismo de reacción de las glucansacarasas que se describe más adelante, ha sido un tema particular de estudio, dificultado durante muchos años por el desconocimiento de la

estructura tridimensional de la enzima. En efecto, no fue sino hasta el 2010 que se publicó la primera estructura cristalográfica (parcial) de una GS (Zagar *et al.*, 2010).

Dependiendo del origen (estructura) de la GS, los enlaces entre las moléculas de glucosa en el polímero pueden variar, a saber: dextranas  $\alpha$ -(1-6), mutanas  $\alpha$ -(1-3), reuteranas  $\alpha$ -(1-4) y alternanas  $\alpha$ -(1-3)/ $\alpha$ -(1-6), característica que les confiere propiedades diferentes. La mayoría de las GS producen glucanas con un peso molecular por arriba de  $10^6$  Da, destacando el caso de la dextrana producida por la dextransacarasa de *Oenococcus kitaharae* DSM17330 que sintetiza una dextrana de  $10^9$  Da. Esta dextrana presenta propiedades reológicas poco comunes, como una viscosidad más alta que la dextrana usada industrialmente, proveniente de la enzima de *L. mesenteroides* B-512F (Vuillemin *et al.*, 2018).

Las GS se han aislado de bacterias lácticas de diversas fuentes de alimentos fermentados en los que las glucanas y principalmente las dextranas juegan un papel importante en las características del producto. Tal es el caso de la masa de trigo fermentada (sourdough), el pulque, el pozol, el agua de kéfir, el sauerkraut chino, el kimchi coreano o incluso pulpa de pomelo (*citrus maxima*) y caña de azúcar.

De lo antes expuesto, es claro que existe una gran diversidad de estructuras de glucana, dependientes de una también amplia diversidad de enzimas que las sintetizan, enzimas que provienen de diversas fuentes vegetales y alimentos fermentados, en particular. El potencial de estos polisacáridos en la industria sigue siendo muy amplio, tanto por sus propiedades fisicoquímicas como nutrimentales (fibra soluble y capacidad prebiótica).

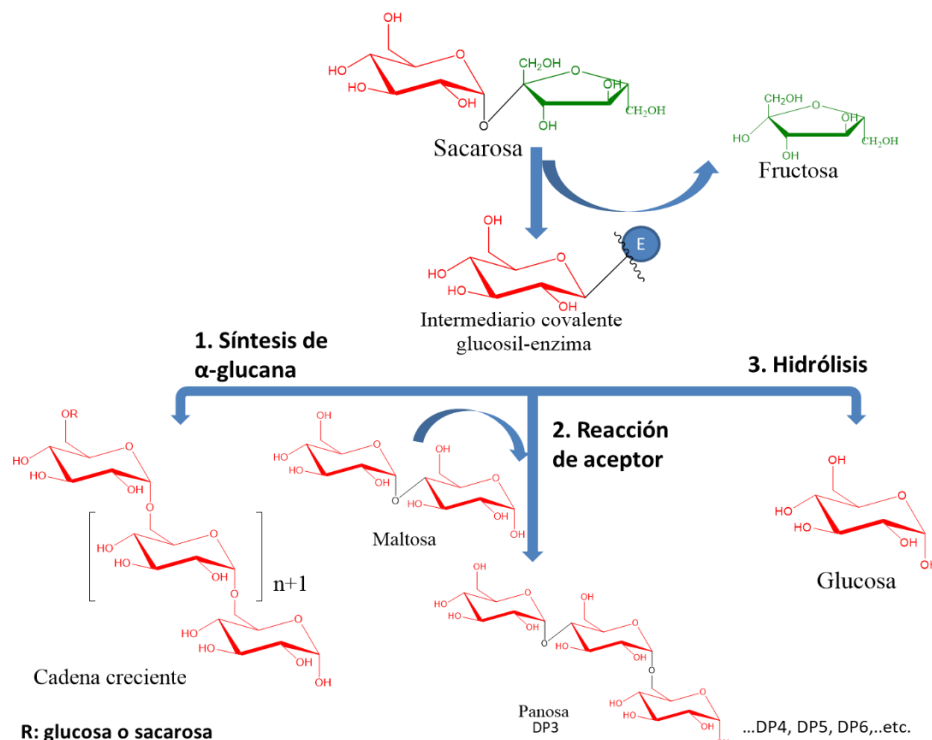
Al revisar los orígenes de las GS caracterizadas hasta la fecha, llama la atención que, para un producto de la importancia de la dextrana, existan escasos trabajos relacionados con la síntesis de polímeros por GS provenientes de cepas del género *Weissella*. Esto en particular dado el hecho de que especies pertenecientes a este género se han identificado en numerosos productos fermentados de consumo tradicional en el mundo, destacando entre ellos el pozol, una bebida fermentada de maíz de origen maya. En lo particular, se desconoce no solo la concentración y el tipo de glucanas presentes en el pozol, sino la función misma que podrían tener en el producto y eventualmente en el impacto que pudieran tener en el metabolismo de quienes lo consumen. Recientemente, el grupo de biocatálisis se integró a un megaproyecto de caracterización del proceso de producción del pozol. Como parte de ese estudio se determinó la capacidad de producción de glucansacarasa por dos cepas aisladas del pozol del género *Weissella*, habiéndose secuenciado su genoma (Hernández *et al.*, 2021). En el presente proyecto, se propone estudiar la actividad glucansacarasa de la cepa *W. confusa* Wcp-3a y sus productos de síntesis con el fin de conocer tanto sus propiedades cinéticas, así como el tipo de productos que elaboran. Eventualmente, es de nuestro interés

también determinar su presencia en la masa fermentada del pozol e impacto en la salud de los consumidores.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Las Glucansacarasas

Las glucansucrasas (GS) son enzimas glucósido-hidrolasas de la familia GH70, de acuerdo con el sistema de clasificación CAZy (<http://www.cazy.org>) que se basa en la similitud de la secuencia de aminoácidos, el plegamiento y su función. Las GS son de origen bacteriano con un peso molecular que va de 130 a 313 kDa que catalizan la conversión de sacarosa en polisacáridos de  $\alpha$ -glucana, uniendo las unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosilo con enlaces  $\alpha$ -(1-2),  $\alpha$ -(1-3),  $\alpha$ -(1-4) y/o  $\alpha$ -(1-6), dependiendo de la especificidad de la enzima (Leemhuis *et al.*, 2012). Como se sabe, catalizan la llamada reacción de aceptor, que les permite glucosilar una amplia gama de moléculas aceptoras, generalmente carbohidratos, pero también agliconas con grupos hidroxilo, además de poder transferir la glucosa al agua, hidrolizando la sacarosa a glucosa y fructosa (Figura 1).



**Figura 1.** Los tres tipos de reacción llevadas a cabo por las dextransacarasas (una GS con especificidad de enlace  $\alpha$ -(1-6)). Nota: La panosa puede ser elongada subsecuentemente dependiendo de las condiciones de reacción.

Las GS utilizan la energía liberada del rompimiento del enlace glucosídico de la sacarosa para catalizar la reacción, por lo que forman una alternativa más económica y energéticamente

viable desde el punto de vista de la biocatálisis, con respecto a las glucosiltransferasas de tipo "Leloir", que requieren azúcares activados por nucleótidos como sustrato donante (André *et al.*, 2010), lo que resulta complejo de realizar fuera del ambiente celular.

En la siguiente sección se analiza la distribución, estructura y mecanismo de reacción de glucansacarosas, las características de los productos de síntesis de polisacáridos y gluco-oligosacáridos y sus propiedades y por último el papel que juegan las dextranas en la funcionalidad de alimentos fermentados de importancia cultural como el pozol.

### 2.1.1 Distribución de las glucansacarosas

Las GS solo se han aislado de bacterias ácido lácticas (LAB) gram-positivas, como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Weissella* (Leemhuis *et al.*, 2013). Como su nombre indica, las LAB producen ácido láctico como el principal producto metabólico del metabolismo de los carbohidratos. Durante siglos, esta propiedad ha sido la característica esencial de toda una gama de alimentos fermentados, como el yogur, el pulque, o las masas de cereales fermentadas. La importancia de las LAB para la industria alimentaria se evidencia aún más por el uso de los polisacáridos y las mismas LAB como compuestos (prebióticos) y microorganismos (probióticos), y que confieren beneficios para la salud intestinal del consumidor, respectivamente (Patel y Goyal 2011; Bivolarski *et al.*, 2018). Muchos de estos exopolisacáridos son producidos por GS, enzimas extracelulares que, dependiendo de la fuente bacteriana, se encuentran unidas a la pared celular y/o son liberadas al medio (Bounaix *et al.*, 2009).

Hasta el año 2020, 66 GS aisladas de una gran diversidad de fuentes han sido caracterizadas bioquímicamente y reportadas en la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org>), la mayoría pertenecientes a los géneros *Leuconostoc* y *Streptococcus* (Tabla 1) y en menor proporción a *Lactobacillus* y *Weissella*. El género *Weissella* se describió más recientemente y antes se le clasificaba frecuentemente como *Streptococcus*.

**Tabla 1.** Origen e importancia de las GS caracterizadas bioquímicamente de acuerdo a la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org>).

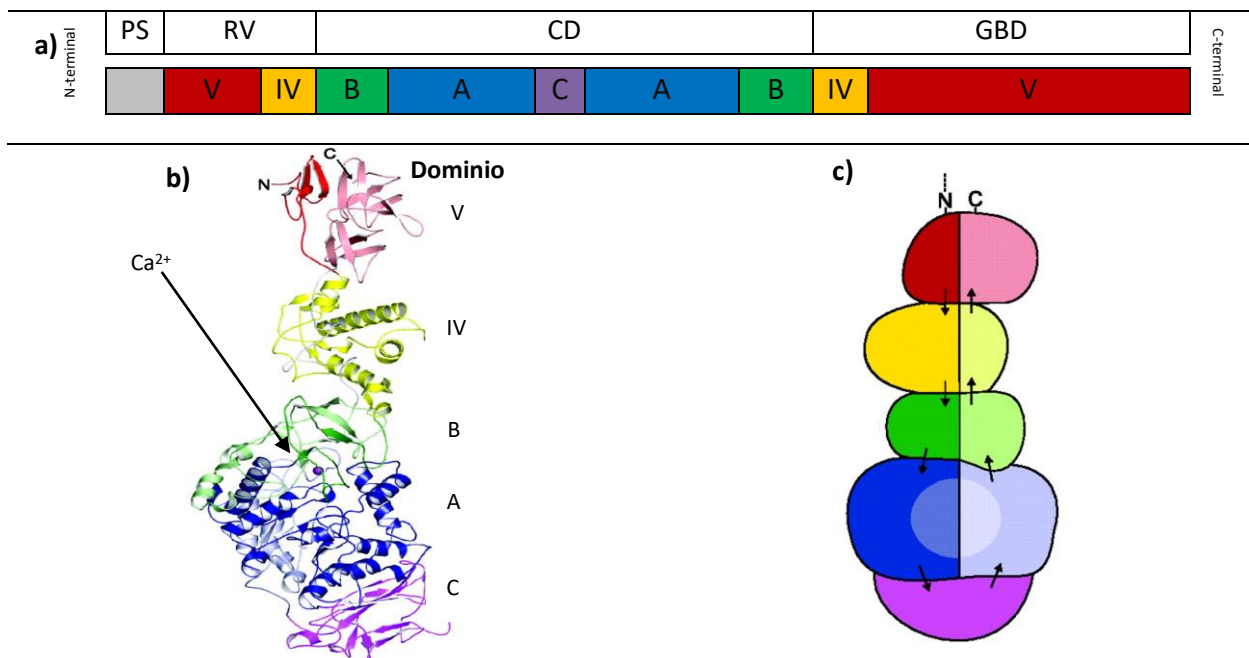
Genero	Cantidad	Porcentaje
Otros	2	3%
<i>Weissella</i>	5	8%
<i>Lactobacillus</i>	14	21%
<i>Streptococcus</i>	21	32%
<i>Leuconostoc</i>	24	36%
<b>Total general</b>	<b>66</b>	<b>100%</b>

Se ha visto que algunas especies dentro de estos géneros y en particular algunas cepas, contienen más de un gen que codifica para glicosiltransferasas. Por ejemplo, las cepas de

*Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 y *Weissella confusa* Wcp-3a estudiadas en nuestro grupo de trabajo producen seis y dos distintas glicosiltransferasas, respectivamente.

### 2.1.2 Estructura de las GS

La estructura primaria de las GS se puede dividir en cuatro regiones: 1) péptido señal (PS), 2) región variable N-terminal (RV), 3) dominio catalítico conservado (CD por sus siglas en inglés “catalytic domain”) y 4) C-terminal dominio de unión a glucana (GBD por sus siglas en inglés “glucan binding domain”) (Figura 2a) (Monchois *et al.*, 1999). Estudios de delección de la RV sugieren que no es esencial para la actividad de las GS (Moulis *et al.*, 2006a). Por ejemplo, la eliminación de la RV de la GS de *Lactobacillus reuteri* 180 GTF-180 dio como resultado una enzima (GTF180-ΔN) con características bioquímicas casi idénticas a las de la enzima silvestre (Vujičić-Žagar *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Estructura general de la glucansacarasa de *Lactobacillus reuteri* 180 GTF180-ΔN. a) Estructura primaria que consta de: péptido señal (PS), región variable N-terminal (RV), dominio catalítico conservado (CD) y el C-terminal o dominio de unión a glucana (GBD); b) Estructura cristalina (PDB ID: 3KLK); c) Representación esquemática del curso de la cadena peptídica en forma de “U” con los dominios de color: V rojo, IV amarillo, B verde, A azul y C magenta, los residuos N- y C- terminal se encuentran en el dominio V (adaptada de Vujičić-Žagar *et al.*, 2010).

Las GS tienen en común un CD plegado en forma de barril TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> permutado en referencia con las características que muestran las  $\alpha$ -amilasas de la familia GH13, iniciando en la hélice  $\alpha$ <sub>3</sub>, como se muestra en las figuras 2b y 3b y en la que el dominio C se inserta entre la hélice  $\alpha$ <sub>8</sub> y la hebra  $\beta$ <sub>1</sub>, y el dominio B conecta la hebra  $\beta$ <sub>3</sub> con la hélice  $\alpha$ <sub>3</sub> (Figura 3b). En tal CD se ha demostrado que existe un conjunto de residuos de aminoácidos clave para llevar a cabo la orientación y la catálisis del sustrato sacarosa, que están altamente



conservados entre las secuencias reportadas de GS (Leemhuis *et al.*, 2012; Pijning *et al.*, 2012). La primera estructura cristalográfica de un fragmento de la GS de *Lactobacillus reuteri* 180 GTF180-ΔN realizada por Vujičić-Žagar y colaboradores (2010), nos permite visualizar una estructura donde la cadena polipeptídica sigue una ruta en forma de “U” con cinco dominios estructurales distintos, los dominios A, B, C, IV y V (Figura 2b).

Hasta la fecha suman veintidós las estructuras cristalográficas reportadas de seis GS, poniendo en evidencia el gran interés en la última década por estas enzimas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Estructuras cristalográficas de las GS reportadas en la base de datos del PDB (Protein Data Bank: <https://www.rcsb.org>).

Enzima	Microorganismo	AA	PDB [X] cadenas mostradas	Complejo	Dominios visibles	Resolución (Å)	Referencia	
Reuteransacarasa (GTF-A)	<i>Lactobacillus reuteri</i> 121	745–1763	4AMC[A]	-	C A B IV ΔV	3.6	(Pijning <i>et al.</i> , 2012)	
Dextransacarasa (GTF-180)	<i>Lactobacillus reuteri</i> 180	746-1751	3HZ3[A]	Sacarosa (R)	C A B IV ΔV	2.22	(Vujičić-Žagar <i>et al.</i> , 2010)	
			3KLK[A]	-		1.65		
			3KLL[A]	Maltosa (R)		2		
		746-1751	4AYG[A,B]	-	C A B IV ΔV	2	(Pijning <i>et al.</i> , 2014)	
Dextransacarasa (DSR-M)	<i>Leuconostoc citreum</i> NRRL B-1299	288-1436	5LFC[A,B]	-	C A B IV ΔV	3.2	(Claverie <i>et al.</i> , 2017)	
			171-1435	5NGY[A,B]	I4	C A B IV V(R)		3.7
			334-1433	5O8L[A]	Sacarosa	C A B IV ΔV		3.6
Dextransacarasa (DSR-E)	<i>Leuconostoc citreum</i> NRRL B-1299	1759-2835	3TTO[A,B,C,D]	-	C A B IV ΔV	3.3	(Brison <i>et al.</i> , 2012)	
			3TTQ[A]	-	C A B IV ΔV	1.9		
			4TTU[A]	I2	C A B IV ΔV	2.2	(Brison <i>et al.</i> , 2016)	
			4TVC[A]	I3	C A B IV ΔV	1.85		
			4TVD[A]	D-glucosa	C A B IV ΔV	2.3		
Alternansacarasa (Asr)	<i>Leuconostoc citreum</i> NRRL B-1355	39-1425	6HVG[A,B]	-	C A B IV ΔV	2.8	(Molina <i>et al.</i> , 2019)	
			6SZI[A,B]	I2	C A B IV ΔV	3		
		147-1424	6SYQ[A,B]	I3	C A B IV ΔV	3	(Molina <i>et al.</i> , 2020)	
			6T16[A,B]	Panosa	C A B IV ΔV	3.1		
			6T18[A,B]	Oligo-alternan	C A B IV ΔV	3.15		
6T1P	I9	C A B IV ΔV	3.5					
Mutansacarasa (GTF-SI)	<i>Streptococcus mutans</i>	244-1087	3AIB[A,B,C,D,E,F,G,H]	Maltosa	C A B IV	3.09	(Ito <i>et al.</i> , 2011)	
			3AIC[A,B,C,D,E,F,G,H]	Acarbosa	C A B IV	3.11		

		3AIE[A,B,C,D ,E,F,G,H]	-	C A B IV	2.1	
--	--	---------------------------	---	----------	-----	--

R: hace mención a que el complejo o parte de un dominio fue construido por modelamiento molecular.

AA: cantidad de aminoácidos presentes en la estructura cristalográfica.

I2, I3, I4, I9: Isomaltosa, isomaltotriosa, isomaltotetraosa e isomaltosona respectivamente.

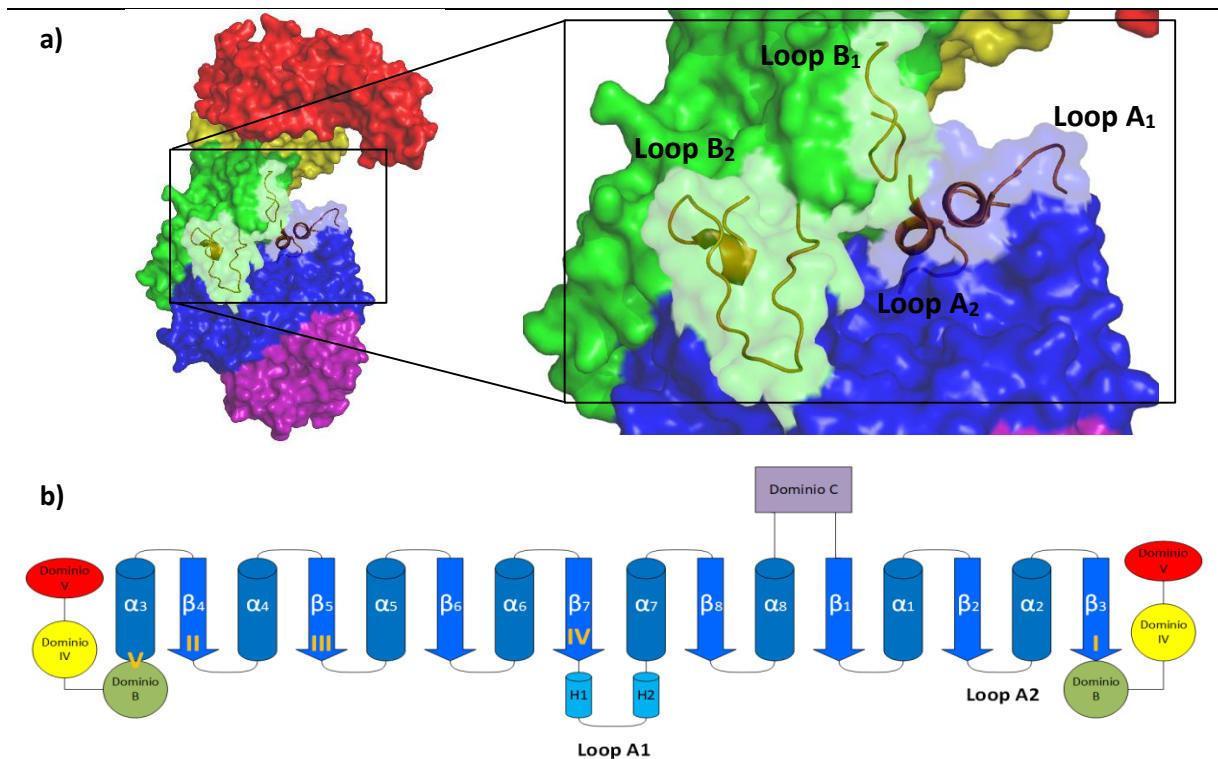
Leemhuis y colaboradores (2013), hicieron una revisión importante de la estructura de las GS con base en la información de las estructuras cristalográficas que había hasta ese momento y los trabajos previos del mismo grupo, poniendo en evidencia la función de cada dominio.

**El dominio A** es el dominio catalítico y está constituido por el barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, así como los motivos o regiones altamente conservadas I, II, III y IV localizadas dentro de la cavidad catalítica e implicadas directamente en el mecanismo de reacción (Figura 3b). Este dominio también tiene un motivo V que comparte con el Dominio B y que está implicado en la unión a Ca<sup>2+</sup> como se observa en la Figura 2b. Estudios recientes han identificado en este dominio la presencia de dos “Loops”, el primero de ellos denominado A1, localizado en la parte del N-terminal entre la hebra  $\beta_7$  y la hélice  $\alpha_7$ , el segundo llamado A2, que conecta la hoja  $\beta_2$  con la hélice  $\alpha_2$  (Figura 3a). Dichos “Loops” rodean el sitio catalítico y están implicados en los subsitios que interactúan con el sustrato donador, la molécula aceptora y también con la cadena naciente de glucana (Claverie *et al.*, 2017; Claverie *et al.*, 2019). El “Loop” A1 está insertado entre dos pequeñas hélices H1/H2 comunes entre las GS (Figura 3b).

**El dominio B** se encuentra ubicado junto al dominio catalítico, formado por hasta seis hebras  $\beta$  anti paralelas y por los “Loops” B1/B2 encontrados en la parte del N-terminal, que contribuyen a dar forma a la ranura y entrada de la cavidad catalítica y, junto con el dominio A, forman un sitio de unión a calcio. El dominio B se interrumpe a partir de la hélice  $\alpha_3$  hasta la hebra  $\beta_3$  del dominio A (Figura 3b).

**El dominio C** forma la parte inferior de la "U", está formado por ocho hebras  $\beta$  y aunque se conserva en todas las GS así como en las enzimas de la familia GH13, su función precisa aún no es clara.

**El dominio IV** se encuentra posicionado entre los dominios B y V y no presenta similitud estructural con otras proteínas. Sin embargo, Pijning y colaboradores (2014), demostraron por cristalografía que el dominio IV puede funcionar como una especie de “bisagra” confiriéndole flexibilidad al dominio V y permitiéndole un acercamiento con glucanas desde o hacia el sitio catalítico. De hecho, la conexión entre los dominios IV y V consiste en dos tramos de polipéptidos relativamente largos sin estructura secundaria, confiriéndole flexibilidad.



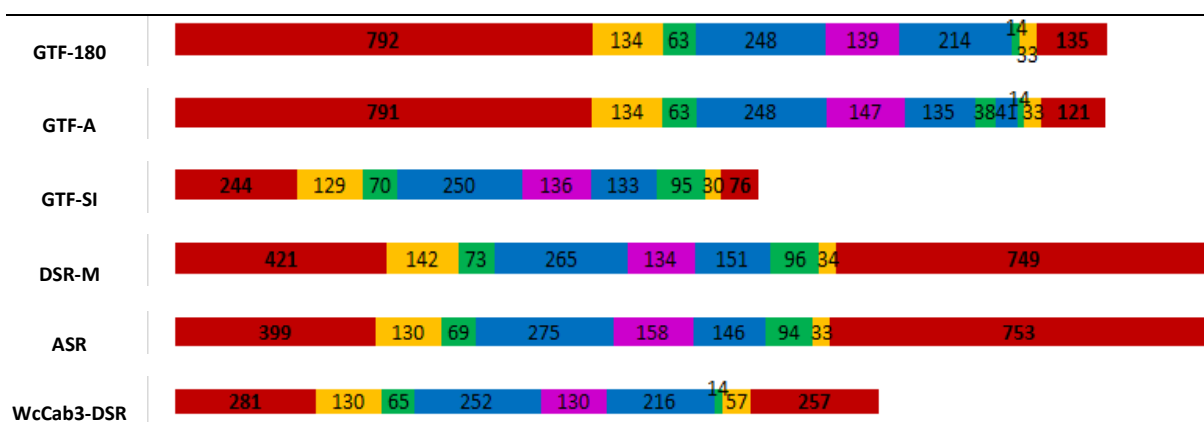
**Figura 3.** a) Vista de la organización de los dominios de la estructura cristalina de *Leuconostoc citreum* DSR-M (PDB ID: 5NGY), zoom en los dominios A y B (mismos colores que la Figura 2) y representación de la estructura secundaria de los “Loops” conservados en las GS. b) Representación esquemática de los elementos estructurales del sitio catalítico (dominio A) barril TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> permutado. Los cilindros representan  $\alpha$ hélices y H1/H2, y las flechas representan hebras  $\beta$ . Los motivos conservados (I-IV) están indicados en la correspondiente hebra  $\beta$  y el motivo V está indicado al final del dominio B (del N-terminal) y al inicio de la hélice  $\alpha_3$  del dominio A.

**Finalmente, el dominio V** está formado por los segmentos C- y N- terminal, y está constituido por varias repeticiones de secuencia de aminoácidos, principalmente repeticiones que contienen el motivo tirosina/glicina (tipo YG), que participan en la unión a la glucana (GBD) y también con posible función de anclaje a la membrana plasmática. Presenta una estructura secundaria de módulos que contienen dos o tres unidades de hebras  $\beta$  ( $\beta_2/\beta_3$ ) consecutivas de aproximadamente 21 aminoácidos. Dichas unidades pueden estar constituidas de horquillas  $\beta$  o por 3 hebras antiparalelas  $\beta$ . Los módulos estructurales  $\beta_2/\beta_3$  están dispuestos de manera repetitiva, lo que resulta en un pliegue de solenoide  $\beta$ .

### 2.1.2.1 Dominio de unión a glucana (GBD)

Cuando aún no se contaba con una estructura cristalográfica, en el extremo C-terminal se ubicaba un dominio denominado de unión a glucana (GBD) (Figura 2a). Actualmente se sabe que, el GBD puede estar presente tanto en el extremo del C-terminal como en el N-terminal del dominio V. En géneros como *Lactobacillus*, el segmento N-terminal comprende una mayor longitud de aminoácidos (aa) en las GS, comparado con los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus*, y *Weissella*. En efecto, mientras que estas últimas tienen un segmento N-

terminal de entre 200 a 400 aa, en *Lactobacillus* representa el doble de extensión (Figura 4). Por otro lado, el GBD presente en el extremo C-terminal en géneros como *Leuconostoc* usualmente tienen mayor longitud en comparación con las diferentes GS. En géneros como *Lactobacillus* y *Streptococcus* el extremo C-terminal de las GS es más corto, con una extensión de alrededor de 100 aa. En el caso del género *Weissella*, tal pareciera que se mantiene la misma longitud en ambos segmentos, con una extensión de alrededor de 250 aa. Sin embargo, no hay más estructuras de esta especie para validar la generalización.



**Figura 4.** Representación de la estructura primaria de diferentes GS con estructura cristalográfica: *Lactobacillus reuteri* 180 (GTF-180), *Lactobacillus reuteri* 121 (GTF-A), *Streptococcus mutans* (GTF-SI), *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 (DSR-M), *Leuconostoc citreum* NRRL B-1355 (ASR), *Weissella confusa* (WcCab3-DSR). Mismos colores que la Figura 2. La escala representa el número de aa.

Mediante estudios basados en deleciones del GBD en el extremo C-terminal, se concluye que los GBD de las GS proporcionan una plataforma de anclaje de la glucana que permite la unión y elongación de los productos sintetizados (Moulis *et al.*, 2006b), pero no se ha esclarecido cuales elementos estructurales son esenciales o están involucrados en la función enzimática, en particular con el mecanismo de polimerización (explicado con mayor detalle en el apartado 2.1.4).

Los GBD tienen varias secuencias repetidas que muestran homología con motivos de unión a carbohidratos en toxinas de *Clostridium difficile* (Von Eichel-Streiber *et al.*, 1992), cuya función se propuso desde que fueron identificadas, es la de unión de glucana. En efecto, se trata de un consenso de unidades repetidas tipo YG compuestas por alrededor de 21 aminoácidos, caracterizadas por la aparición de una glicina ubicada de tres a cinco residuos después de un grupo que contiene de uno a cuatro residuos aromáticos, que incluye tirosina, triptófano y fenilalanina (Giffard y Jacques, 1994). Las estructuras cristalizadas de varias GS truncadas en sus extremos N- y C- terminal (Tabla 2) arrojan luz sobre el pliegue GBD en el dominio V, aunque todavía no se han resuelto estructuras con GBD completos. Brison y colaboradores (2016), lograron cristalizar una GS en complejo con glucosa y gluco-oligosacáridos, los cuales se encontraron interactuando en “pockets” de unión a glucana

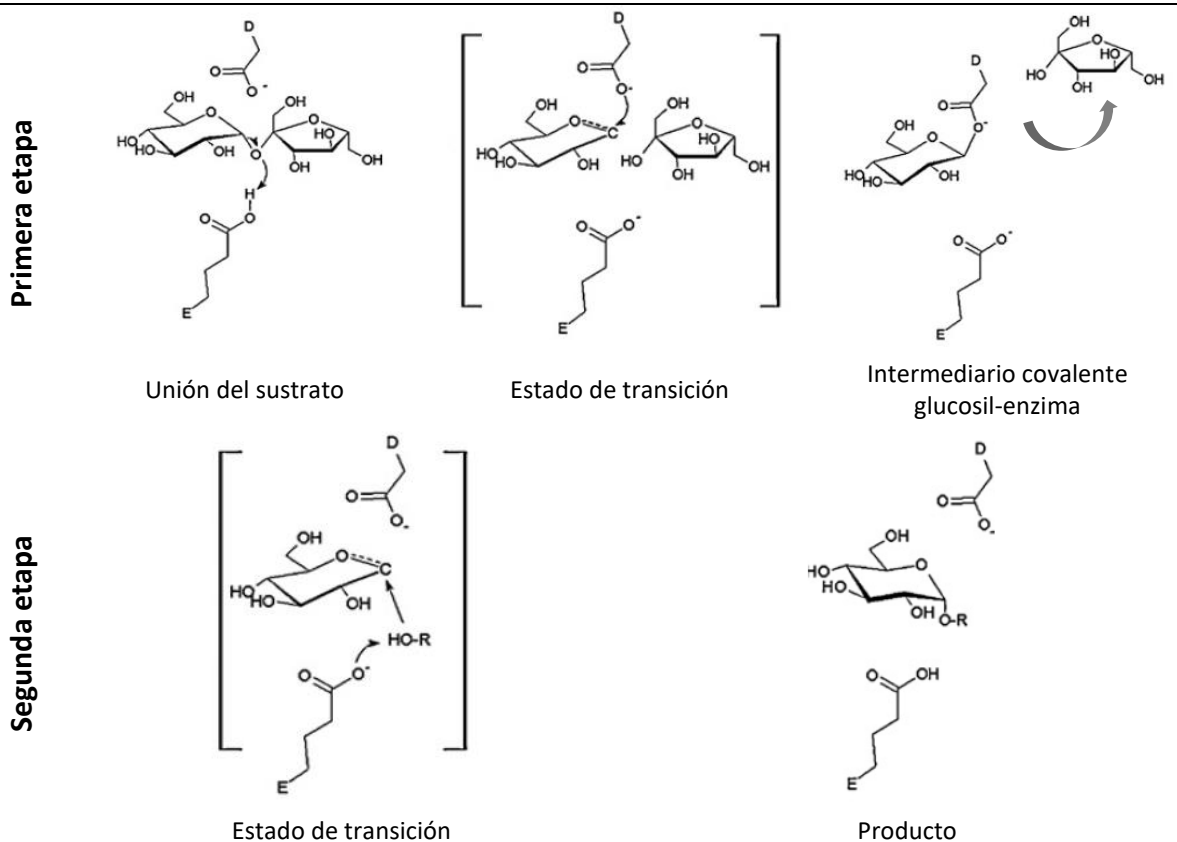
(también llamados “pockets” de unión a carbohidratos), proporcionando la primera evidencia estructural de la interacción molecular que ocurre entre carbohidratos y el dominio V. Así mismo lograron identificar sistemáticamente un residuo aromático (tirosina) en el fondo de estos “pockets” en una interacción “stacking” con el residuo glucosilo del carbohidrato al que se suma una red de enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals que estabilizan la unión. Derivado de este hallazgo, como era de esperarse, se estudió la mutación puntual del residuo aromático de tirosina responsable de la interacción “stacking”, así como mutaciones de residuos con interacciones de van der Waals en elementos repetitivos del GBD. Es así que, mediante experimentos en gel de electroforesis de afinidad a glucana, se demostró que dichos residuos son esenciales para la unión de glucana, y se resaltó específicamente, el rol del residuo aromático en la elongación de la glucana (Claverie *et al.*, 2020). Estas interacciones también fueron demostradas por dinámica molecular, con un conjunto de gluco-oligosacáridos de hasta 23 unidad de glucosa, y modelos por homología para completar el dominio V para las enzimas GTF-180 y la GTF-SI, concluyéndose que las interacciones más relevantes tienen lugar con residuos que pertenecen a las mencionadas repeticiones tipo YG ubicadas en los segmentos N- y C-terminal del dominio V (Osorio *et al.*, 2019).

Mediante estudios de multialineamiento de secuencias, como es de esperarse, la secuencia de estos “pockets” de unión se conserva y se presenta repetidamente en el dominio V de varias GS conocidas (Brison *et al.*, 2016). De hecho, Claverie y colaboradores (2020), demostraron que la presencia de múltiples sitios de unión mejora la afinidad por las glucanas, demostrando también cómo intervienen en el mecanismo de polimerización. Con el fin de analizar la función del GBD, estos autores seleccionaron dos enzimas con diferente mecanismo de polimerización: DSR-M y DSR-OK de *Leuconostoc citreum* y *Oenococcus kitaharae* respectivamente, y llevaron a cabo mutaciones puntuales, deleciones de los “pockets” e incluso construcción de enzimas quiméricas. A la enzima DSR-M que sintetiza dextrana de bajo peso molecular (con un mecanismo no procesivo) se le intercambiaron los dominios IV y V de la enzima DSR-OK que sintetiza dextrana de alto peso molecular (con un mecanismo semi-procesivo) y viceversa. Llegando a conclusiones y propuestas interesantes entre ellas, los “pockets” de unión a glucana espacialmente los más cercanos al dominio catalítico juegan un papel importante en el control de la procesividad. Sin embargo, a pesar de los numerosos esfuerzos, únicamente se lograron observar cambios significativos en el mecanismo de síntesis con la mutación puntual del residuo de interacción “stacking” de dos “pockets” contiguos, obteniendo la disminución de tamaño del polímero, y el cambio de un mecanismo de síntesis semi-procesivo a uno distributivo. Sin embargo, hasta el momento se puede concluir que el mecanismo de síntesis no es un fenómeno exclusivo de los GBD, y que debe haber una conexión entre los elementos estructurales del sitio catalítico, con el número

y posición de los “pockets” de unión a glucana, además de la aidez estructural del dominio IV y V para aumentar la cooperatividad entre los “pockets” y sitio catalítico.

### 2.1.3 Mecanismo de reacción

El mecanismo de reacción de las GS consta de un doble desplazamiento (Figura 5).



**Figura 5.** Mecanismo de reacción general de las GS. D es el residuo nucleofílico, E es el residuo ácido/base, R-OH representa un aceptor que puede ser una cadena creciente de glucana, un aceptor endógeno con grupo OH o el agua.

En una primera etapa, el sustrato sacarosa se acomoda en el sitio catalítico donde los grupos  $^2\text{OH}$  y  $^3\text{OH}$  del glucósido de la sacarosa se unen por puentes de hidrógeno al residuo estabilizador, para que posteriormente el residuo que actúa como ácido/base done su protón al oxígeno que forma el enlace glucosídico, formándose un estado de transición en el que el átomo de carbono C1 anomérico del sustrato es atacado por el residuo nucleofílico, evento que conduce a la formación del intermediario covalente glucosil-enzima, invirtiéndose la configuración y liberándose fructosa. En una segunda etapa, el residuo glucosídico es atacado por el aceptor (que puede ser el agua) vía un segundo ataque nucleofílico con una segunda inversión de la configuración que lleva a la retención de la configuración  $\alpha$ -anomérica, habiéndose demostrado que la triada catalítica está conformada por tres aminoácidos carboxílicos altamente conservados, a saber: aspártico que actúa como el

residuo nucleofílico, el glutámico que actúa como ácido/base y aspártico actúa como el estabilizador (Vujičić-Žagar *et al.*, 2010; Leemhuis *et al.*, 2013).

#### 2.1.4 Productos: polisacáridos y gluco-oligosacáridos

Dependiendo de su especificidad, las GS catalizan la formación de cadenas lineales y ramificadas de glucana con varios tipos de enlaces glicosídicos, a saber:  $\alpha$ -(1-2),  $\alpha$ -(1-3),  $\alpha$ -(1-4) y/o  $\alpha$ -(1-6), (Leemhuis *et al.*, 2012). Generalmente estas enzimas se conocen por el tipo de producto que sintetizan, por ejemplo, la dextranasa (EC 2.4.1.5) sintetiza dextranas o la mutansacarasa que sintetiza mutana. El primero es un polisacárido que se caracteriza por tener enlaces  $\alpha$ -(1-6) consecutivos en la cadena principal y en menor proporción (aproximadamente un 5%) enlaces ramificados en la posición  $\alpha$ -(1-3), mientras que la mutansacarasa (EC 2.4.1.125) sintetiza mutanas, polímeros de glucosa con enlaces  $\alpha$ -(1-3) consecutivos en la cadena principal y enlaces ramificados en la posición  $\alpha$ -(1-6). La alternansacarasa (EC 2.4.1.140) sintetiza alternanas denominada así por alternar enlaces  $\alpha$ -(1-6) y  $\alpha$ -(1-3) en la cadena principal; la reuteransacarasa (EC 2.4.1.-) producida por *L. reuteri* sintetiza reuteranas que son glucanas con enlaces  $\alpha$ -(1-4) consecutivos en la cadena principal y enlaces ramificados  $\alpha$ -(1-6) (Figura 6). También se ha encontrado ramificaciones en  $\alpha$ -(1-2) con cadena principal constituida por enlaces  $\alpha$ -(1-6). Un alto porcentaje de ramificaciones  $\alpha$ -(1-2) se producen cuando se incubaba con sacarosa como donante y dextrana como aceptor, transfiriendo los residuos de glucosilo al aceptor mediante un mecanismo bi-bi de ping-pong a partir de la enzima GBD-CD2, una enzima particular, ya que esta enzima proviene de un diseño racional en el que se eliminó uno de los dos dominios catalíticos (CD1 y CD2) que estaban separados por un GBD de la GS bifuncional DSR-E de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 (Brison *et al.*, 2012). En la Tabla 3 se resume la estructura de algunos polisacáridos y las enzimas que los sintetizan.

Las diferencias en el tipo y la proporción de enlaces glicosídicos de las glucanas, tienen su origen en los aminoácidos que se encuentran alrededor de los subsitios de unión al sustrato y los aminoácidos que guían y orientan a la molécula aceptora hacia el sitio catalítico. Dicho acomodo, definirá el ataque nucleofílico del aceptor al intermediario glucosil-enzima de las distintas GS (Leemhuis *et al.*, 2012; Pijning *et al.*, 2012; Molina *et al.*, 2019). De igual forma, se sabe que las GS producen polímero de muy alto peso molecular ( $>10^6$  Da); sin embargo, aún no se puede definir si la síntesis del polímero es a través de un mecanismo procesivo o bien no procesivo o semi-procesivo. Moulis y colaboradores (2006b), mostraron que dos moléculas pueden actuar como iniciadores de la polimerización: la sacarosa misma y la glucosa producida por hidrólisis, prefiriéndose esta última cuando ambas existen en concentraciones similares en el medio de reacción. El alargamiento de las cadenas se produce por transferencia del residuo glucosilo procedente de la sacarosa produciéndose

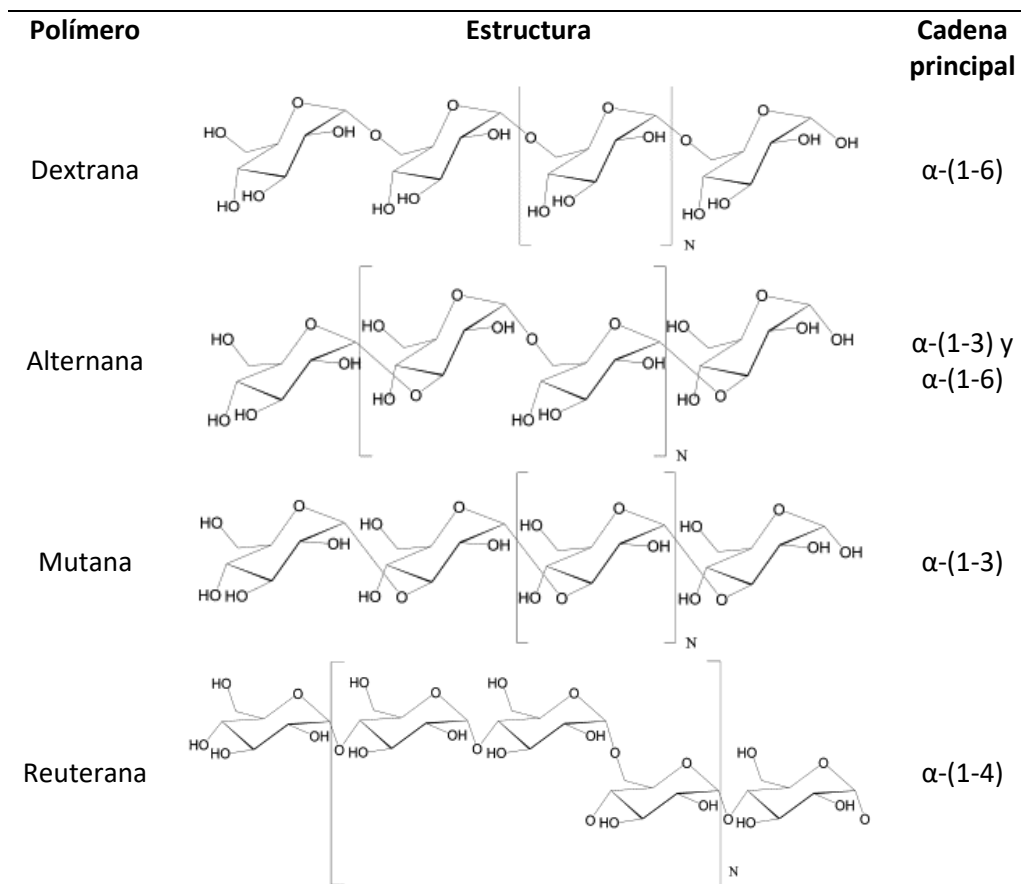
inicialmente una serie de gluco-oligosacáridos, cuya concentración siempre es baja debido a la alta capacidad aceptora de estos intermediarios, siendo alargados inmediatamente después de su síntesis para formar polímero de alto peso molecular. Claverie y colaboradores (2017), reportan la única dextransacarasa silvestre que produce polímero de bajo peso molecular (28,000 Da) proveniente de *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299, atribuyéndole un mecanismo no procesivo, como resultado de observar: 1) una alta propensión a reconocer a la sacarosa como un aceptor preferido en la etapa inicial de catálisis, 2) la capacidad de alargar los gluco-oligosacáridos independientemente de su tamaño, y 3) la presencia de un dominio V que muestra una capacidad débil para unirse a las cadenas de glucana en crecimiento.

**Tabla 3.** Estructura y origen de los principales polisacáridos tipo glucana sintetizados por GS.

Microorganismo	Polisacárido	Estructura	Enzima	Referencia
<i>Weissella cibaria</i> CMU	Dextrana	$\alpha$ -(1-6) -- 100%	Dextransacarasa (EC 2.4.1.5)	(Kang <i>et al.</i> , 2009)
<i>Oenococcus</i> <i>kitaharae</i> DSM17330		$\alpha$ -(1-6) -- 98% $\alpha$ -(1-3) -- 2%		(Vuillemin <i>et al.</i> , 2018)
<i>Weissella confusa</i> LBAE C39-2		$\alpha$ -(1-6) -- 97% $\alpha$ -(1-3) -- 3%		(Amari <i>et al.</i> , 2013)
<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> NRRL B-512F		$\alpha$ -(1-6) -- 95% $\alpha$ -(1-3) -- 5%		(Moulis <i>et al.</i> , 2006a)
<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> NRRL B-1299		$\alpha$ -(1-6) -- 61% $\alpha$ -(1-2) -- 28% $\alpha$ -(1-3) -- 12%		(Fabre <i>et al.</i> , 2005)
<i>Streptococcus</i> <i>mutans</i> GS5,	Mutana	$\alpha$ -(1-3) -- 87.5% $\alpha$ -(1-6) -- 6.7%	Mutansacarasa (EC 2.4.1.125)	(Fukushima <i>et al.</i> , 1992)
<i>Leuconostoc Citreum</i> NRRL B-1355.	Alternana	$\alpha$ -(1-6) y $\alpha$ -(1-3) 50%	Alternansacarasa (EC 2.4.1.140)	(Molina <i>et al.</i> , 2019)
<i>Leuconostoc reuteri</i> ATCC 55730	Reuterana	$\alpha$ -(1-4) -- ~70% $\alpha$ -(1-6)	Reuteransacarasa (EC 2.4.1.-)	(Kralj <i>et al.</i> , 2005)

Además de la síntesis de glucanas a partir de sacarosa, las GS tienen la capacidad de transferir el residuo glucosilo a dos tipos de aceptores más: el agua (reacción de hidrólisis), y otros azúcares, como la maltosa, lo que conduce a la formación de gluco-oligosacáridos (GOS) (Bivolarski *et al.*, 2018). En la reacción de alargamiento de los gluco-oligosacáridos, el tamaño (es decir, DP o grado de polimerización) de los productos generados depende en gran medida de la relación sacarosa/aceptor, la cual parece ser una propiedad general sobre todo para las dextransacarasa (Shi *et al.*, 2016). Hay reportes específicos de glucosilación de otras moléculas como los estevioles, la vitamina C o diversos polioles que no serán revisados en este trabajo (André *et al.*, 2010).





**Figura 6.** Estructuras básicas de glucanas sintetizadas por GS (adaptada de Leemhuis *et al.*, 2013).

## 2.2 Papel de la dextrana y GOS en la industria

Como se ha descrito, el tamaño, el peso molecular, el tipo y la disposición de los enlaces  $\alpha$ -glucosídicos, así como el grado de ramificación, pueden variar considerablemente de un polímero a otro. Todos estos factores definen las propiedades fisicoquímicas (especialmente las reológicas), biológicas y mecánicas de cada glucana, de las que depende también su aplicación. Existe considerable literatura dedicada a los numerosos usos de la dextrana nativa de alto peso molecular, de la dextrana parcialmente hidrolizada (bajo peso molecular) y más recientemente de los GOS. La dextrana ha ganado mercado internacional debido a sus propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad, que potencian sus aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, biomaterial, cosmética y química fina. Otra característica que con frecuencia se señala es el hecho de que la dextrana se obtiene a partir de recursos renovables como es el caso de la sacarosa.

La dextrana de bajo peso molecular es la de mayor impacto en el mercado farmacéutico y su aplicación data de los años 40 (Grönwall y Ingelman, 1984). El impulso inicial para su producción comercial fue su aplicación como agente terapéutico, funcionando como

expansor y mejorador del plasma sanguíneo, restaurando el volumen de sangre para víctimas que requerían de transfusión de sangre durante la segunda guerra mundial. Actualmente se emplean fracciones de PM entre 40,000 a 70,000 Da para este uso (Diz-Küçükaya y López, 2018). También dentro de la industria farmacéutica, se ha utilizado el Sulfato-dextrana, actuando como anticoagulante y la Hierro-dextrana que es un medicamento para el tratamiento de anemia, existiendo tanto el grado humano como veterinario (Hall y Ricketts, 1952; Johnson, 1979).

Otro uso de las dextranas es su aplicación como emulsificante en las soluciones de la industria fotográfica, y como gelificante para la obtención de empaques cromatográficos (el Sephadex®), que se obtiene por reacción de una solución alcalina de dextrana con epiclohidrina para dar cadenas reticuladas (De Belder, 1993). Es sin embargo en la industria alimentaria donde la dextrana nativa y sus derivados han obtenido más aplicaciones. A saber, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos actualmente considera a la dextrana como aditivo GRAS (generalmente reconocido como seguro) para aplicaciones de alimentos y piensos. De mayor interés dentro de la industria alimentaria, son las aplicaciones como sustituto de hidrocoloides en masas fermentadas de trigo, con lo cual ha ganado mercado como sustituto de gluten para obtener un pan con propiedades sensoriales aceptables (Galle *et al.*, 2010). Aunque no se espera que la dextrana desplace del mercado a otros hidrocoloides de gran volumen y bajo costo, como la goma de xantana, ha logrado la captación de un mercado importante y se considera una opción viable para otras aplicaciones (Garibay *et al.*, 1993), sobre todo por su capacidad de alterar las propiedades de flujo del agua. En resumen, la dextrana tiene usos potenciales como gelificante, crioprotector, agente aglutinante, viscosificante, texturizante y emulsionante en varios productos alimenticios (Bejar *et al.*, 2013; Kothari *et al.*, 2015).

Las dextranas también se usan en varias formulaciones para el mercado de los cosméticos ofreciendo muchas ventajas como ingredientes, donde la excelente biocompatibilidad, las propiedades hidratantes y la estabilidad ocupan un lugar destacado en la lista de requisitos (Sajna, *et al.*, 2015). Se han descrito muchos otros usos potenciales de las dextranas, a saber, para la construcción de sistemas de suministro de medicamentos y administración de fármacos dirigidos: como profármaco, nanopartícula, nanogel, microesferas y micelas (Chen *et al.*, 2020).

Por otro lado, existe un creciente interés en los gluco-oligosacáridos desde que se demostró su carácter prebiótico, es decir, ingredientes alimenticios funcionales para modular la composición de la microbiota colónica y proporcionar beneficios a la salud del huésped (Petrova y Petrov, 2017). Esto ha hecho crecer el interés en las GS para la síntesis de gluco-oligosacáridos funcionales ya sea como edulcorantes o como fibra dietética (Patel y Goyal,

2011). Se sabe que los enlaces  $\alpha$ -(1-6) y en particular los  $\alpha$ -(1-2) son resistentes a la hidrólisis por enzimas intestinales humanas, lo que resulta en la digestión lenta de dextrana en humanos (Remaud-Simeon *et al.*, 1994). A este respecto, por mencionar algunos ejemplos, los GOS sintetizados por *Weissella cibaria* RBA12 aislada de la fruta pomelo, demostraron un mayor crecimiento de especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y el crecimiento controlado de bacterias entéricas no probióticas (Baruah *et al.*, 2017). Otro ejemplo es la síntesis de GOS con potencial prebiótico por una GS *Leuconostoc mesenteroides* URE13 con un grado de polimerización de 3 a 6 usando maltosa, rafinosa y lactosa como aceptor (Bivolarski *et al.*, 2018).

### 2.2.1 Dextrana en alimentos fermentados

La fermentación se ha aplicado durante miles de años como un método para preservar los alimentos perecederos. Una gran variedad de bebidas y alimentos fermentados tradicionales se elaboran con cultivos mixtos de microorganismos para metabolizar los diversos carbohidratos, aprovechando diferentes fuentes de carbono para su crecimiento. Hoy en día, una gran variedad de alimentos fermentados se consume en todo el mundo y son apreciados por sus propiedades organolépticas y sensoriales, como: queso, yogur, cerveza, vino, pan, masa agria, masa de trigo, aceitunas, encurtidos, por mencionar algunos (Tamang *et al.*, 2016). Buena parte de estos productos son importantes para el consumo humano por sus beneficios nutrimentales, contenido calórico y por su impacto en la economía y las culturas alimentarias correspondientes. Es bien sabido que las LAB son de los principales microorganismos encargados de la fermentación de vegetales promoviendo cambios moleculares de la materia prima, particularmente una rápida acidificación por la producción de ácido láctico, además de varios otros compuestos importantes como etanol, dióxido de carbono, bacteriocinas, exopolisacáridos (EPS), compuestos aromáticos y enzimas útiles. En consecuencia, se mejoran las propiedades físicas, los efectos funcionales y benéficos para la salud humana cuando se consumen (Welman and Maddox, 2003; Zhou *et al.*, 2019). En general, las LAB dedican una pequeña parte de sus sustratos de sacarosa al proceso de producción de EPS, y los miembros de LAB que juegan un papel central en el proceso de fermentación pertenecen a los géneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Stiles y Holzapfel, 1997; Tamang *et al.*, 2016). Las cepas de *Leuconostoc* y *Weissella* han sido de gran interés por su capacidad de producir EPS y, específicamente, homopolisacáridos de tipo fructana y/o glucana (Escalante *et al.*, 2008; Katina *et al.*, 2009; Torres-Rodríguez *et al.*, 2014; Adesulu-Dahunsi *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2019; Besrouer-Aouam *et al.*, 2021).

En particular, es de nuestro interés el género *Weissella*, del que se han aislado numerosas cepas provenientes de una gran variedad de alimentos fermentados que incluyen frutas, alimentos a base de verduras y alimentos a base de almidón o cereales, según se resume en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Cepas del género *Weissella* aisladas de alimentos (en su mayoría fermentados).

Fermentado	Cepa de <i>Weissella</i>	Referencia
Kimchi (verduras principalmente col)	<i>W. koreensis</i>	(Lee <i>et al.</i> , 2002)
Pomelo	<i>W. cibaria</i>	(Baruah <i>et al.</i> , 2017)
Coliflor	<i>W. cibaria</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 2012)
Tofu	<i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i> , <i>W. paramesenteroides</i>	(Chao <i>et al.</i> , 2008)
Chicha (bebida a base de maíz)	<i>W. confusa</i> , <i>W. hellenica</i> , <i>W. paramesenteroides</i>	(Elizaquível <i>et al.</i> , 2015)
Sauerkraut	<i>Weissella spp.</i>	(Plengvidhya <i>et al.</i> , 2007)
“Sourdough” (masa de trigo fermentada)	<i>W. confusa</i>	(Amari <i>et al.</i> , 2013)
Pozol (maíz nixtamalizado)	<i>W. confusa</i> , <i>W. paramesenteroides</i> , <i>W. cibaria</i>	Grupo de la Dra. Carmen Wachter de la Facultad de Química de la UNAM

La identificación frecuente de *Weissella spp.* en una gran variedad de alimentos fermentados demuestra su capacidad para adaptarse a una gran diversidad de ambientes y desempeñar un papel importante en el proceso de fermentación. Tal es el caso del pozol, un alimento fermentado tradicional de origen maya, que se obtiene de la fermentación de la masa de maíz nixtamalizado y da lugar a una bebida ácida, refrescante y no alcohólica (Wacher *et al.*, 1993). En el pozol, bacterias ácidas lácticas amilolíticas (ALAB) como *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*, y bacterias ácido lácticas no amilolíticas (NALAB) como *Weissella* son clave para el proceso de fermentación de la masa de maíz nixtamalizada. En realidad, se sabe desde hace tiempo que *Weissella* es uno de los géneros predominantes de NALAB en el pozol, detectando la presencia de este género al principio de la fermentación principalmente (Hernández *et al.*, 2021). En un proceso similar como es la fermentación de masa de trigo, *Weissella spp.* ha demostrado que es importante, debido a su capacidad de producción de dextrana, la cual confiere al alimento mejora en la textura, vida de anaquel y valor nutrimental. (Bounaix *et al.*, 2009; Katina *et al.*, 2009; Galle *et al.*, 2010).

Por lo anteriormente expuesto, el estudio de la síntesis de glucanas y en especial la dextrana por GS producidas por microorganismos aislados de alimentos complejos, y sus características estructurales ha sido un tema de creciente interés por los grupos de biocatálisis. En el grupo del Dr. Agustín López-Munguía se trabajó con un conjunto de cepas

de *Weissella*, previamente aisladas del pozol por trabajos realizados por la Dra. Carmen Wacher-Rodarte en el Departamento de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se secuenció el genoma de dos de estas cepas WcL17 y Wcp-3a por su potencial para degradar carbohidratos disponibles en la masa de maíz nixtamalizado, y también, por su actividad glicosiltransferasa (Hernández *et al.*, 2021). Se logró la expresión heteróloga del gen codificante para una glicosiltransferasa de la familia GH70 de la cepa Wcp-3a. Estudios preliminares sobre los productos de esta enzima permitieron identificar una glucana de bajo peso molecular, la cual es de particular interés debido a que la mayor parte de las GS caracterizadas bioquímicamente de este y otros géneros sintetizan glucanas de alto peso molecular (Hernández y López-Munguía, 2018).

### **3. HIPÓTESIS**

La glucosiltransferasa de Wcp-3a del genero *Weissella* en particular de la especie *confusa* producen poli y oligo- sacáridos con características de estructura y función novedosas.

### **4. OBJETIVOS**

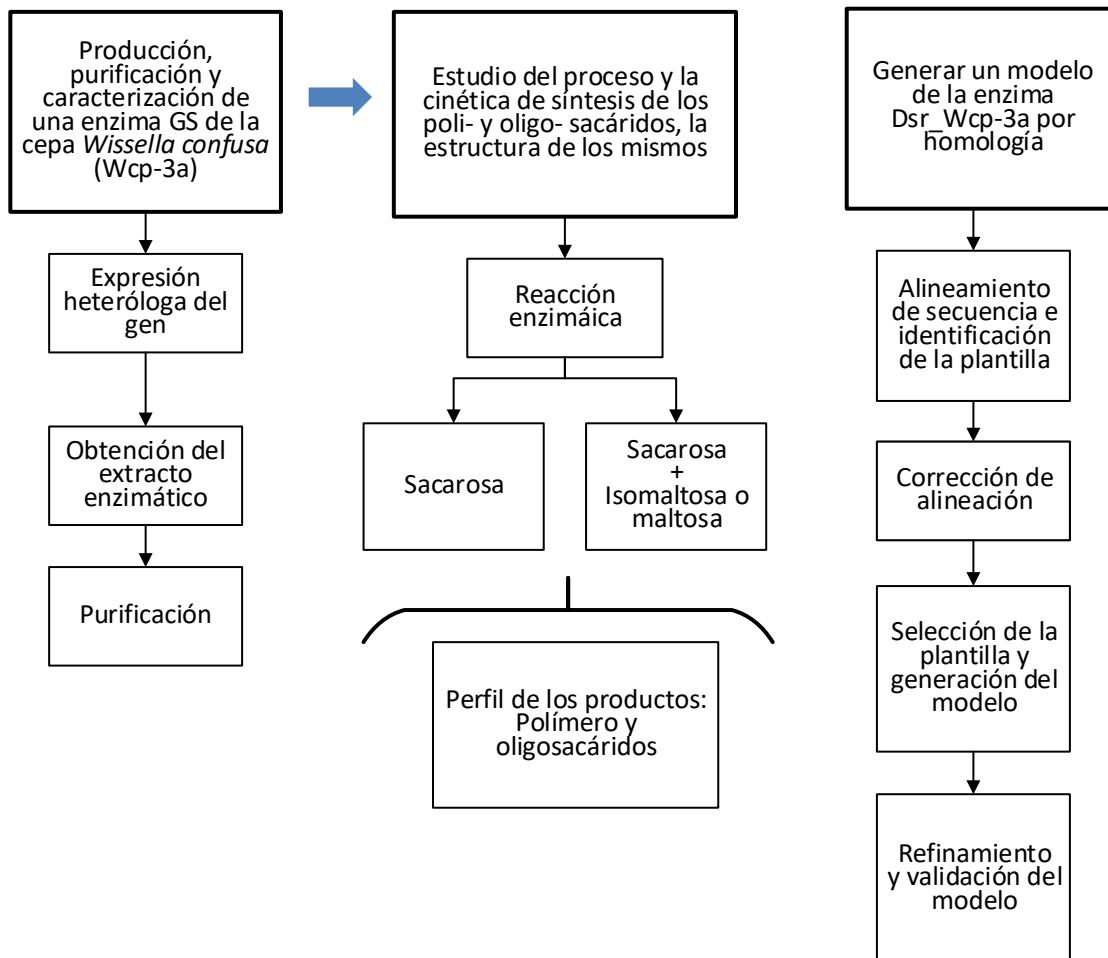
#### **4.1 Objetivo general:**

Producir y caracterizar una enzima del tipo glucosiltransferasa del genero *Weissella sp.* proveniente del pozol.

#### **4.2 Objetivos particulares:**

- Producir, purificar y caracterizar la enzima glucosiltransferasa Dsr\_Wcp-3a de la cepa *Weissella confusa* Wcp-3a.
- Estudiar el proceso y la cinética de síntesis de poli- y oligo- sacáridos, y la estructura de los mismos.
- Generar un modelo estructural de la enzima Dsr\_Wcp-3a por homología.

## 5. METODOLOGÍA



### **5.1 Expresión heteróloga del gen en una cepa de expresión**

La producción de la enzima dextransacarasa (Dsr\_Wcp-3a) de *Weissella confusa* Wcp-3a se realiza a partir de la transformación de células electrocompetentes de *E. coli* BL21 DE3 star™ con 2 µL de la construcción pET-22b (+) que contiene el gen que codifica para Dsr\_Wcp-3a. Las células transformadas se recuperan en 800 µL de medio Luria-Bertani (LB) y se incuban a 37 °C durante 1 h. Posteriormente se selecciona la colonia transformada en cajas Petri con agar LB adicionadas con 200 µg/mL de ampicilina. Se realiza el preinóculo de las células transformadas (una sola colonia) en 5 mL de medio LB con ampicilina por 6 hr a 37 °C y 200 rpm. Se toma una alícuota de 3 mL del primer preinóculo para incubarlas en matraces con 30 mL de medio LB con ampicilina por 12 hr a 37 °C y 200 rpm. Se inocula 5 mL del segundo preinóculo en 0.5 L de medio Terrific Broth (TB) adicionado con 200 µg/mL de ampicilina. El inóculo se incuba por 2.5 hr aproximadamente a 37 °C y 200 rpm hasta obtener una OD<sub>600</sub> de 0.6, momento en el cual se realiza la inducción con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 8 hr a 18 °C y 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación, las células se centrifugan a 9,000 rpm durante 20 min y a 4°C, inmediatamente se lavan con buffer acetatos 50 mM a pH 6.0. La pastilla celular obtenida se resuspende en buffer acetatos 50 mM, pH 6.0, se adiciona lisozima a razón de 1 mg por mL y se deja en hielo por 30 min. Posteriormente, se congela y descongela tres veces y por último se realiza una sonicación con 3 pulsos de 15 seg y se centrifuga a 9,000 rpm durante 40 min, obteniendo así el extracto enzimático. El sobrenadante se separa de los restos celulares y cada fracción (fracción soluble y fracción insoluble) se analizan por separado.

### **5.2 Cuantificación de proteínas**

Para realizar la cuantificación de proteínas se realiza empleando el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utiliza el reactivo Protein Assay (Bio-Rad) y se compara los valores con una curva de calibración, usando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar de medición a λ595 nm.

### **5.3 Purificación parcial enzimática mediante choque osmótico**

Para la purificación parcial de la enzima del espacio periplasmático de *E. coli* BL21 DE3 star™ por choque osmótico, primero se centrifuga las células obtenidas de la fermentación a 9,000 rpm durante 20 min a 4°C y posteriormente se lavan con buffer acetatos 50 mM pH 6.0. Inmediatamente después se resuspenden las células en el Buffer A y se incuban durante 30 minutos en hielo, se invierte ligeramente la suspensión con intervalos regulares. A continuación, se centrifuga la suspensión de células a 9,000 rpm a 4°C durante 20 min, se desecha el sobrenadante. Una vez concentradas, las células se incuban en el Buffer B por 30 minutos en hielo, se invierte ligeramente la suspensión con intervalos regulares. A continuación, se centrifuga la suspensión a 9,000 rpm a 4°C durante 20 min. El sobrenadante



y “pellet” celular se guardan para posterior análisis. Por último, se realiza un dializado del sobrenadante contra buffer de 50 mM de acetatos a pH 6.0.

Buffer A: 200 mM Tris-HCl, 200 g/L de sorbitol, 100 mM de EDTA, pH 8.0.

Buffer B: 10 mM Tris-HCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2% SDS, 1% Triton X-100, pH 8.0.

#### **5.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Para verificar el peso molecular y la pureza de la enzima se emplea la electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las proteínas se cargan en carriles separados mezcladas con buffer de carga para proteínas adicionado con 10% de agente reductor, el β-mercaptoetanol. Para la electroforesis, se emplea un campo eléctrico a 10 mA en buffer de corrida, y al término de la corrida el gel se tiñe con solución de azul Coomassie R-250.

Buffer de carga: 0.125 M Tris-Cl, pH 6.8, 4% SDS, 20% Glicerol y 10% de β-mercaptoetanol.

Buffer de corrida: 0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M Glicina y 0.1% SDS.

Para la detección de actividad dextransacarasa mediante un zimograma, el gel se carga por duplicado para su posterior comparación. El gel se divide en dos y una parte (la que no tiene marcador de peso molecular) se lava 3 veces por 20 min con una solución de Tween 80 al 1% (v/v) en buffer de acetatos 50mM y pH 6.0 y después se lava con buffer de acetatos dos veces. Posteriormente se incuba con sacarosa al 10% en buffer acetatos 50 mM pH 6.0 durante 4 hr a 30 °C. Después del periodo de incubación el gel se lava con una solución de etanol al 70% durante 20 min. Posteriormente, el gel se incuba en una solución de ácido peryódico al 0.7% más ácido acético al 5% durante 30 min, inmediatamente después se lava con una solución de ácido acético al 5% con metabisulfito de sodio al 0.2% hasta obtener un fondo claro en el gel. Finalmente, el gel se incuba con reactivo de Schiff durante 20 min. Este, al entrar en contacto con el polímero formado por acción de la enzima, se torna de color morado, permitiendo ubicar la banda en la que está presente la actividad dextransacarasa.

#### **5.5 Determinación de la actividad dextransacarasa**

Para la determinación de la actividad dextransacarasa, se lleva a cabo la reacción enzimática a una concentración de sacarosa a la saturación (100 g/L) en amortiguador de acetatos 50 mM a pH 6, midiendo las velocidades iniciales de reacción. Se mide la liberación de azúcares reductores o de manera específica, la liberación de fructosa y glucosa.

Los azúcares reductores se cuantifican mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) propuesto por Miller (1959). Se mide la absorbancia a λ540 nm y se compara los valores con una curva de calibración elaborada con una solución equimolar de glucosa y fructosa como referencia.

Específicamente, la actividad enzimática global se determina a una concentración de sacarosa del 100 g/L, pH 6.0 a 30 °C. Una unidad de actividad dextransacarasa (U), está definida como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de fructosa por minuto.

### **5.6 Cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa por HPLC**

Las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa en el medio de reacción se cuantifican mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizando un equipo Ultimate 3000 Dionex con una columna aminada Prevail, se emplea una fase móvil de acetonitrilo: agua 75:25 v/v a un flujo de 1.0 mL/min a una temperatura de 30°C equipado con un detector de índice de refracción. Se realiza una curva patrón a partir de un estándar de 10 mg/mL con fructosa, glucosa y sacarosa.

### **5.7 Síntesis enzimática del polisacárido**

La síntesis del polisacárido se realiza a partir de sacarosa como sustrato (100 g/L) en buffer de acetatos a 50 mM a pH 6, a 30°C y a 300 rpm con una actividad enzimática de 2U/mL, en un volumen final de 600  $\mu$ L. La conversión de sacarosa se monitorea midiendo los azúcares reductores liberados en el medio de reacción (ver apartado 5.6).

### **5.8 Perfil del polisacárido por GPC**

Los productos sintetizados se analizan por cromatografía de permeación en gel (GPC) con un equipo de HPLC Ultimate 3000 Dionex equipado con un detector de índice de refracción. Se emplea una columna Ultrahydrogel Linear (7.8 mm  $\times$  300 mm) con un tamaño de exclusión molecular de 0.50 a 10,000 KDa, se emplea un flujo constante de 0.8 mL/min y la columna se mantiene a una temperatura de 37 °C con una fase móvil de NaNO<sub>3</sub> 0.1 M.

### **5.9 Análisis de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C-RMN de la glucana de Dsr\_Wcp-3a y de *L. mesenteroides* B512-F**

Después de producir el polisacárido (ver apartado 5.7), se realiza su precipitación con dos volúmenes de etanol a 4 °C, una vez obtenido el precipitado, se centrifuga y se dializa contra agua destilada a 4 °C. Posteriormente el polisacárido se liofiliza para su análisis.

Antes de la espectroscopía de RMN, las muestras se disuelven en agua deuterada D<sub>2</sub>O. Los espectros se adquieren en un espectrómetro Bruker Avance III HD que funciona a 500 MHz para núcleos <sup>1</sup>H y 125 MHz para núcleos <sup>13</sup>C, respectivamente. La señal de HOD se suprime aplicando una secuencia de presaturación. Los desplazamientos químicos se enumeran en partes por millón (ppm), se refieren a D<sub>2</sub>O y se realizan sobre la base del análisis espectral <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY, NOESY, HSQC y HMBC. El porcentaje de enlaces  $\alpha$  se calcula a partir de las intensidades relativas de las señales anoméricas.

### **5.10 Síntesis enzimática de gluco-oligosacáridos**

La síntesis de gluco-oligosacáridos se realiza a partir de sacarosa como sustrato a una concentración de 100 g/L en buffer de acetatos a 50 mM a pH 6, 30°C y 300 rpm. Se utiliza maltosa o una mezcla de isomaltosa e isomaltotriosa como aceptor a una concentración de 50 g/L en un volumen final de 600 µL. La conversión de sacarosa se monitorea midiendo la fructosa y glucosa libres en el medio de reacción (ver apartado 5.6).

### **5.11 Perfil de gluco-oligosacáridos por TLC y HPAEC-PAD**

Se verifica la producción de gluco-oligosacáridos por cromatografía en capa fina. Los resultados obtenidos en las placas se corroboran por cromatografía de intercambio aniónico (HPAEC-PAD) en un equipo Dionex equipado con un detector electroquímico (ED50 Dionex) y se utiliza una columna CarboPac PA-200 (2 x 250 mm). La columna se equilibra a 30°C con 100 mM de NaOH a un flujo de 0.5 mL/min y los gluco-oligosacáridos se eluyen con un gradiente de acetato de sodio.

### **5.12 Identificación de estructura primaria de proteínas a través de la Espectrometría de Masas de alta resolución.**

Los análisis se llevaron a cabo en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología-UNAM. Primeramente, las muestras son reducidas con dithiothreitol, alquiladas con iodoacetamida y digeridas "in gel" con Tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin) en una solución de 50mM bicarbonato de amonio (pH 8.2) durante 18 hr a 37°C. A continuación, los péptidos producidos por clivaje enzimático se desalan y se aplican en un sistema LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) compuesto de una bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fisher) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro se realiza con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, péptido Met-Arg-Phe-Ala y Ultramark 1621).

En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utiliza un sistema gradiente de 2-85% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) y solvente A (agua con 0.1 % de ácido fórmico) en 120 minutos, en la cual se utiliza una columna capilar (ID 0.75 µm y 10 cm largo RP-C18). El flujo del sistema LC es de 10 µl/minuto.

Posteriormente, el escaneo total de iones (Full Scan) se realiza en el analizador Orbitrap con un poder de resolución de masas (Resolution Power;  $RP=m/FWHM$ ) de 30,000. Para la fragmentación de los péptidos se aplican los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation) con un poder de resolución de masas (Resolution Power;  $RP=m/FWHM$ ) de 15,000. Todos los espectros son adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación se realizan de forma

dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas (solamente se fragmentan iones con carga z2+, z3+ y z4+) con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos se utiliza la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 70 segundos.

Por último, la identificación de proteínas se obtiene a partir de los datos espectrométricos en formato.raw en el programa Proteome Discoverer 1.4.1.14 a través del motor de búsqueda Sequest HT. Para la búsqueda de identidad se utiliza la secuencia de la proteína Dsr\_Wcp-3a y *E. coli* (UniProt) datos invertida (Decoy database) como herramienta del programa de validación "Percolator". Se utiliza un FDR-False Discovery Rate (Mínimo) de 0.01 y FDR 0.05 (Máximo). La tolerancia máxima de diferencia de masas moleculares del ion precursor cuando comparados los valores teóricos contra experimentales (precursor mass tolerance) es de 20 ppm y la tolerancia para los fragmentos que se obtienen por disociación del ion precursor (fragment mass tolerance) es de 0.6 Da.

### **5.13 Comparación *in silico* y modelado 3D**

Se realiza una comparación *in silico* (siguiendo el protocolo descrito por Jabeen y colaboradores (2019)) de la enzima Dsr\_Wcp-3a para obtener una aproximación de la estructura atómica de la cadena polipeptídica con base en las estructuras cristalizadas ya conocidas de enzimas relacionadas. En general, se siguen los siguientes pasos: 1) estudiar y conocer la secuencia objetivo; 2) selección de los templados; 3) multialineamiento de secuencias; 4) construcción del modelo; 5) refinado del modelo; 6) evaluación del modelo.

## 6. Resultados y discusiones

### 6.1 Expresión heteróloga en *E. coli* de la enzima Dsr\_Wcp-3a

El gen *Dsr\_Wcp-3a* clonado en el vector pET-22b(+) se transformó en las cepas de expresión de *E. coli*: BL21 DE3, C41 y Rosseta 2, con la finalidad de elegir aquella en la cual se obtenga la mejor expresión de la enzima. Estas cepas se han utilizado previamente para expresar este tipo de enzimas (Ko *et al.*, 2012). Después de obtener los extractos enzimáticos, como se detalla en la sección de materiales y métodos, se analizaron en un gel SDS-PAGE las fracciones solubles e insolubles, y se observó expresión solo en la cepa BL21 DE3, aunque no de manera significativa (ver Figura 7, carril EE). Como control negativo se utilizaron células de *E. coli* BL21 DE3 transformadas sin el gen clonado, aprovechando que la cepa de *E. coli* BL21 DE3 no tienen ninguna GS en su genoma. Por otro lado, en las cepas C41 y Rosseta 2 no mostraron expresión del gen ni actividad enzimática. En el caso de la cepa de expresión Rosseta 2 se considera que la baja o nula expresión se debe principalmente a la carga metabólica adicional para *E. coli.*, ya que contiene plásmidos que codifican tRNA para codones raros para *E. coli.* Para el caso de la cepa de expresión C41, al igual que Rosseta 2, se piensa que puede deberse a una carga metabólica adicional, en este caso las células contienen un plásmido (pLysS) que codifica para la lisozima T7 que suprime la expresión basal de la RNA polimerasa T7.

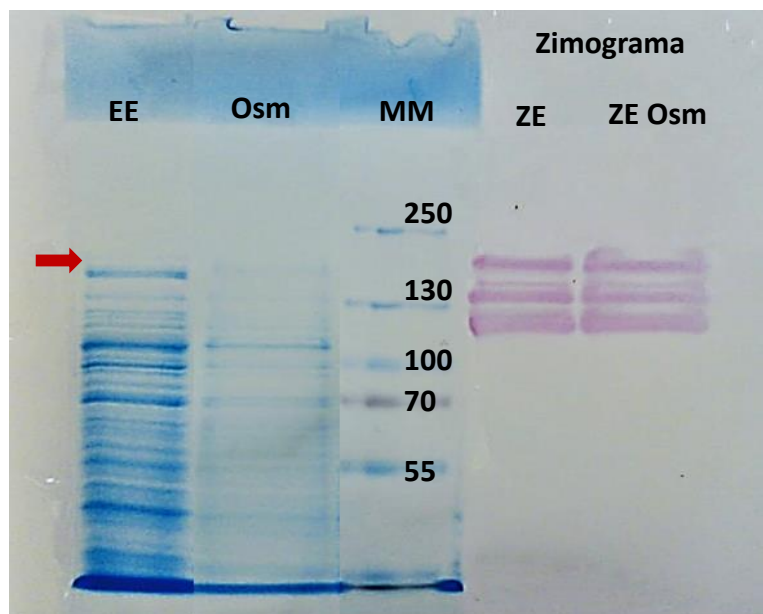
Posteriormente, se comparó el nivel de expresión en tres medios de cultivo diferentes: Luria-Bertani (LB), 2xYT y Terrific Broth (TB), siendo en este último donde se obtuvo aproximadamente el doble de expresión de la enzima con la cepa BL21 DE3 (datos no mostrados), en términos de las unidades de actividad y condiciones definidas en la Metodología. El medio TB al contener mayor cantidad de nutrientes y fuente de carbono como el glicerol, debe ayudar al mantenimiento de las células y mejorar la expresión de la proteína.

A continuación, se cuantificó la actividad enzimática total y la cantidad de proteínas producidas en 100 mL de cultivo TB con la cepa BL21 y simultáneamente se llevó a cabo la purificación parcial de la enzima por choque osmótico, ya que el vector de expresión contiene una secuencia señal *pelB* que dirige la enzima al espacio periplásmico de *E. coli.* Los resultados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Actividad enzimática obtenida en el proceso de producción y purificación parcial de la enzima Dsr\_Wcp-3a expresada en *E. coli* BL21 DE3.

Muestra	Volumen total (mL)	Actividad total (U)	Proteínas totales (mg)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento %
Extracto enzimático (EE)	15	44.66	36.52	1.22	1	100
Choque osmótico (Osm)	15	13.53	1.82	7.43	6	30

La actividad específica final de la enzima purificada parcialmente (Osm) mostró un aumento de seis veces con respecto a la actividad obtenida del extracto enzimático (EE). En la Figura 7, se observa un gel de poliacrilamida en el que se muestran las fracciones de proteína y su actividad enzimática. En el carril EE se observan de tres a cuatro bandas correspondientes a un peso molecular superior a la banda de 100 kDa del marcador molecular (PageRuler #26619) las cuales muestran actividad de acuerdo con lo que se observa en el carril ZE, correspondiente al zimograma. También se observan las fracciones de proteína purificadas parcialmente después del tratamiento por choque osmótico, se observa que tiene el mismo patrón de bandas con actividad enzimática que el extracto enzimático sin purificar (Figura 7, carril ZE osm).



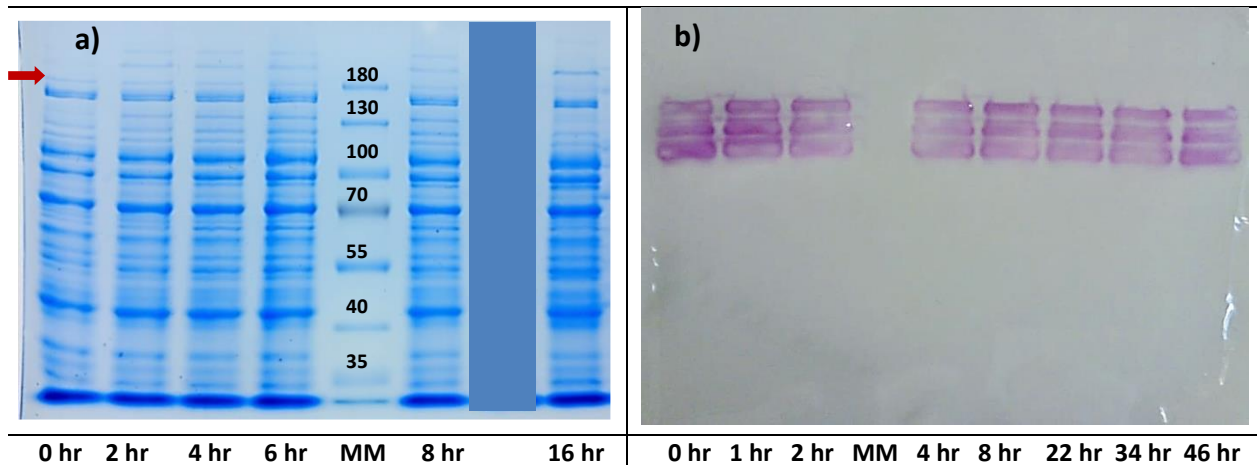
**Figura 7.** Análisis del proceso de purificación parcial de la enzima Dsr\_Wcp-3a mediante SDS-PAGE. MM marcador molecular, EE extracto enzimático, OSM proteína purificada parcialmente por choque osmótico, ZE y ZE Osm zimograma de actividad.

Teniendo el antecedente en el grupo de trabajo de una enzima GS proveniente de *L. mesenteroides* NRRL B-512F que sufre un proceso de autoproteólisis (Sánchez-González *et al.*, 1999), se decidió realizar un estudio del nivel de expresión del gen y síntesis de la

enzima Dsr\_Wcp-3a en función del tiempo de inducción (Figura 8a) así como un estudio de la estabilidad de la enzima, incubando el extracto enzimático y analizando la enzima a lo largo del tiempo de incubación (Figura 8b), esto con el fin de tener claro cómo se producen las formas de menor tamaño. Para llevar a cabo estos experimentos se decidió también cambiar el sistema de expresión empleando la cepa BL21 DE3 star<sup>TM</sup>, cuyo genotipo adicional lleva un gen mutado (*rne131*) que codifica una enzima RNasa E troncada que carece de la capacidad de degradar el ARNm, lo que resulta en un aumento de la estabilidad del ARNm sobre todo para proteínas que se consideran grandes (Waegeman y Soetaert, 2011).

Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 8, en la que se muestra que no hay un cambio considerable en el patrón de las fracciones de proteína que indicara una sobreexpresión en algún momento de la inducción durante las 16 horas del experimento (Figura 8a). Tampoco se observa una disminución de bandas derivado de proteólisis a lo largo de la inducción. La banda correspondiente al peso teórico (~180 kDa) de la enzima completa está señalada con una flecha roja.

En la Figura 8b se observa que las bandas de actividad enzimática se mantienen aun después de 40 horas, sin que se aprecie un cambio en el patrón de las fracciones que indicara proteólisis a lo largo de la incubación, por lo que se descarta un proceso proteolítico en el extracto enzimático.



**Figura 8.** Estudio del nivel de expresión del gen y síntesis la enzima Dsr\_Wcp-3a en función del tiempo de inducción analizado mediante SDS page (a) y estudio de la estabilidad de la enzima Dsr\_Wcp-3a en el extracto enzimático en función del tiempo de incubación a 28 °C mediante un zimograma (b).

Posteriormente, se cuantificó la actividad enzimática en el extracto enzimático obtenido del cultivo con la cepa BL21 DE3 star<sup>TM</sup> durante la síntesis de la enzima y durante su incubación en el estudio de estabilidad. Los resultados se muestran en la Tabla 6 y 7 respectivamente. A pesar de que se duplicó la actividad volumétrica a las 8 horas de inducción en comparación con lo obtenido con la cepa de expresión BL21 DE3 (ver Tabla 6, columna EE) sigue siendo

una actividad volumétrica baja, consecuencia de no haber una sobreexpresión de la enzima heteróloga (Figura 7 y 8). Por otro lado, no hay una pérdida de la actividad volumétrica obtenida durante el tiempo de incubación y puede concluirse que la enzima es estable a 28 °C durante 46 horas.

**Tabla 6.** Actividad enzimática obtenida del proceso de producción de la enzima Dsr\_Wcp-3a expresada en *E.coli* BL21 DE3 star™ a diferentes tiempos de inducción.

Tiempo de inducción	0 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr	16 hr	EE
Actividad U/mL de extracto enzimático	0	3.4+/- 0.11	4.9+/- 0.28	6.3+/- 0.08	8.5+/- 0.91	2.4+/- 0.73	4.3 +/- 0.83

Nota: Resultados obtenidos a partir de un volumen de cultivo de 0.5 L del cual se tomó un volumen de 50 mL para realizar el extracto enzimático para cada toma de muestra en la hora correspondiente.

**Tabla 7.** Actividad enzimática obtenida del proceso de incubación a 28 °C de la enzima Dsr\_Wcp-3a expresada en *E.coli* BL21 DE3 star™.

Tiempo de incubación	0 hr	1 hr	2 hr	4 hr	8 hr	22 hr	34 hr	46 hr
U/mL	2.66 +/-0.09	2.85 +/-0.10	2.93 +/-0.56	3.31 +/-0.00	3.30 +/-0.23	3.04 +/-0.12	2.84 +/-0.8	2.97 +/-0.3



Ante los resultados expuestos, ahora se decidió analizar la secuencia del gen de la enzima Dsr\_Wcp-3a. Primeramente, no se encontraron codones de inicio alternativos como GUG y UUG, reconocidos por el iniciador N-formilmetionina-tRNA y precedido por supuestos sitios secundarios de unión al ribosoma (Belinky *et al.*, 2017). También, se analizó el uso de codones raros para *E. coli* y se encontraron que tres de ellos (AGA, CCA, GGA) están representados más veces en el gen que codifica la enzima Dsr\_Wcp-3a a lo largo de la secuencia. Esto nos lleva a pensar que la degradación parcial observada de la enzima podría deberse al uso de codones raros, conduciendo a un final prematuro de la traducción o podría ralentizar el proceso, exponiendo la proteína a la acción de proteasas no identificadas antes del plegamiento completo de la enzima.

No obstante, antes de pensar en realizar experimentos para ocuparnos en el tema de la expresión de la proteína, se decidió con fines comparativos investigar en la literatura acerca de la expresión heteróloga de las distintas GS tomando como referencia la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org>) información que se reporta en la Tabla 8. Dentro de lo encontrado cabe mencionar que más de la mitad de las enzimas reportadas en la base de datos son nativas. También se observa que ocho enzimas han logrado ser expresadas heterológicamente en cepas de expresión comunes BL21 DE3 y BL21 DE3 star™, y solo una enzima ha sido producida vía la expresión del gen en el organismo gram positivo *L. lactis*.



Resulta interesante concluir que no existen reportes exitosos de expresión completa de una GS cuyo peso molecular se ubique por encima de 160 kDa, incluyendo en esta lista las ocho enzimas cristalizadas. Tal es el caso de las enzimas DSR-S de *L. mesenteroides* NRRL B-512F y la DSR-F de *L. mesenteroides* B/110-1-2 con 1,527 y 1528 aa y un peso molecular teórico de ~170 kDa respectivamente (Moulis *et al.*, 2006b; Fraga Vidal *et al.*, 2011). En efecto, a pesar de usar inhibidores de proteasas y sistemas de expresión como BL21 star<sup>TM</sup> y Rosseta, no se logró obtener una forma estable de la enzima DSR-S. Para resolver la problemática de expresión, Moulis y colaboradores (2006b), realizaron deleciones racionales de la región variable incluyendo las últimas cuatro repeticiones del C-terminal, ya que éstas no tienen similitud con las GS descritas. Por otro lado, mediante comparación de secuencias de aminoácidos, parece que DSR-F posee los mismos dominios que los descritos para GS. Sin embargo, la región variable es más larga que en otras GS (por 100 aminoácidos). Por lo cual, Fraga Vidal y colaboradores (2011), mediante deleciones de dicha región variable lograron obtener la expresión estable de la enzima DSR-F.

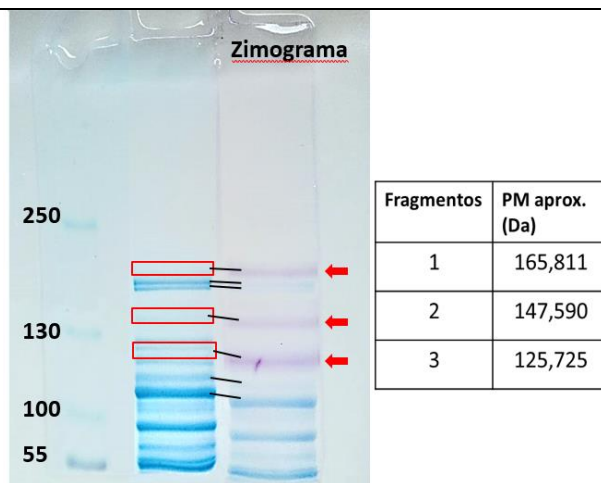
**Tabla 8.** Revisión de la integridad estructural de las enzimas GS expresadas heterológamente reportadas en la base de datos CAZY.

Cantidad de Enzimas	Cepa de expresión	Expresión heteróloga exitosa	Comentarios
9	BL21 DE3, BL21 DE3 star <sup>TM</sup> , <i>Lactococcus lactis</i> NZ9800		~160 kDa Completas
12 (están cristalizadas de forma incompleta)	BL21 DE3 y BL21 DE3 star <sup>TM</sup>		>170 kDa Versiones truncadas en la región variable

Mediante la revisión llevada a cabo, se puede inferir que existe una problemática común cuando se intenta expresar genes de GS con las características que evitan tener una expresión completa del gen. Las características se resumen en: poseer un gen que expresa una proteína de mayor tamaño al promedio (>160 kDa) y también, a contener mayor cantidad de aminoácidos en la región variable.

A pesar de los problemas para obtener una forma homogénea de la enzima se decidió llevar a cabo la producción de la enzima en la cepa BL21 DE3 star<sup>TM</sup>, ya que con la actividad obtenida (Tabla 6) es posible iniciar las reacciones y síntesis de los productos, y una caracterización parcial de la misma. Primeramente, se decidió explorar el comportamiento de las fracciones en su conjunto (extracto enzimático), con la idea de comparar su comportamiento bioquímico con las fracciones por separado. Con este objetivo se separaron las fracciones por electroforesis (Figura 9), llevando a cabo reacciones con cada fracción, para

posteriormente comparar la especificidad de reacción (ver apartado 6.6 “Especificidad de productos”). Con las fracciones aisladas se realizó también una exploración de la estructura de la proteína en los tres fragmentos observados, empleando para ello Espectrometría de Masas de alta resolución (LC-MS/MS). La intención de este experimento era acercarnos a definir vía un multialineamiento de secuencias (ver Anexo A) el probable inicio y término de cada una de las fracciones de la proteína (Figura 10).



**Figura 9.** SDS-page y Zimograma de actividad de las formas en que se produce Dsr\_Wcp-3a empleadas en el proyecto. MM marcador molecular, EE extracto enzimático, ZE zimograma de actividad. El gel se dejó corriendo hasta que la banda de 55 kDa del MM quede en la parte inferior del gel.

En la Figura 10 se puede observar un esquema del análisis obtenido de la secuenciación de las proteínas presentes en los 3 fragmentos. Primeramente, se puede apreciar un patrón ya que los fragmentos se van acortando por el N- terminal. Sin embargo, en el fragmento 3 se detectó un péptido más cerca del N-terminal, en una región que ya no aparece en el fragmento 2; no obstante, ese péptido podría ser un falso positivo por lo que se prosiguió a tomar el siguiente péptido para efectos del estudio. En efecto, se observa que hay un corte mayor por el N-terminal para el fragmento 3'. Sin embargo, podría suceder también que el fragmento 3 se originara directamente de un corte en el fragmento 1; pero de ser así, el fragmento 3 debería tener un peso molecular mayor que el fragmento 2 y se observaría entre los fragmentos 1 y 2 en el gel SDS-PAGE (Figura 9). En resumen, hubo acortamiento por el N-terminal de 71 aa, 208 aa, y 353 aa, para los fragmentos 1, 2 y 3' respectivamente. Muy probablemente sea por este extremo (N-terminal) que ocurre ya sea la proteólisis o bien la síntesis incompleta de la proteína. Cualquiera que fuere el motivo de esta eliminación de aminoácidos en la proteína, bajo todas las condiciones de producción que se exploraron en el proyecto, se obtienen siempre los 3 fragmentos observado en la Figura 9.

Es interesante señalar también que por el extremo C-terminal pareciera no haber una reducción entre los fragmentos, aunque sí, un contundente corte de alrededor de 350 aa en los tres casos. Esto podría atribuirse a dificultades para la detección de péptidos de esta región, ya que la especificidad de la digestión con tripsina depende de encontrar los aminoácidos Lys o Arg, y en la región final del C-terminal pueden surgir péptidos de tal longitud que no puedan ser secuenciados. No se puede descartar que el mismo problema podría estar ocurriendo en el extremo N-terminal a pesar de que haya contundencia de corte y reducción del tamaño de la banda.

Por otro lado, cabe destacar que cada acortamiento se encuentra dentro de la región V (color rojo en la Figura 10) tanto del N-terminal como del C-terminal por lo que se sigue manteniendo intacta el segmento que incluye el dominio catalítico.

PS	V	IV	B	A	C	A	B	IV	V	Banda	PM en Da calculado de la secuenciación	% kDa	PM en Da teórico del gel SDS-PAGE	% kDa
37	185	166	136	62	241	142	134	92	32	223	209	0	180,000	
71	1239								349	1	136,290	75.56	165,811	92.12
208	1102								349	2	121,220	67.33	147,590	81.99
114	1180								365	3	129,800	72.11	-	-
353	941								365	3'	103,510	57.51	125,725	69.85

**Figura 10.** Análisis comparativo de los fragmentos 1, 2, 3 conteniendo información derivada de la secuenciación de péptidos de las tres fracciones por LC-MS/MS. Mismos colores que la Figura 2 para la proteína original.

## 6.2 Cinética de formación de polímero

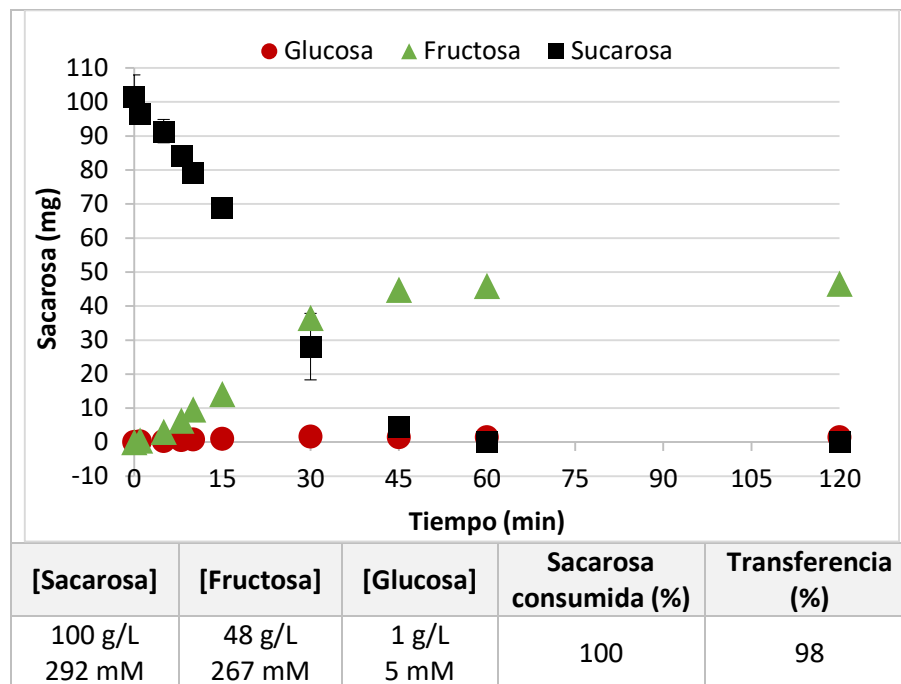
Con el extracto enzimático obtenido se decidió realizar la síntesis del polisacárido. En un primer ensayo, se llevaron a cabo reacciones empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa (292 mM), con 2 U/mL de Dsr\_Wcp-3a (refiriéndonos de aquí en adelante al extracto enzimático que contiene 3 fragmentos de la enzima), a una temperatura de 30°C de reacción y un pH 6.0 utilizando buffer de acetatos 50 mM. Se midieron las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa al inicio, durante y al final de las reacciones, siguiendo la evolución de la reacción durante 3 horas. Las reacciones fueron analizadas por HPLC (Figura 11), determinando la conversión de sacarosa.

Por otro lado, la glucosa incorporada a polímero, es decir la eficiencia de la reacción de transferencia, se obtuvo de la siguiente de forma:

$$T_{\%} = \frac{S_i - S_r - G_f}{S_i} \times 100$$

Donde  $S_i$  es la sacarosa inicial,  $S_r$  es la sacarosa residual,  $G_f$  es la glucosa libre, que corresponde a la sacarosa que fue hidrolizada cuando todo se expresa en concentración molar.

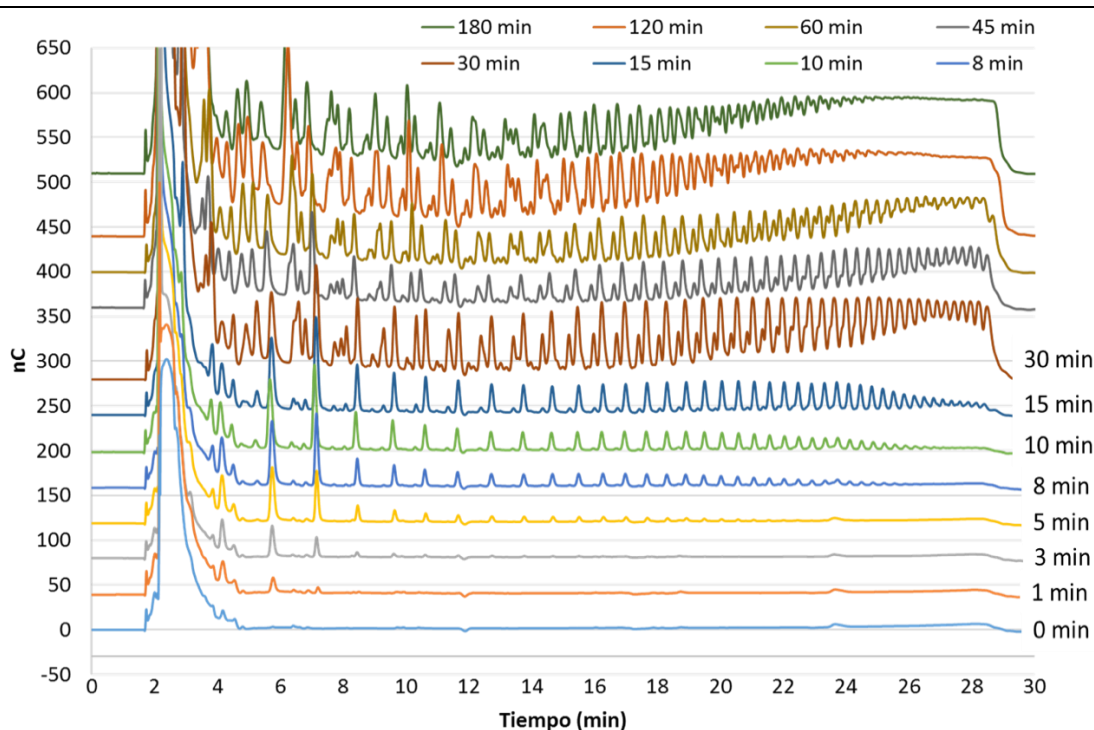
La cuantificación de los monosacáridos presentes después del consumo total de sacarosa reveló menos del 2% de glucosa libre, lo que indica que la enzima Dsr\_Wcp-3a exhibe principalmente actividad transferasa (Figura 11), lo que representa una ventaja al no afectar el rendimiento del producto hidrolizando el sustrato.



**Figura 11.** Evolución de una reacción de síntesis de dextrana empleando 2 U/mL de Dsr\_Wcp-3a, a 30 °C, pH 6, buffer de acetatos 50 mM y una concentración de 100 g/L de sacarosa. El consumo de sacarosa y aparición de glucosa y fructosa se cuantificó por HPLC. A partir de los datos finales se evaluó la eficiencia de la reacción de transferencia.

En el cromatograma de HPAEC-PAD (Figura 12) se pueden apreciar dos etapas de la reacción. En la primera de ellas, los gluco-oligosacáridos producidos hasta los 15 minutos de reacción, corresponden a una serie constituida por un solo gluco-oligosacárido de glucosa en un mecanismo no procesivo, ya que su tamaño y su concentración van aumentando regularmente con el tiempo. El mecanismo es no procesivo, ya que se sintetizan muy posiblemente a partir de sacarosa y su peso molecular se incrementa unidad por unidad sin que ningún intermediario se acumule. Por otro lado, una segunda etapa se inicia a partir de los 30 minutos de reacción, en la que se observa una serie adicional a la primera, agregando

otro gluco-oligosacárido que eluye primero que los que se venían formando desde el inicio de la reacción. Es importante señalar que existen productos adicionales en menor proporción a las dos series señaladas, particularmente en los tiempos iniciales de reacción (gluco-oligosacáridos de menor tamaño). En resumen, el mecanismo de la reacción en términos de especificidad tiene dos etapas, una inicial, que se ve complementada por otra a partir de 30 minutos, dando lugar a dos series de gluco-oligosacáridos. A los 120 minutos de reacción se observa una gama de productos. Pero predominantemente constituidas por los gluco-oligosacáridos de las dos series de glucana que se manifiestan durante la primera media hora de reacción. Como se demostrará más adelante, este cambio en la especificidad de la reacción no puede ser explicado de otra forma que por la aparición en la reacción de azúcares “aceptores” provenientes de la propia reacción.

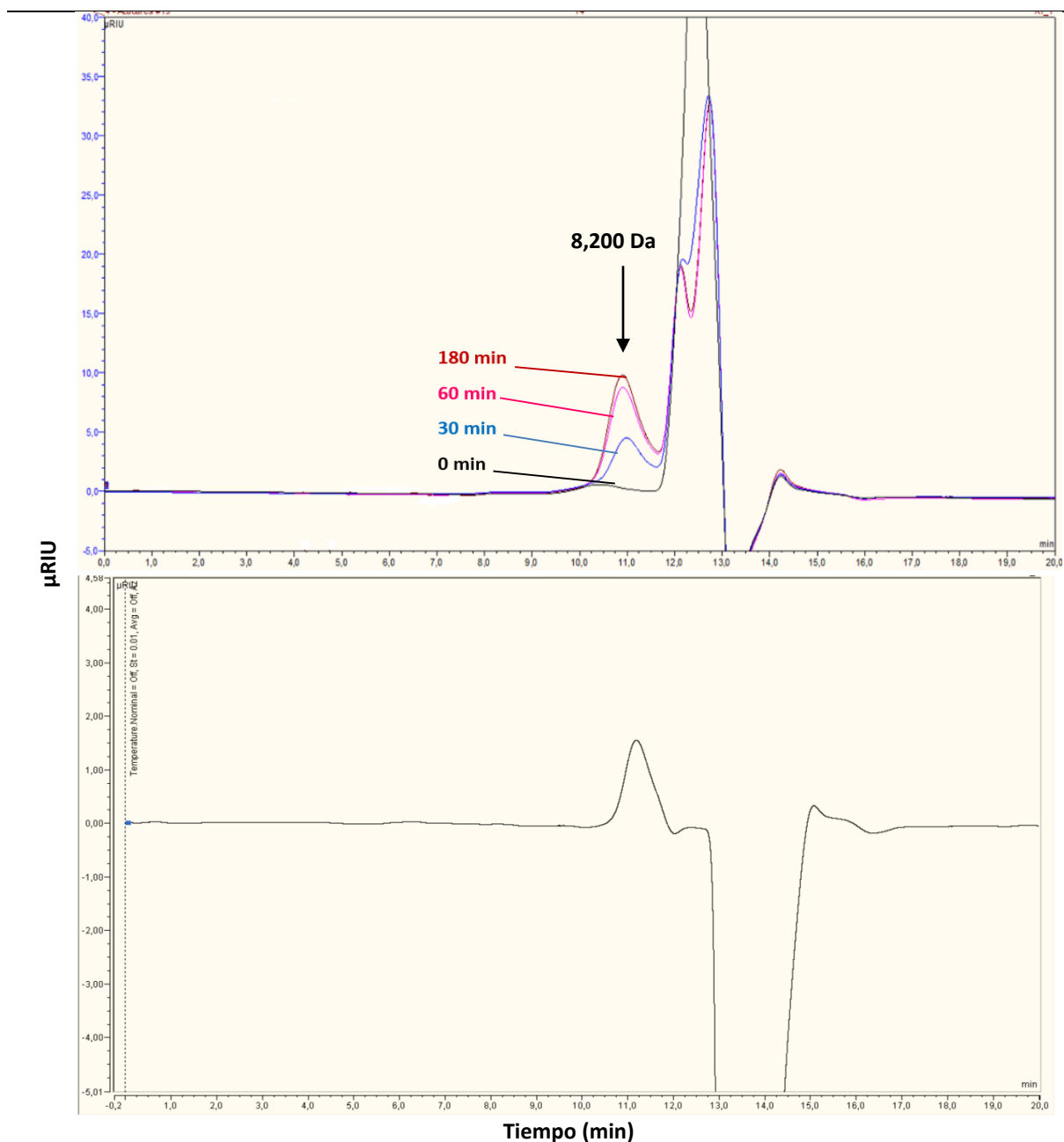


**Figura 12.** Evolución de la síntesis de gluco-oligosacáridos de la reacción catalizada por Dsr\_Wcp-3a, a 30°C, pH 6 en buffer de acetatos 50 mM y 100 g/L de sacarosa, mostrada en cromatogramas de HPAEC-PAD.

### 6.3 Producción del polisacárido

En lo que respecta a la dextrana, el otro producto de la reacción, en el cromatograma de la Figura 13 (panel superior) se observa su evolución durante la reacción, así como un peso molecular promedio de 8,200 Da llamando la atención por ser relativamente bajo con respecto a los tamaños característicos de las dextranas de bacterias lácticas. Para calcular dicho peso molecular se utilizaron estándares comerciales de dextrana (Polymer Standards

Service-USA, Inc.) con pesos moleculares de 11,600 Da, 5,200 Da, 48,600 Da y una dextrana de 38,000 Da (Sigma Aldrich), estableciéndose una curva estándar en función del tamaño y el tiempo de elución de cada estándar. También se utilizó el estándar de dextrana con peso molecular de 5,200 Da para realizar una curva estándar con diferente concentración del mismo polisacárido y poder estimar así el porcentaje de síntesis de polímero, comparado con los gluco-oligosacáridos (Tabla 9).



**Figura 13.** Evolución de la síntesis de dextrana durante la reacción medida mediante HPLC-GPC. (Panel superior) polímero a los tiempos de reacción 0, 30, 60 y 180 min; dextrana purificada (Panel inferior)

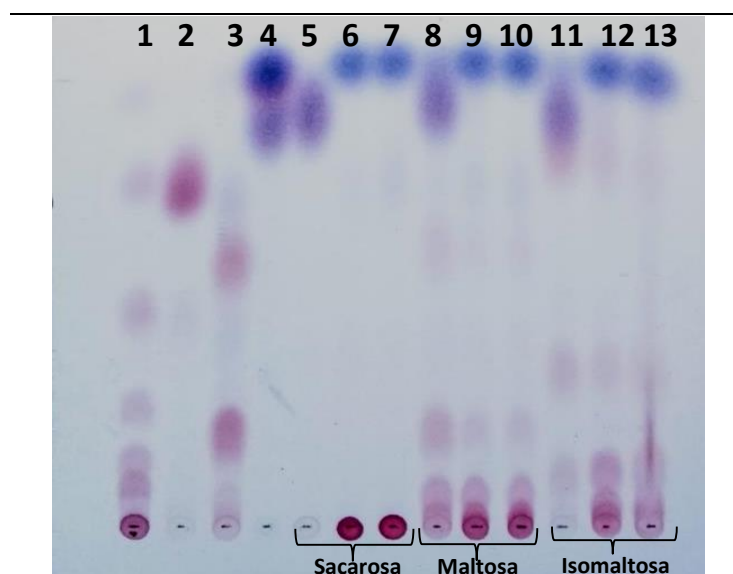
**Tabla 9.** Rendimiento de los productos de síntesis de Dsr\_Wcp-3a en presencia de 100 g/L de sacarosa.

Glucosa	Fructosa (g/L)	Sacarosa (g/L)	Polímero (g/L)	GOS (g/L)
1	47.5	0	38.11	13.3

Se procedió a purificar la dextrana mediante precipitación con etanol con el fin de llevar a cabo su caracterización (ver apartado 6.5 Caracterización del polisacárido). En el cromatograma de la Figura 13 (panel inferior) se observa solo el pico correspondiente a la dextrana purificada.

#### 6.4 Producción de gluco-oligosacáridos

Con el fin de modular la producción de gluco-oligosacáridos sintetizados por la enzima Dsr\_Wcp-3a, se decidió llevar a cabo un estudio cualitativo de la síntesis de GOS, realizando una serie de reacciones de síntesis utilizando los siguientes aceptores: una mezcla de isomaltosa e isomaltotriosa, o maltosa. En un primer ensayo, se llevaron a cabo reacciones empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa (292 mM) con relaciones 1:2 de una mezcla de isomaltosa e isomaltotriosa, o maltosa como aceptores, empleando 2 U/mL de Dsr\_Wcp-3a, y siguiendo la evolución de la reacción durante 2 hr. Las reacciones fueron analizadas por TLC y HPAEC-PAD (Figura 14 y 15).



**Figura 14.** Detección de los gluco-oligosacáridos por Cromatografía de capa fina (TLC) sintetizados en las reacciones con aceptor maltosa y una mezcla de isomaltosa e isomaltotriosa. Carril 1 maltodextrinas, carril 2 maltosa, carril 3 isomaltosa e isomaltotriosa, carril 4 fructosa, glucosa y sacarosa, carril 5, 6 y 7 reacción sin aceptor tiempos 0, 30 y 180 min, carril 8, 9 y 10 reacción con aceptor maltosa tiempos 0, 15 y 180 min respectivamente, carril 11, 12 y 13 reacción con aceptor de una mezcla de isomaltosa e isomaltotriosa tiempos 0, 15 y 180 min respectivamente.

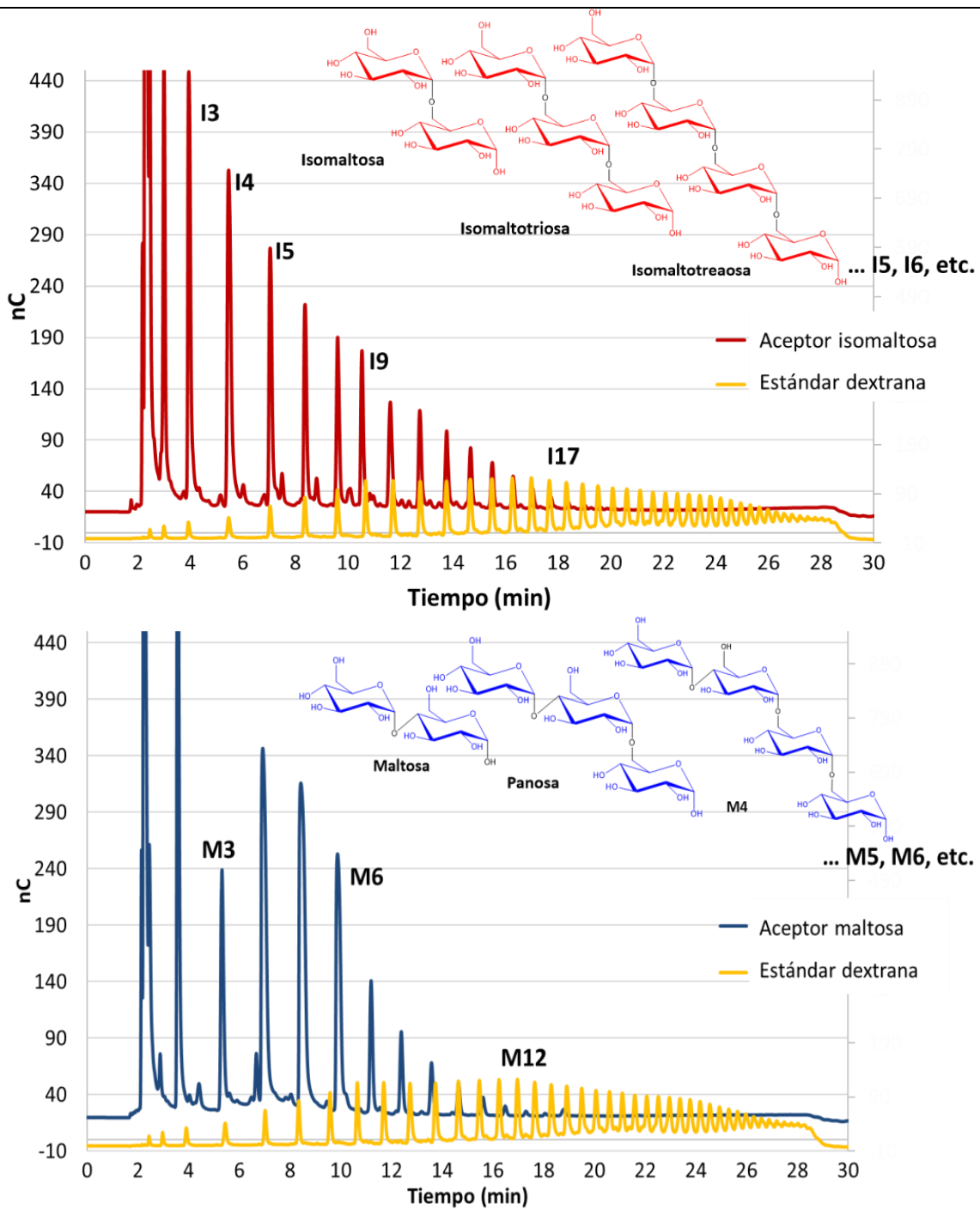
En la Figura 14 se puede observar la producción de gluco-oligosacáridos. En la TLC apenas se logran separar dichos gluco-oligosacáridos pero es suficiente para mostrar diferencias al comparar la reacción de aceptor con la que solo contiene sacarosa (carriles 6 y 7), en la cual solo se produce polímero, que no migra en la placa. Para cada reacción se consume la sacarosa, se libera fructosa (mancha azul en la parte superior) y no se observa glucosa, que aparecería como una mancha rosada, lo que implica que no hay hidrólisis de la sacarosa. Los productos de las reacciones se analizaron con mayor detalle vía HPAEC-PAD (Figura 15).

Para la reacción del aceptor de la mezcla de isomaltosa e isomaltotriosa se obtiene un perfil similar al estándar comercial (Polymer Standards Service-USA, Inc.) con peso molecular de 5,200 Da. Cada pico corresponde a un grado de polimerización creciente en un residuo de glucosa con enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-6). Es de suponer que de esta reacción de aceptor se obtienen isomalto-oligosacáridos (IMOS) (Figura 15, panel superior).

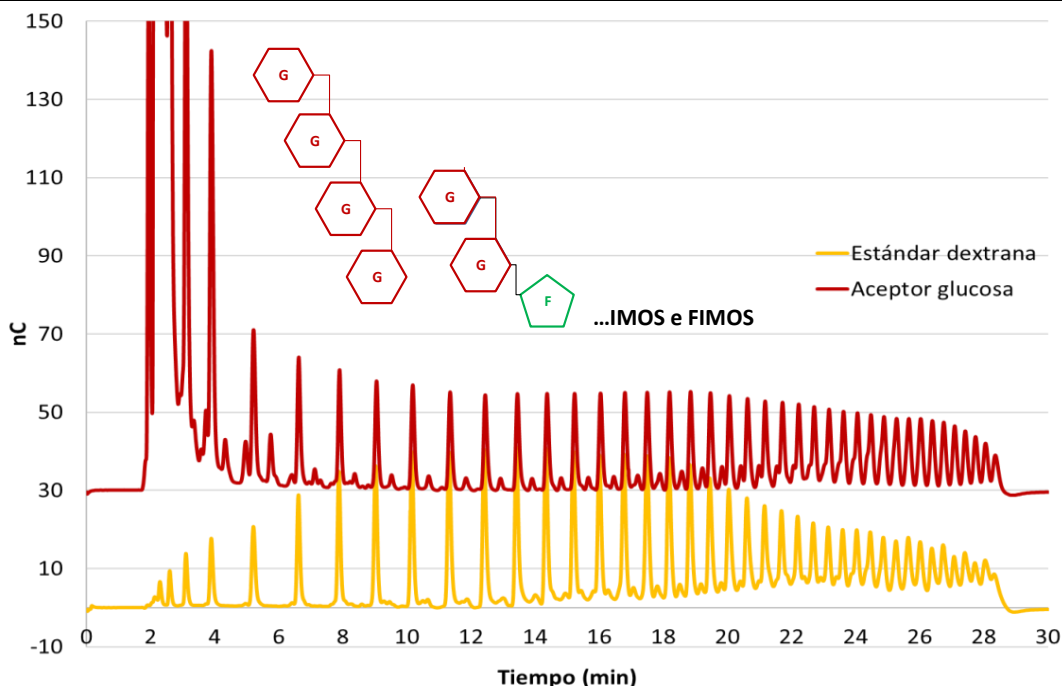
De la reacción con el aceptor maltosa se obtiene un perfil distinto, donde ninguno de los picos obtenidos empata con el estándar, lo que se explica debido a que la maltosa tiene un enlace glucosídico  $\alpha$ -(1-4) y posteriormente, los residuos de glucosa en  $\alpha$ -(1-6), que se agreguen, se irán agregando uno a uno de forma no procesiva, como lo muestra la Figura 15, panel inferior. Es probable que de esta reacción de aceptor se obtengan malto-oligosacáridos (MOS).

Se observó una distribución de DP3 - DP17 de IMOS que fueron producidos usando isomaltosa e isomaltotriosa como molécula aceptora para la reacción del aceptor. En el caso del aceptor maltosa se observó una distribución de DP3 - DP12 de MOS producidos. Estos aceptores han sido identificados como los aceptores más fuertes de las reacciones de aceptor de las GS (Hu *et al.*, 2017; Bivolarski *et al.*, 2018). Se observa para estos aceptores la tendencia de cada producto de síntesis siguiente a ser menos preferible para aceptar unidades de glucosa (Figura 15), no así cuando se utiliza glucosa como aceptor donde se puede observar una distribución de alrededor de DP30 (Figura 16). Para esta última reacción de aceptor con glucosa, se corrobora que las glucanas sintetizadas van creciendo a partir de unidades de glucosa. También, se observa en la Figura 16 una segunda serie que pudiera deberse a que la sacarosa esté actuando como molécula iniciadora, por lo cual se tendría un grupo fructosilo en un extremo de la glucana. Es probable que de esta reacción de aceptor se obtengan IMOS e isomalto-oligosacáridos con un grupo fructosilo en un extremo (FIMOS).





**Figura 15.** Detección de la formación de IMOS y MOS por HPAEC-PAD de las reacciones con aceptor. Panel superior) reacción con el aceptor de una mezcla de isomaltosa e isomaltotriosa (ISO); Panel inferior) reacción con el aceptor maltosa (MAL). En color azul corresponde al perfil de la reacción con aceptor al tiempo final (180 min) y en color amarillo corresponde al perfil de un estándar comercial de dextransa de 5,200 Da.



**Figura 16.** Detección de la formación de IMOS y FIMOS por HPAEC-PAD de la reacción con aceptor glucosa. En color rojo corresponde al perfil de la reacción con aceptor al tiempo final (180 min) y en color amarillo corresponde al perfil de un estándar comercial de dextrana de 5,200 Da.

Desde hace tiempo se ha estudiado este tipo de reacción de transferencia con la finalidad de modular las propiedades productivas de las GS. La reacción de transferencia de las GS produce polisacáridos u oligosacáridos dependiendo del tipo y concentración de carbohidratos aceptores. La actividad GS en presencia de sacarosa solo produce predominantemente polímero de glucana. Sin embargo, la enzima Dsr\_Wcp-3a produce una cantidad importante de gluco-oligosacáridos a partir de sacarosa (Figura 12 y Tabla 9). Por otro lado, tal y como se observa en la Figura 15 y 16 al añadir carbohidratos aceptores adecuados desplazan la reacción a gluco-oligosacáridos, por consiguiente, la glucosa, los disacáridos y trisacáridos con enlaces  $\alpha$  glucosídicos son aceptores adecuados para la enzima Dsr\_Wcp-3a.

### 6.5 Caracterización del polisacárido

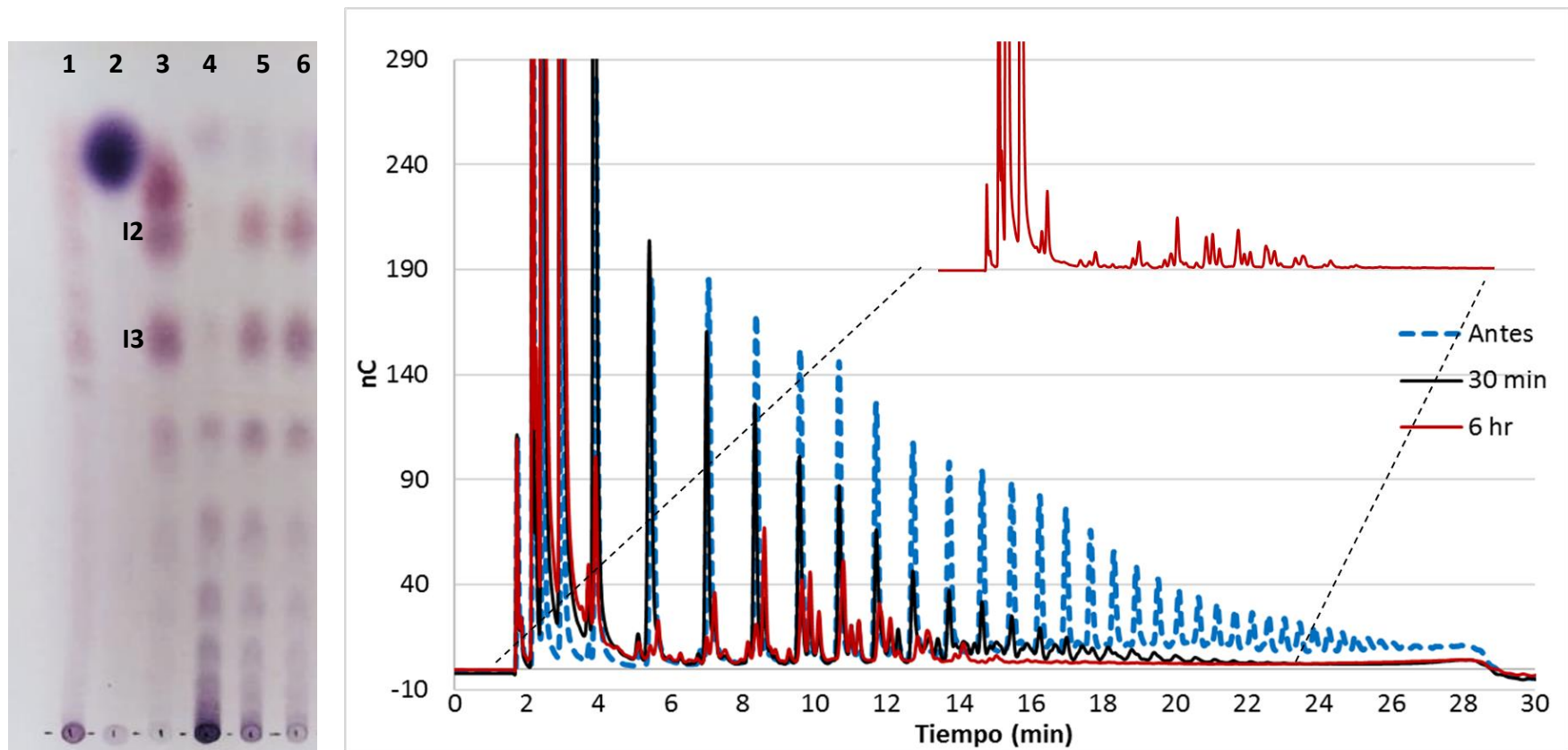
Para la caracterización del producto (GOS y polisacárido), se utilizó una enzima dextranasa (Enzimas y Productos Químicos SA de CV) la cual hidroliza los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-6) del polímero tipo dextrana. La reacción de hidrólisis del polímero se llevó a cabo a 30°C, pH 6 en buffer de acetatos 50 mM utilizando 1  $\mu$ L de dextranasa por mL de reacción, siguiendo la evolución de la reacción hasta que no se observó cambio en el perfil de hidrólisis en análisis por TLC y HPAEC-PAD (Figura 17, 18, 19). La dextranasa actúa mediante un mecanismo exo- por lo que se espera la reducción de las cadenas de forma secuencial. Como control se trató

con las mismas condiciones a una dextrana producida en el grupo de trabajo con un peso molecular de 5,000 Da.

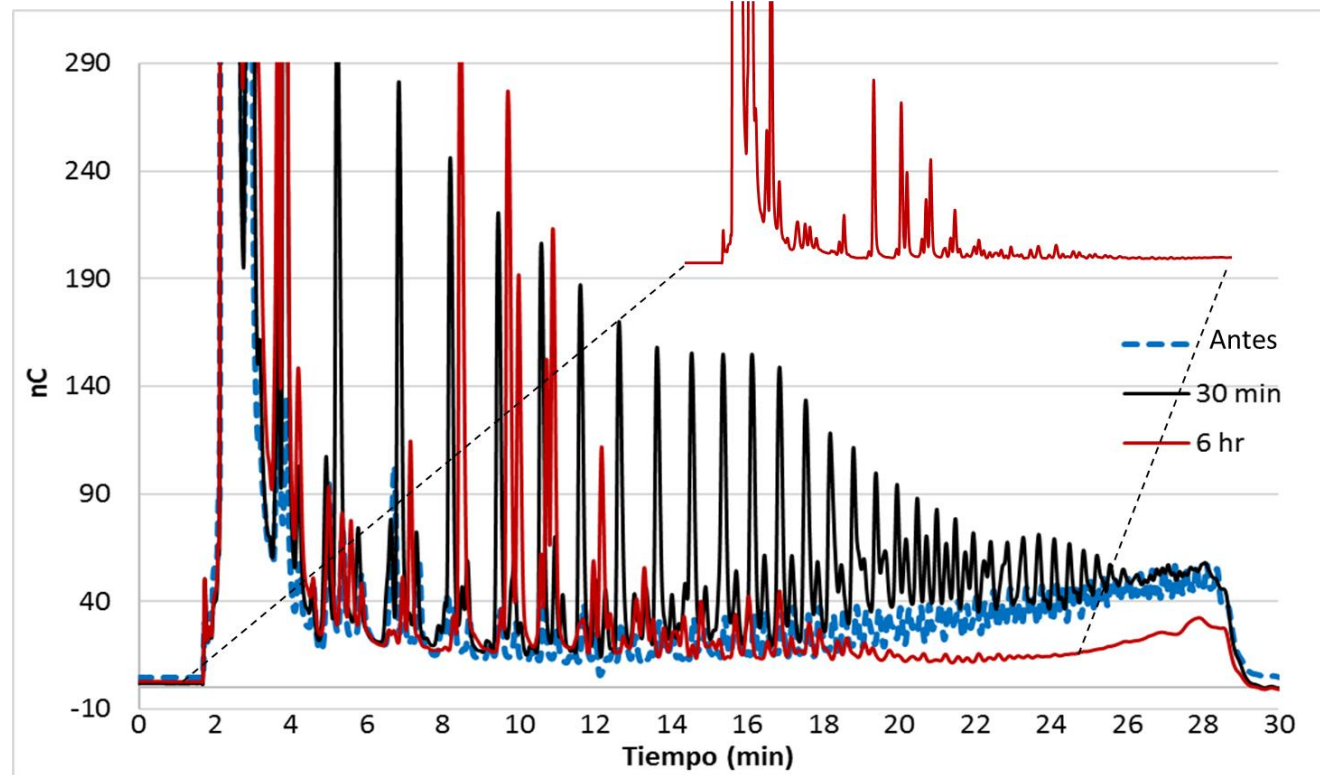
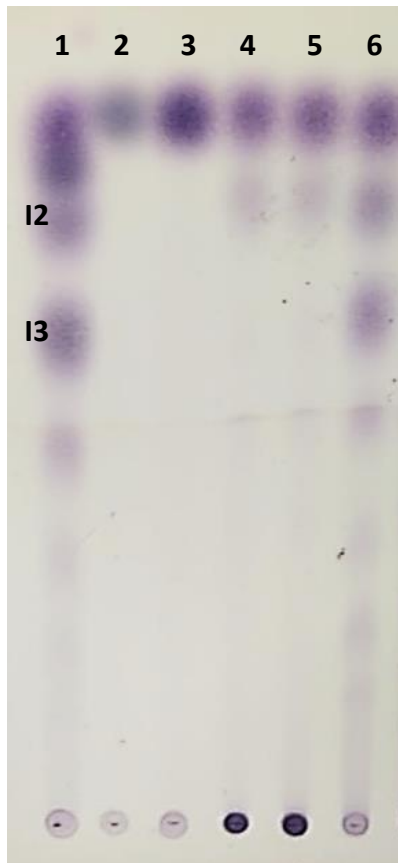
En la Figura 17 se observa la hidrólisis de la dextrana control, mientras que en la TLC se aprecia que desde antes de la reacción (carril 4) hay IMOS presentes y conforme avanza la reacción van desapareciendo, concentrándose a la altura de la isomaltosa (I2) e isomaltotriosa (I3). Se observa también que la mancha del polímero que se ubica en el punto de aplicación desaparece a las seis horas. En el cromatograma del HPAEC-PAD se puede apreciar cómo se va “rasurando” la dextrana e IMOS de todo tamaño, hasta llegar a trisacáridos, disacáridos y monosacáridos (glucosa), así como una serie de tres picos pequeños entre el tiempo de retención 5 y 14 min, que podrían tener enlaces que la dextranasa no puede hidrolizar.

En la Figura 18 se observa ahora la hidrólisis del polímero sintetizado por la enzima Dsr\_Wcp-3a. En la TLC se aprecia que es también degradada por la dextranasa, ya que desaparece el polímero en el punto de aplicación de la muestra (carriles 4 y 5) a las seis horas de reacción, concentrándose las señales a la altura de la isomaltosa (I2) e isomaltotriosa (I3). En el cromatograma del HPAEC-PAD se observa que el polímero antes de la reacción no muestra compuestos de bajo peso molecular. Sin embargo, a los 30 min de reacción se empiezan a observar señales de los gluco-oligosacáridos “rasurados” hasta llegar a un patrón similar al control de una serie de tres y cuatro picos entre el tiempo de retención 4 y 18 min.

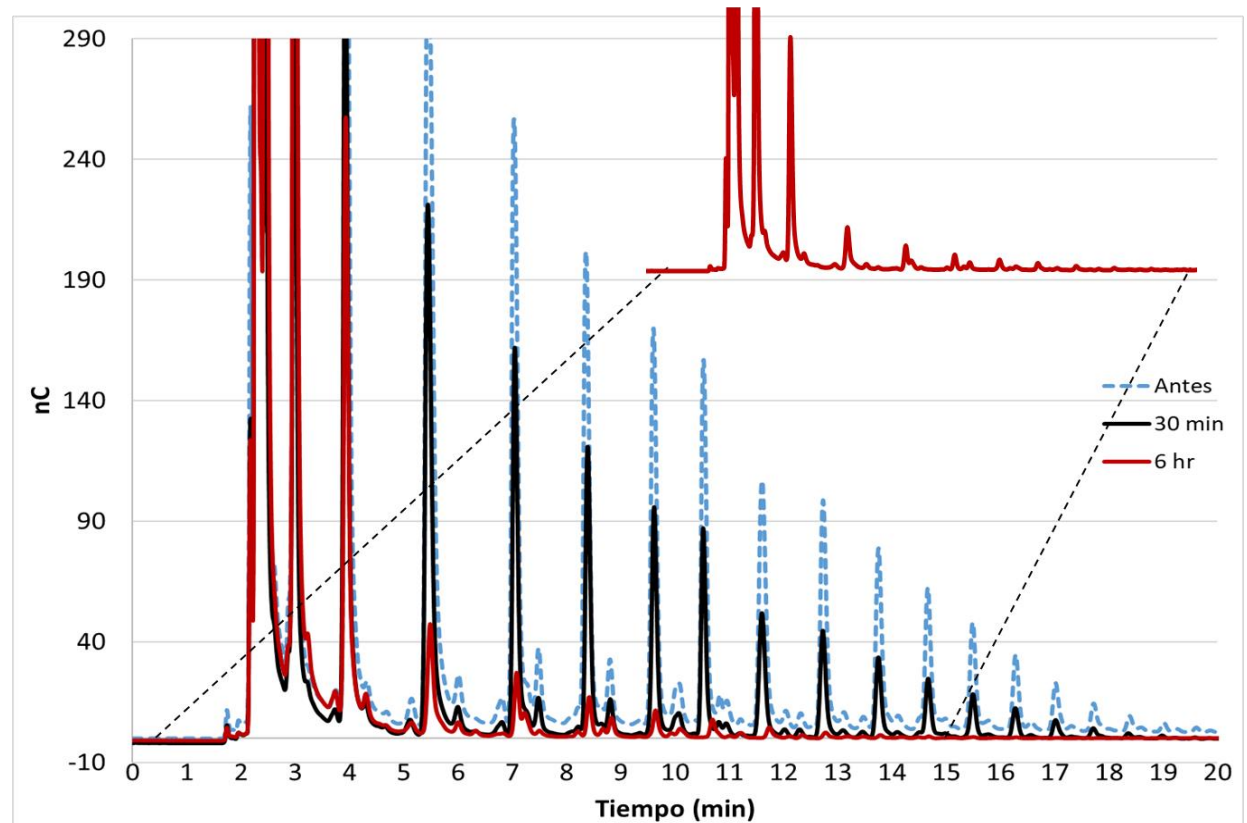
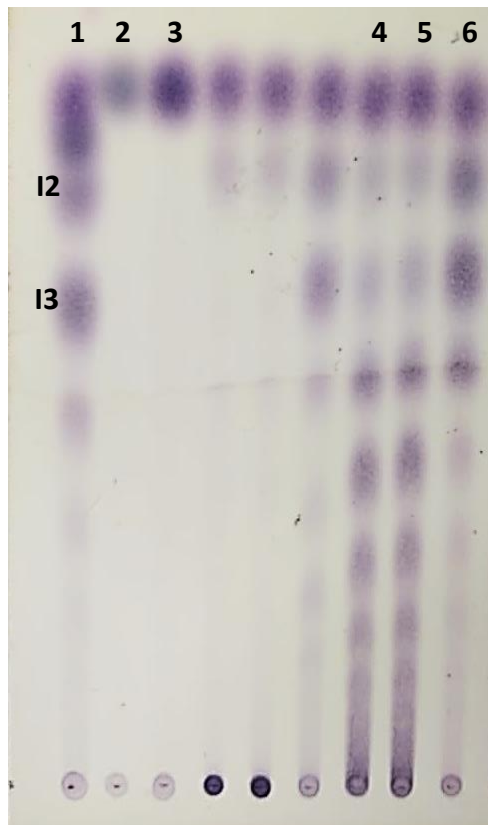
En la Figura 19 se observa la hidrólisis de los IMOS producidos en la reacción del aceptor, en la TLC se obtiene algo muy similar con el control, donde desaparecen los IMOS y la mancha del punto de aplicación, concentrándose a la altura de la isomaltosa (I2) e isomaltotriosa (I3). En el cromatograma del HPAEC-PAD se aprecia que el “rasurado” es casi total, confirmando que los isomalto-oligosacáridos producidos están compuestos exclusivamente de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-6).



**Figura 17.** Reacción de hidrólisis del control de dextrana de 5,000 Da con dextranasa. Panel izquierdo) Cromatografía de capa fina, carril 1 maltodextrinas, carril 2 fructosa, glucosa y sacarosa, carril 3 maltosa, isomaltosa e isomaltotriosa, carril 4 polímero antes de ser degradado, carril 5 y 6 tiempo de reacción a los 30 y 180 min respectivamente; Panel derecho) Cromatograma en HPAEC-PAD, en azul corresponde al perfil antes de la reacción, en negro y rojo corresponde al perfil a los 30 y 360 min de reacción respectivamente.



**Figura 18.** Reacción de hidrólisis del polímero (sintetizado por Dsr\_Wcp-3a) con dextranasa. Panel izquierdo) Cromatografía de capa fina, carril 1 fructosa, maltosa, isomaltosa e isomaltotriosa, carril 2 glucosa, carril 3 sacarosa, carril 4 polímero antes de ser degradado, carril 5 y 6 tiempo de reacción a los 0 y 360 min respectivamente; Panel derecho) Cromatograma en HPAEC-PAD, en azul corresponde al perfil antes de la reacción, en negro y rojo corresponde al perfil a los 5 y 360 min de reacción respectivamente.



**Figura 19.** Reacción de hidrólisis de los IMOS (producidos en la reacción del aceptor) con dextranasa. Panel izquierdo) Cromatografía de capa fina, carril 1 fructosa, maltosa, isomaltosa e isomaltotriosa, carril 2 glucosa, carril 3 sacarosa, carril 4 IMOS antes de ser degradado, carril 5 y 6 tiempo de reacción a los 0 y 360 min respectivamente; Panel derecho) Cromatograma en HPAEC-PAD, en azul corresponde al perfil antes de la reacción, en negro y rojo corresponde al perfil a los 30 y 360 min de reacción respectivamente.

Por lo mostrado en el perfil de la reacción de hidrólisis a las 6 horas del polímero, habiéndose quedado picos de gluco-oligosacáridos sin degradar y por los antecedentes que se tienen de los trabajos realizados por Moulis y colaboradores (2006b) y por Claverie y colaboradores (2017), donde sugieren que la sacarosa puede actuar como molécula iniciadora de la cadena creciente que se glucosila a través de la formación de los enlaces  $\alpha$ -(1-6), en consecuencia, se obtendrían cadenas con fructosa terminal en vez de glucosa terminal. Y esto se puede detectar sobre todo a tiempos tempranos de reacción, por lo que se decidió realizar un monitoreo de la reacción en tiempos cortos (Figura 12). En el cromatograma de HPAEC-PAD se puede apreciar los gluco-oligosacáridos producidos hasta el tiempo de 15 min con series de un solo pico, los cuales muy posiblemente sean FIMOS. A partir del tiempo 30 min de reacción se observan series de dos picos uno de los cuales permaneció creciendo de la serie anterior y el segundo pico apareció a la izquierda del primero. De los resultados vistos se decidió tomar los tiempos de reacción a los 10 y 30 minutos para tratarlos con una enzima invertasa.

Después de la incubación a 40 °C, agitación constante con la invertasa (Maxinvert 200,000) a 17 U/mL durante 48 hr, los picos muestran el mismo perfil que la dextrana comercial (Figura 20), confirmando la hipótesis de que la sacarosa actúa como iniciador y además de que se demostró en los experimentos anteriores la eficiente digestión con dextranasa. Sin embargo, como se describe en la sección 2.1.4 “Productos: polisacáridos y gluco-oligosacáridos” la dextrana puede estar conformada por ramificaciones, principalmente enlaces ramificados  $\alpha$ -(1-3), y muy probablemente los picos remanentes hasta las seis horas de reacción de hidrólisis tanto en la dextrana control y la dextrana producida por la enzima Dsr\_Wcp-3a sean picos correspondientes a glucanas con fructosa terminal y/o glucanas con ramificaciones.

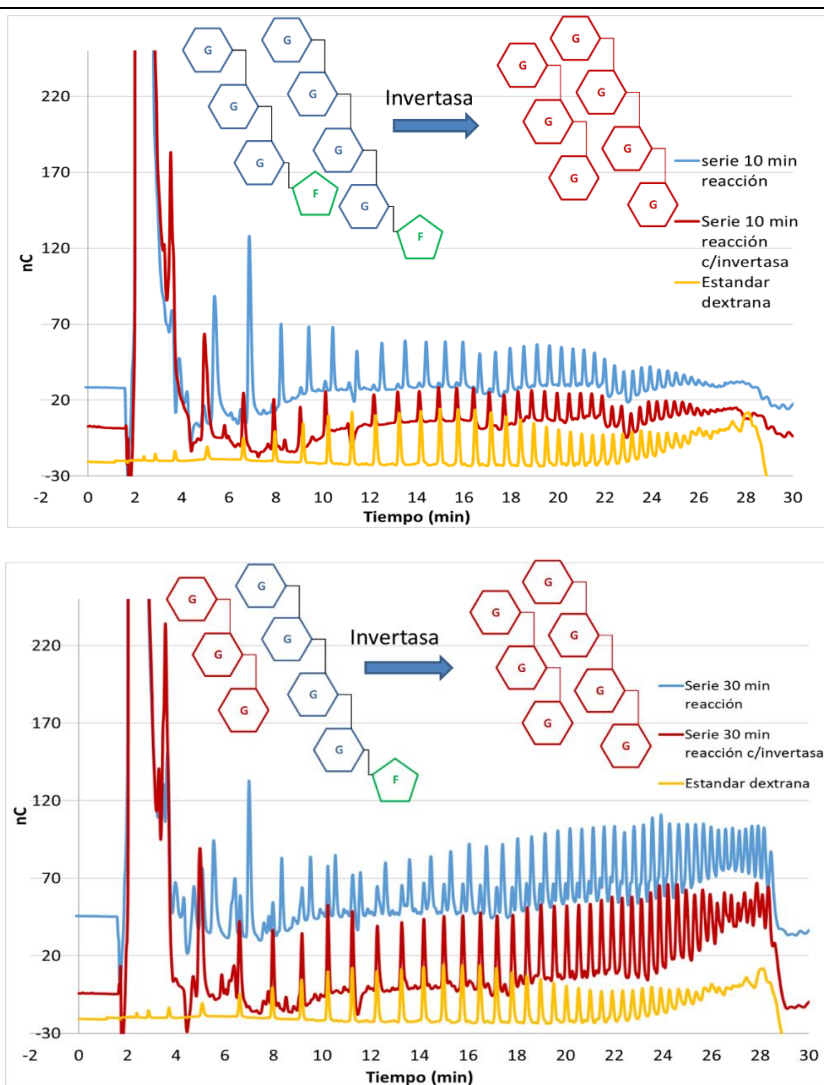
Para confirmar y completar el estudio de la estructura de la dextrana producida por la enzima Dsr\_Wcp-3a se hicieron análisis por resonancia magnética nuclear. Se utilizaron técnicas de 1D RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y 2D homo- (COSY, TOCSY y NOESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC). Se utilizó una dextrana de estructura conocida para ayudar con la asignación de las características estructurales, específicamente la dextrana comercial de *L. mesenteroides* B-512F. Las asignaciones individuales derivadas del análisis de RMN se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  de las dextranas de Dsr\_Wcp-3a y B-512F.

Muestra	H1( $\alpha$ -1-6) C1	H1( $\alpha$ -1-3)	H1?	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6, H6'/C6
Dsr_Wcp-3a	5.00/ 97.90	5.35/ -	5.45/ -	3.60/ 71.57	3.74/ 73.59	3.54/ 69.72	3.93/ 70.37	4.00, 3.77/ 65.72
B-512F	5.01/ 97.88	5.35/ -	5.27/ -	3.60/ 71.60	3.74/ 73.60	3.54/ 69.74	3.94/ 70.37	4.01, 3.79/ 65.73

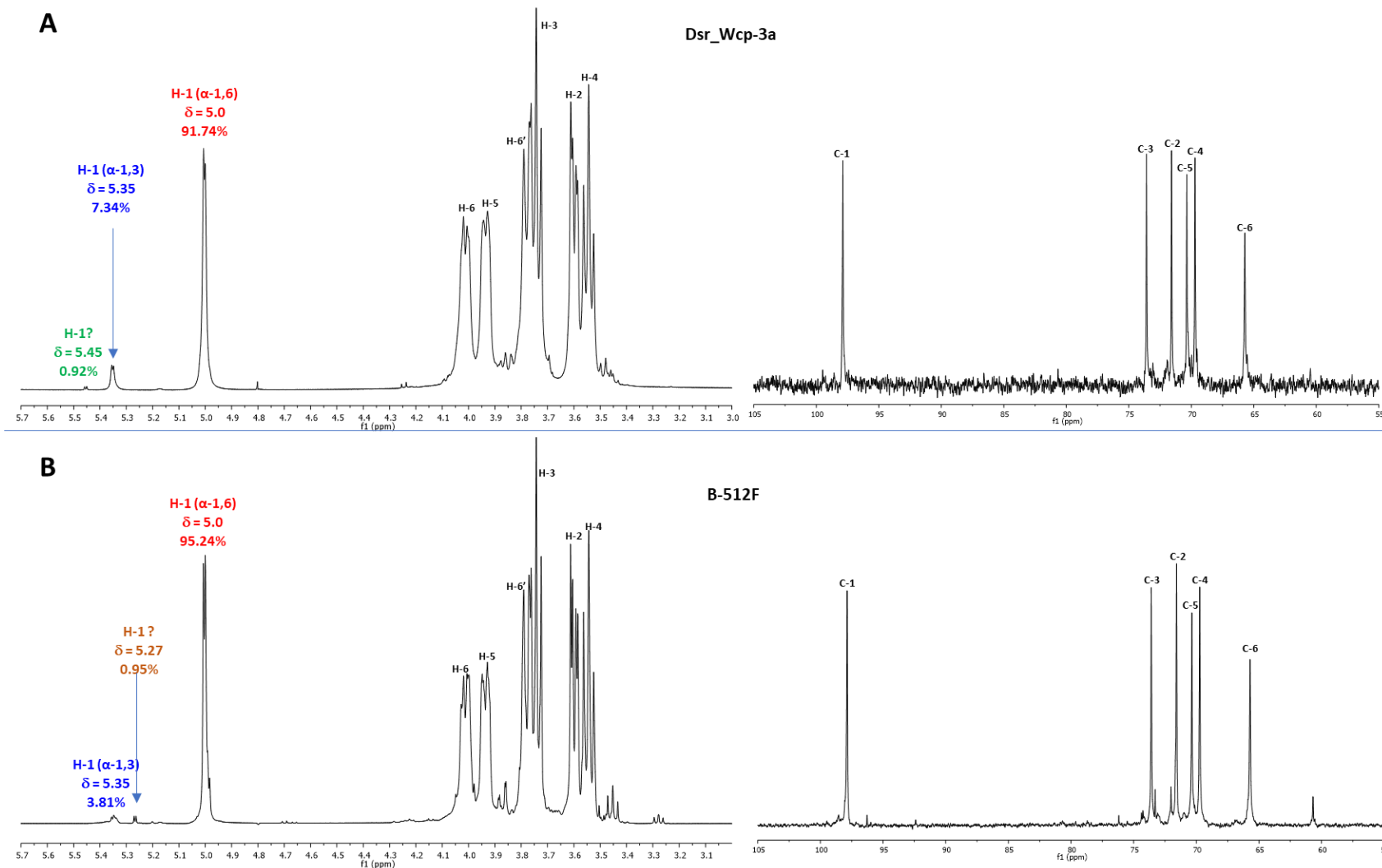
La Figura 21 muestra los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la dextrana comercial de *L. mesenteroides* B-512F y la dextrana de la enzima Dsr\_Wcp-3a en  $\text{D}_2\text{O}$ . Los resultados muestran que ambas dextranas dieron espectros muy similares, lo que indica una estructura similar, aunque con diferentes porcentajes en enlaces  $\alpha$ -(1-6) de la cadena principal y de enlaces ramificados  $\alpha$ -(1-3).

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para la dextrana de Dsr\_Wcp-3a (Figura 21a), las señales anoméricas características de los residuos de  $\alpha$ -glucosilo aparecieron en  $\delta_{\text{H}}$  5.0,  $\delta_{\text{H}}$  5.35 y  $\delta_{\text{H}}$  5.45, respectivamente.



**Figura 20.** Detección de la degradación de la sacarosa inicial por HPAEC-PAD. Panel superior) la serie de picos obtenidos a los 10 min de reacción; Panel inferior) la serie de picos obtenidos a los 30 min de reacción. En azul corresponde al perfil antes de la reacción, de color rojo después de la reacción con invertasa y en color amarillo corresponde al perfil de un estándar comercial de dextrana de 5,200 Da.





**Figura 21.** a) Espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la dextrana sintetizada por la enzima Dsr\_Wcp-3a. b) Espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la dextrana comercial de *L. mesenteroides* B512-F.

La señal anomérica centrada en  $\delta_H$  5.0 fue característica de un enlace glicosídico  $\alpha$ -(1-6) típico de la cadena principal junto con otra señal de protón anomérico de baja intensidad en  $\delta_H$  5.35 que se debió a la presencia de una cadena ramificada típica de enlaces  $\alpha$ -(1-3). También aparece otra señal de baja intensidad en  $\delta_H$  5.45, la cual no se le pudo asignar a ninguna rama debido a la falta de correlaciones en los espectros de 2D RMN (anexo B). Se necesitan experimentos e información adicionales para determinar este tipo de enlace. Los otros protones aparecieron de  $\delta_H$  3.3 a 4.2:  $\delta_H$  = 3.60 (dd,  $J_{2,1}$  = 5.0 Hz,  $J_{2,3}$  = 10.0 Hz, H-2), 3.74 (t,  $J_{3,4}$  = 10.0 Hz,  $J_{3,2}$  = 10.0 Hz, H-3), 3.54 (t,  $J_{4,3}$  = 10.0 Hz,  $J_{4,5}$  = 10.0 Hz, H-4), 3.93 (m, H-5), 3.77 (m, H-6a), 4,0 (m, H-6b). El pico en  $\delta_H$  4.80 en el espectro es de D<sub>2</sub>O.

El espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 21a) estaba de acuerdo con el de RMN de <sup>1</sup>H. De hecho, muestra seis señales, entre ellas, las que aparecen en  $\delta_C$  97.90 y  $\delta_C$  65.72, correspondientes a C-1 y C-6, que están involucradas en enlaces  $\alpha$ -(1-6). La resonancia de carbono de enlace en  $\delta_C$  65.41 muestra dos picos de correlación en el espectro HSQC (anexo B), lo que indica que los dos protones del CH<sub>2</sub> no son idénticos. Las cuatro señales restantes que surgen en  $\delta_C$  69.72,  $\delta_C$  70.37,  $\delta_C$  73.59 y  $\delta_C$  71.57 corresponden a C-4, C-5, C-3 y C-2, respectivamente.

En resumen, la dextrana sintetizada por Dsr\_Wcp-3a tiene una estructura lineal hecha constitutivamente por enlaces de unidades D-glucopiranosilo  $\alpha$ -(1-6), aproximadamente 7.34% son enlaces ramificados  $\alpha$ -(1-3) y 0.92% de un enlace no conocido.

Por otro lado, en el espectro de RMN de <sup>1</sup>H para la dextrana comercial de *L. mesenteroides* B512-F (Figura 21b), contiene señales de resonancia para los anoméricos en  $\delta_H$  5.01,  $\delta_H$  5.26 y  $\delta_H$  5.35. La señal anomérica en  $\delta_H$  5.01 se asignó al enlace glicosídico  $\alpha$ -(1-6) de la cadena principal, la señal en  $\delta_H$  5.35 correspondió a ramas unidas  $\alpha$ -(1-3) y por último la señal en  $\delta_H$  5.26 pudiera asignarse a enlaces ramificados  $\alpha$ -(1-2) o residuos de  $\alpha$ -D-glucopiranosilo 2,6-di-O-sustituídos. Los otros protones cuyas señales de resonancias están en la región de  $\delta_H$  3.4 a 4.2:  $\delta_H$  = 3.60 (dd,  $J^{2,1}$  = 5.0 Hz,  $J_{2,3}$  = 10.0 Hz, H-2), 3.74 (t,  $J_{3,4}$  = 10.0 Hz,  $J_{3,2}$  = 10.0 Hz, H-3), 3.54 (t, 1H,  $J_{4,3}$  = 10.0 Hz,  $J_{4,5}$  = 10.0 Hz, H-4), 3.94 (m, H-5), 3.79 (m, H-6a), 4.01 (m, H-6b).

En los espectros de <sup>13</sup>C RMN (Figura 21b) se observaron seis resonancias de carbono principales. Las asignaciones de carbonos de metileno y metino se determinaron mediante el espectro 2D HSQC. El espectro de RMN de <sup>13</sup>C dio una resonancia de campo ascendente que era metileno  $\delta_C$  65.73 (C-6) mientras que las resonancias restantes eran metino. El valor del desplazamiento químico de <sup>13</sup>C del carbono anomérico  $\delta_C$  97.88 (C-1) confirma su configuración  $\alpha$ . Como se muestra en el espectro de <sup>13</sup>C RMN, las cuatro señales restantes se desplazan a  $\delta_C$  71.60,  $\delta_C$  73.60,  $\delta_C$  69.74, y  $\delta_C$  70.37 que corresponden a C-2, C-3, C-4, y C-5 respectivamente.

En resumen, la dextrana de B512-F está compuesto por un 95.24% de enlaces  $\alpha$ -(1-6), un 3.81% de enlaces ramificados  $\alpha$ -(1-3) y un 0.95% probablemente debido a enlaces ramificados  $\alpha$ -(1-2) o residuos de  $\alpha$ -D-glucopiranosilo 2,6-di-O-sustituidos.

Estos resultados son consistentes con los cambios químicos previos de los datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  mostrados para las dextranas reportadas en la literatura. Para diferentes dextranas, los cambios químicos de las resonancias de RMN de  $^1\text{H}$  se informan alrededor de  $\delta_{\text{H}}$  3 a 4 para los protones H-2, H-3, H-4, H-5 y H-6; y resonancia de señales anoméricas en la región  $\delta_{\text{H}}$  4 a 6 (Seymour, 1979a). Como en nuestro caso, se ha reportado que las dextranas tienen una estructura lineal formada por enlaces consecutivos de unidades de D-glucopiranosilo  $\alpha$ -(1-6) y se encuentran en  $\delta_{\text{H}}$  4.95 a 4.98 (Seymour, 1979a; Seymour, 1979b; Maina *et al.*, 2008; Bounaix *et al.*, 2009; Purama *et al.*, 2009). En otros trabajos se detectaron cepas que sintetizan dextranas mostrando protones anoméricos en  $\delta_{\text{H}}$  4.98,  $\delta_{\text{H}}$  5.11 y  $\delta_{\text{H}}$  5.32 que se atribuyeron a enlaces  $\alpha$ -(1-6),  $\alpha$ -(1-2) y  $\alpha$ -(1-3), respectivamente (Maina *et al.*, 2008; Bounaix *et al.*, 2009).

Por otro lado, los cambios químicos de  $^{13}\text{C}$  RMN se informan en  $\delta_{\text{C}}$  95 a 105 para la región anomérica y  $\delta_{\text{C}}$  75 a 85 para dextranas ramificadas en C-2, C-3 o C-4 (Seymour, 1979b). Para dextrano de *Weissella cibaria* CMGDEX3, resonancia en la región  $\delta_{\text{C}}$  76.0 en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  indicó un enlace ramificado en C-3 que también fue apoyado por resonancia en  $\delta_{\text{C}}$  5.32 en su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Rifat *et al.*, 2012).

Las análisis y resultados de las estructuras químicas de la dextrana comercial de B512-F y de la dextrana sintetizada por la enzima Dsr\_Wcp-3a se determinaron en el Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

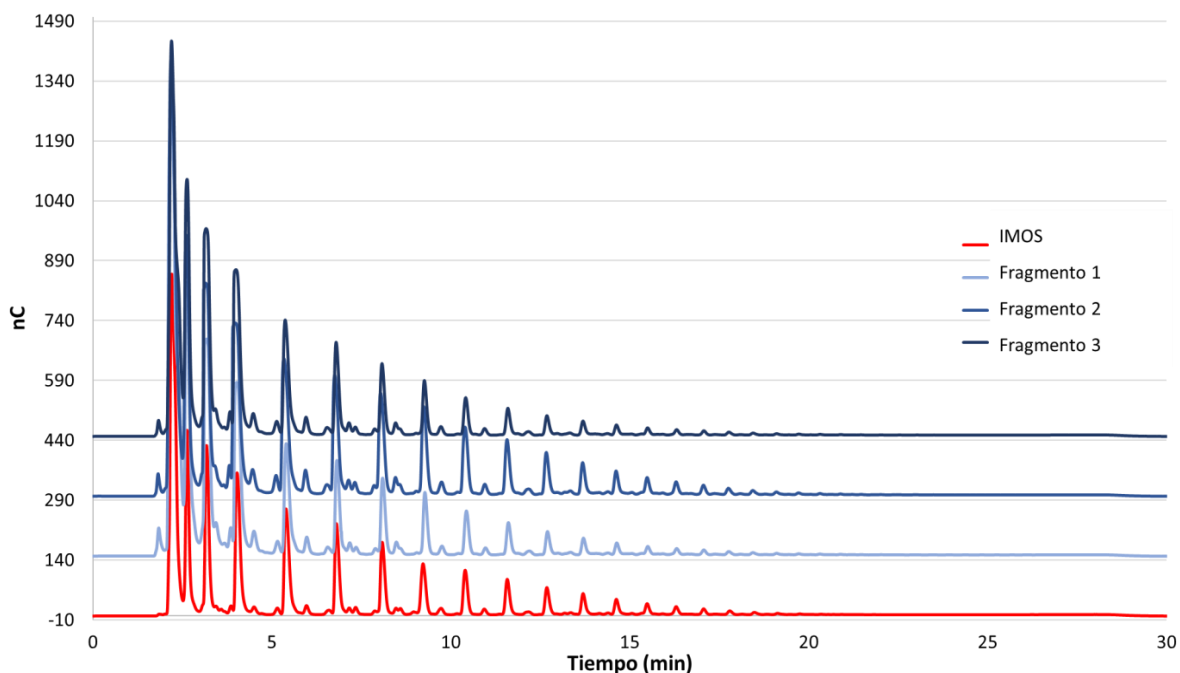
## 6.6 Especificidad de producto

A pesar de obtener una expresión anómala (la expresión del gen se detectó en varias bandas de actividad) de la enzima, se estudió el comportamiento de las fracciones en su conjunto, ya que se sospechaba que dichas fracciones conservan la misma especificidad. En los siguientes experimentos fueron diseñados para analizar la especificidad cada una de las fracciones por separado.

Como se introdujo en el apartado 2.1.4 “Productos: polisacáridos y gluco-oligosacáridos”, dependiendo de la especificidad de la enzima, las GS sintetizan una gran variedad de glucanas, habiéndose demostrado que la enzima Dsr\_Wcp-3a produce una glucana con enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-6): la dextrana. También produce un perfil de gluco-oligosacáridos IMOS y MOS característicos para la reacción de aceptor. Aprovechando estos perfiles se

realizaron reacciones de aceptor, usando sacarosa como donador y una mezcla de isomaltosa e isomaltotriosa como aceptor en una relación 1:2 para caracterizar la capacidad de cada fragmento por separado para transferir unidades de glucosa. Cada fragmento se logró separar y aislar cuidadosamente a partir de las bandas de electroforesis de un gel SDS-PAGE (Figura 9).

Como se observa en los cromatogramas de la Figura 22, cada fragmento tiene la misma especificidad de la reacción de aceptor produciendo el mismo perfil de isomalto-oligosacáridos (IMOS). Primeramente, se puede concluir que la especificidad de reacción se conserva en cada fracción. Cabe señalar que las fracciones observadas corresponden a versiones truncadas en aproximadamente ~130 aa, ~295 aa y ~490 aa para los fragmentos 1, 2, y 3 respectivamente. Dichos cortes ocurren tanto en el N-terminal como en el C-terminal, dentro del dominio V sin comprometer la región del dominio catalítico, como se demostró en el análisis por secuenciación de péptidos por LC-MS/MS. Se ha demostrado que a pesar de eliminar regiones del dominio V, el tamaño del polímero sintetizado no se ve afectado, es decir, se conserva la especificidad en términos del peso molecular del polímero sintetizado (Moulis *et al.*, 2006a). Además, aquí se demuestra, al observar el mismo perfil de productos de la reacción de aceptor, que la especificidad de la reacción se conserva, a pesar de cortes dentro del dominio V (Figura 9 y 10).



**Figura 22.** Síntesis de IMOS observada por HPAEC-PAD, obtenida de las tres formas purificadas de la enzima aislada de las bandas de electroforesis.

Es aceptado que la especificidad con respecto al producto de reacción en presencia de aceptor, se refiere tanto a la estructura del producto (tipo de enlace en la cadena principal y

en las ramificaciones), así como a su peso molecular. La relación estructura función ha sido poco estudiada debido al nivel de complejidad estructural que presentan tanto las GS como sus productos. Sin embargo, la cristalización de diversas GS ha permitido lograr avances en esta dirección (ver Tabla 2).

La enzima Dsr\_Wcp-3a sintetiza una amplia diversidad de productos. A través de estudios cinéticos y empleando equipos y métodos analíticos descritos en la metodología, se lograron caracterizar los detalles del perfil de especificidad de la reacción durante la polimerización. En una primera fase se puede observar diferentes series de gluco-oligosacáridos de dextrana (Figura 11). La primera serie que se identifica son los FIMOS (isomalto-oligosacáridos con grupo fructosilo en un extremo), que se produce a tiempos tempranos cuando la sacarosa es la molécula aceptora más abundante al no haber aún productos de hidrólisis. Una segunda serie de gluco-oligosacáridos de dextrana se observa posteriormente (a partir del min 30, ver Figura 11) que consiste en los IMOS (isomalto-oligosacáridos con grupo glucosilo en ambos extremos), cuya serie aparece del lado izquierdo de los FIMOS siendo la glucosa la molécula aceptora inicial de la cadena. A estos tiempos de reacción, la concentración de glucosa proveniente de la hidrólisis de la sacarosa se incrementa. Posteriormente, la enzima Dsr\_Wcp-3a es capaz de elongar las series de glucanas producidas en la fase inicial de la reacción. En la siguiente fase los gluco-oligosacáridos inicialmente producidos actúan como una molécula aceptora siendo elongadas a polisacáridos de mayor peso. Es así como se logra sintetizar dextrana hasta alcanzar un peso molecular promedio de 8,200 Da. Se observa el cambio de un mecanismo no procesivo a un posible mecanismo procesivo, que en su conjunto se ha considerado como un mecanismo semi-procesivo mediado principalmente por el dominio V. Se intuye que la capacidad de elongar cadenas de dextrana es débil para la enzima Dsr\_Wcp-3a, ya que no se ha reportado un peso molecular tan bajo en la síntesis de este tipo de polisacárido por las GS hasta ahora caracterizadas. Se ha reportado que la presencia de un dominio V que muestra una capacidad débil para unirse a las cadenas de glucana en crecimiento afecta considerablemente el tamaño del producto (Claverie *et al.*, 2017).

También debe considerarse que las moléculasceptoras (sacarosa, glucosa, dextranas de bajo peso molecular y agua) tienen la misma posibilidad de acceso al sitio catalítico, y una vez ahí la especificidad que existe en el subsitio para cada aceptor definirá la transferencia del residuo glucosilo del intermediario glucosil-enzima hacia dicha molécula aceptora. Y esta transferencia debe estar mediada por las energías favorables debidas de la interacción entre la molécula aceptora, específicamente con los aminoácidos que conforman los subsitios de unión del aceptor (+1, +2 y +3) (Claverie *et al.*, 2019). Algunos de estos aminoácidos, específicamente residuos aromáticos como el triptófano o la tirosina tienen interacciones

“stacking” con el anillo de piranosa del aceptor y también con los anillos de piranosa de la cadena de glucana naciente y, por otro lado, estos residuos pueden controlar la accesibilidad al agua del sitio activo.

Por último, con el objetivo de conocer la estructura terciaria de la enzima Dsr\_Wcp-3a para la determinación de motivos y dominios conservados que pudieran ser clave en el perfil de los productos, se decidió realizar un estudio comparativo a nivel secuencia de aminoácidos (aprovechando las herramientas computacionales “in silico”) de las estructuras cristalizadas hasta ahora disponibles y la información experimental que sustentan la función descrita para cada región de estas GS.

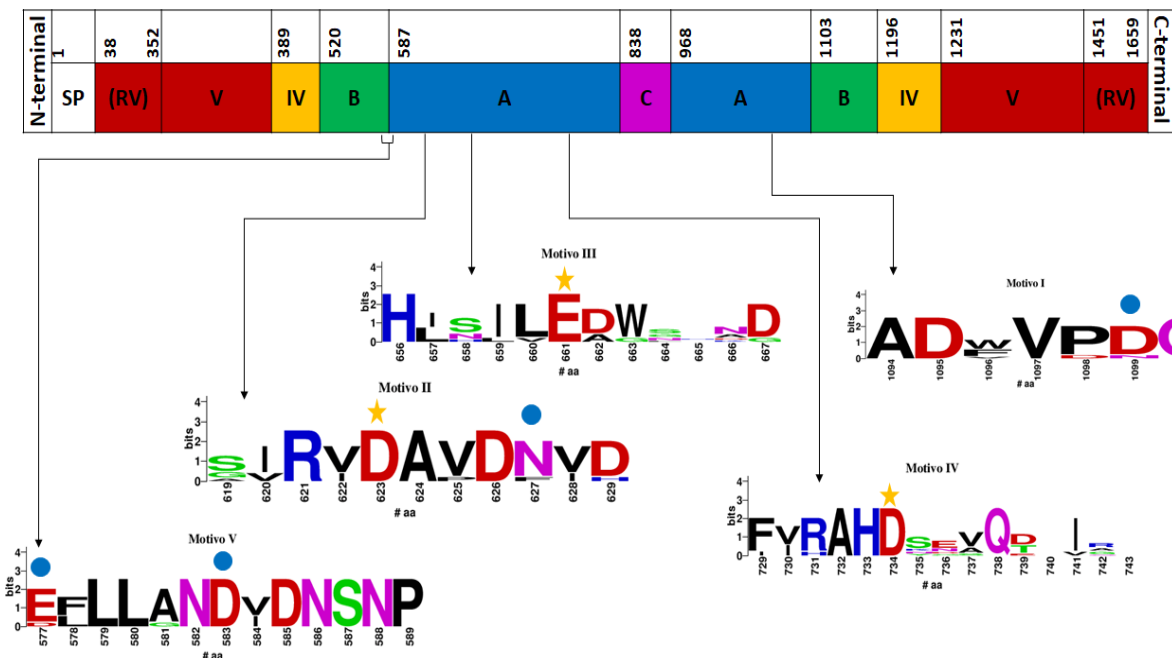
## **6.7 Comparación *in silico* de la estructura de la enzima**

### **6.7.1 Delimitación de la estructura primaria**

El total de aminoácidos de la enzima Dsr\_Wcp-3a es de 1659 aa. La búsqueda comparativa más cercana de la estructura primaria de acuerdo a la base de datos del NCBI-PDB (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) arrojó que las estructuras primarias de las enzimas de *L. citreum* NRRL B-1299 (PDB ID: 5NGY) y *L. citreum* NRRL B-1355 (PDB ID: 6HVG) cubre el 80% y 75% de la secuencia de consulta total y exhibe 50.30% y 50.59% de identidad de secuencia respectivamente. De acuerdo al porcentaje de identidad de secuencia se prevé que se pueda realizar la predicción de la estructura de la proteína, es decir, la inferencia de la estructura 3D de la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos de plantillas homólogas (Fiser, 2010).

A partir del multialineamiento de las secuencias completas de las estructuras cristalizadas disponibles (Anexo A) incluyendo la estructura de *Weissella confusa* WcCab3-DSR dilucidada por modelamiento de homología (Shukla *et al.*, 2016). El archivo de alineación se generó utilizando ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2>) (Larkin *et al.*, 2007). Y también, mediante la búsqueda en la base datos del NCBI-CDD/SPARCLE que almacenan información de secuencias y estructuras de los dominios súper conservados (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), la intención fue encontrar los dominios conservados de las familias GH70. Su resolución llega hasta subfamilia y su mejor indicador de similitud es el valor *e*. Se construyó la arquitectura molecular de la estructura primaria de la enzima Dsr\_Wcp-3a y se delimitaron los dominios y secuencias altamente conservadas (Figura 23).

Origen	Motivo V	Motivo II	Motivo III	Motivo IV	Motivo I
Dsr_Wcp-3a	ELLLANDV DNSNP	SVRVDAVDNVD	HLSILEDWGHND	SFVRAHDSSEVQTVIGD	ADVFVPDQ
ASR	ELLLANDV DNSNP	GIRVDAVDNVD	HLSILEDWNGKD	SFVRAHDYDAQDPVIRK	ADWVVPDQ
DSR-M	ELLLCNDV DNSNP	SIRVDAVDNVD	HIHILEDWSPND	SFIRAHDSSEVQVOTIIAK	ADWVVPDQ
GTF-180	ELLLANDV DNSNP	GIRVDAVDNVD	HINILEDWGWDD	NFVRAHDSSEVQVQDQVIRQ	ADWVVPDQ
GTF-A	ELLLANDV DNSNP	SVRVDAVDNVD	HINILEDWNHAD	SFVRAHDNNSSEVQVQDQIQN	ADWVVPDQ
GTF-SI	ELLLANDV DNSNP	SIRVDAVDNVD	HLSILEAWSYND	SFIRAHDSSEVQVQDQVIRN	ADWVVPDQ
CBD-CD2	ELLLANDV DNSNP	SIRVDAVDNVD	HLSLVEAGLDAG	SIIHAHDKGVQEKVGA	ADVVDNVDQ
WcCab3-DSR	ELLLANDV DNSNP	AIRVDAVDNVD	HLSILEDWSHND	SFVRAHDSSEVQVQTVIAE	ADWVVPDQ



**Figura 23.** Multialineamiento de secuencias altamente conservadas de las enzimas GH70 con estructura cristalizada y representación de la estructura primaria de la enzima Dsr\_Wcp-3a, mostrando los motivos conservados (representados en secuencia LOGO). Las estrellas amarillas representan a los residuos catalíticos y los círculos azules los residuos involucrados en la unión del  $Ca^{2+}$ . Número de acceso al GenBank, CAB65910.2 (*Leuconostoc citreum* ASR), CDX66895.1 (*Leuconostoc citreum* DSR-M), AAU08001.1 (*Lactobacillus reuteri* GTF-180), AAU08015.1 (*Lactobacillus reuteri* GTF-A), AAN58706.1 (*Streptococcus mutans* GTF-SI), CDX66820.1 (*Leuconostoc citreum* GBD-CD2), AKE50934.1 (*Weissella confusa* Cab3-DSR).

La secuencia primaria de la enzima Dsr\_Wcp-3a muestra un sitio de escisión entre el aminoácido 37 y 38 de acuerdo con el servidor signalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), que indica la probabilidad de péptido señal en el extremo N-terminal. Después del péptido señal se encuentra el dominio V, entre los aa 38 y 388 en el N-terminal y existe también entre los aa 1231 y 1659 en el C-terminal (Figura 23). Así también el dominio IV está conformado por un rango de 389 a 519 aa en el N-terminal, así como de 1196 a 1230 aa en el C-terminal. El dominio B está conformado por un rango de 520 a 586 aa en el N-terminal y 1103 a 1195 aa en el C-terminal. El dominio catalítico A comienza desde los aa 587 a 837 en el N-terminal y termina en con los aa 968 a 1102 en el C-

terminal. Por último, el dominio C está ubicado entre los aa 838 y 967 formado por una sola cadena polipeptídica. Por otro lado, las secuencias de aminoácidos de 38 a 352 y de 1451 a 1659 se denominan regiones variables (RV) y no muestran ninguna similitud significativa con alguna GS.

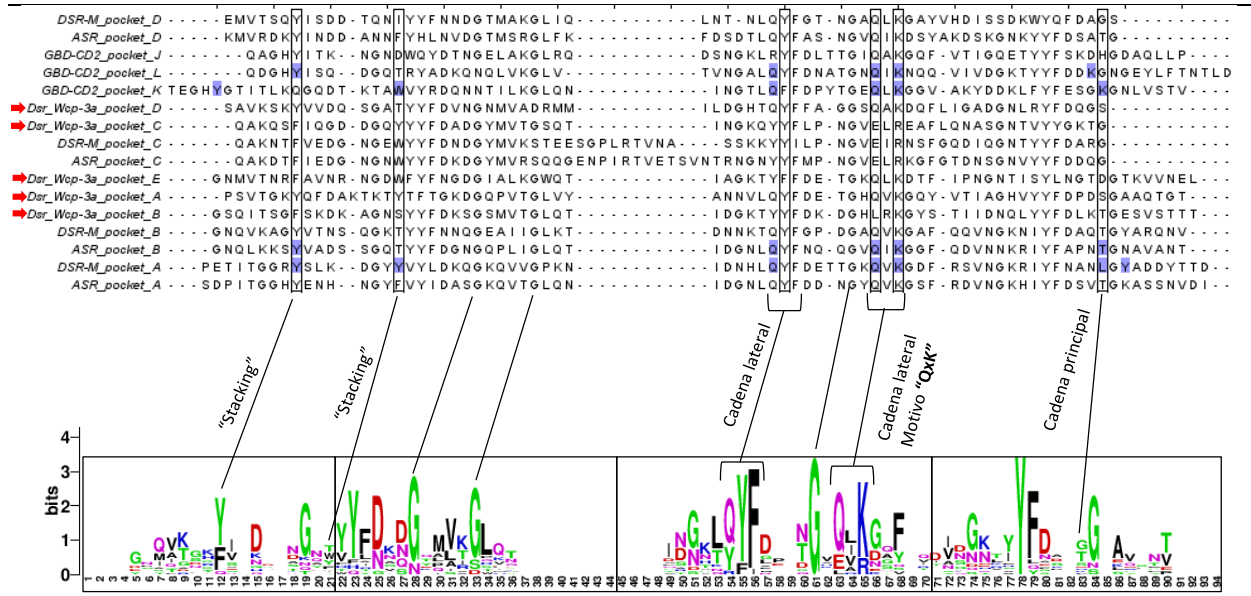
En la Figura 23 se muestra la secuencia de los Motivos I, II, III, IV, V (identificados del multialineamiento, ver Anexo A) en la estructura primaria de la enzima Dsr\_Wcp-3a. Dichos motivos como se describió en el apartado 2.1.2 son altamente conservados en las enzimas GS. Se prosiguió a mapear los motivos dentro de la estructura primaria, y estos están representados en secuencia LOGO basado en el multialineamiento (Crooks *et al.*, 2004). Se encontró los mismos residuos descritos en las estructuras cristalográficas que actúan en el mecanismo de reacción, la citada triada catalítica, conformada por tres aminoácidos carboxílicos altamente conservados, Asp (D), Glu (E) y Asp (D) que actúan como el residuo nucleofílico, ácido/base y como el estabilizador respectivamente. Así mismo comparte los mismos residuos que participan en la unión a calcio. Aunque el  $Ca^{2+}$  no es indispensable para la estabilidad o funcionalidad de la enzima en la mayoría de las GS, se sigue conservando este sitio de unión a calcio en las diferentes GS (Yi *et al.*, 2009; Cote y Skory, 2012).

Posteriormente se realizó otro multialineamiento, esta vez de las secuencias repetidas tipo YG, involucradas en la unión a glucana localizadas en el dominio V, como se describió en el apartado 2.1.2.1. Se tomaron las secuencias correspondientes a las repetidas de las enzimas DSR-M, ASR y GBD-CD2, ya que éstas cuentan con estructura cristalográfica en complejo a un carbohidrato en dichas repetidas (Tabla 2). En la Figura 24 se puede observar las repetidas que conforman los “pockets” de unión a glucana, habiendo cuatro “pockets” (A, B, C y D) para las enzimas DSR-M y ASR: para ambas enzimas los pockets A y B están localizados en el N-terminal y los pockets C y D localizados en el C-terminal del dominio V. Y habiendo tres “pockets” (J, L, y K) para la enzima GBD-CD2, los cuales se localizan en el C-terminal del dominio V. En el multialineamiento se logró identificar cinco supuestos “pockets” (A, B, C, D y E) para la enzima Dsr\_Wcp-3a: los pockets A y B se localizan en el N-terminal y los pockets C, D y E en el C-terminal del dominio V. En la misma Figura 24 se aprecia con más detalle lo descrito por Giffard y Jacques (1994), acerca de las repetidas YG, estas se muestran enmarcadas y representadas en secuencia LOGO.

Sin embargo, a pesar de existir varios “pockets” en las GS previamente utilizadas para el multialineamiento, no se ha logrado confirmar por estructura cristalográfica para todos los “pockets”, más solo, en unos cuantos la capacidad de estos para unirse a la glucana (residuos remarcados en color azul, Figura 24). En la misma figura, se señalan los aminoácidos detectados que interactúan mediante la cadena lateral o principal con la glucana en complejo a la estructura de la enzima correspondiente. Molina y colaboradores (2020), atribuyen a la



ausencia del motivo “QxK” conformado por el aminoácido glutamina separado por cualquier aminoácido “x” y seguido del aminoácido lisina, el que posiblemente un “pocket” no tenga la habilidad para unirse a la glucana, debido a que este motivo se ha visto que interacciona junto con el residuo “stacking” en el fondo del “pocket”.



**Figura 24.** Multialineamiento de secuencias de los “pockets” de unión a glucana identificadas en las GS DSR-M, ASR y GBD-CD2 y con los supuestos “pockets” identificados en la enzima Dsr\_Wcp-3a. Los residuos remarcados en color azul están implicados directamente en la interacción con el complejo en la estructura 3D correspondiente. Las repetidas YG están enmarcadas en la secuencia LOGO.

Se observa que los supuestos “pockets” B y C de la enzima Dsr\_Wcp-3a tienen cambiado los residuos QxK por LxK y ExR respectivamente. Por lo que los supuestos “pockets” B y C podrían no cumplir el rol descrito (capacidad de unirse a glucana).

### 6.7.2 Selección de la plantilla

Cuanto mejor sea la plantilla, más precisa será la predicción, sin embargo, como sabemos a medida que las proteínas evolucionan, su estructura y secuencia cambian. Y nos enfocamos a analizar las posibles plantillas disponibles beneficiándonos del hecho de que ya se han deducido experimentalmente la estructura de al menos una de cada diferente GS descritas en la literatura por el tipo de polímero que sintetizan (dextransacarasa, mutansacarasa, alternansacarasa y reuteransacarasa) y afortunadamente hay tres dextransacarasas disponibles (Tabla 2). Por lo que se prosiguió a analizar la secuencia de aminoácidos mediante la herramienta de búsqueda de similitudes BLASTp en la base de datos del NCBI-PDB (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar la identidad entre la plantilla y el objetivo.

En la Tabla 11 se resumen los mejores resultados de la búsqueda. Se decidió juntar los dominios A, B y C en un bloque de búsqueda y los dominios IV y V en otro bloque debido a que, gran parte del dominio V no tiene similitud con las plantillas. Al separar los dominios, nos permitió confirmar las plantillas con mayor similitud de secuencia y cobertura (Tabla 11). Además, todas las estructuras cristalizadas disponibles están truncadas por el dominio V tanto por el N- como por el C-terminal (ver Tabla 2) así que, por lo mismo solo se puede incluir el rango del aminoácido 223 al 1313 de la enzima Dsr\_Wcp-3a, los aminoácidos fuera de este rango no tenían similitud con ninguna de las secuencias de los PDB con estructura 3D.

Se revisó la calidad de las estructuras cristalográficas con el programa COOT (<https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/personal/pemsley/coot/>) tomando en cuenta los mapas de densidad electrónica. Se decidió tomar los PDB 5LFC y 3KLK de las enzimas DSR-M y GTF-180 respectivamente como plantillas para el modelado, además de tener un alto porcentaje de identidad y cobertura tienen la misma especificidad de enlace que la enzima Dsr\_Wcp-3a.

**Tabla 11.** Templados obtenidos del BLASTp con la mayor similitud de secuencia para el modelado de la enzima Dsr\_Wcp-3a.

Dominio	PDB ID (plantilla)	Nombre y origen	Especificidad	% Identidad de secuencia (a)	% Cobertura (b)
A, B, C	3KLK	GTF-180 L.R. 180	$\alpha$ -(1-6)	56.07	98
	3AIB	GTF-SI S.M.	$\alpha$ -(1-3)	56.39	99
	5LFC	DSR-M L.M. NRRL B-1299	$\alpha$ -(1-6)	53.64	100
	4AMC	GTF-A L.R. 121	$\alpha$ -(1-4)	54.09	98
	6HVG	ASR L. M. NRRL B-1355	$\alpha$ -(1-6)/(1-3)	54.09	98
IV, V	6HVG	ASR L. M. NRRL B-1355	$\alpha$ -(1-6)/(1-3)	45.82	98
	5LFC	DSR-M L.M. NRRL B-1299	$\alpha$ -(1-6)	43.96	99

(a) Porcentaje de identidad de secuencia plantilla-objetivo.

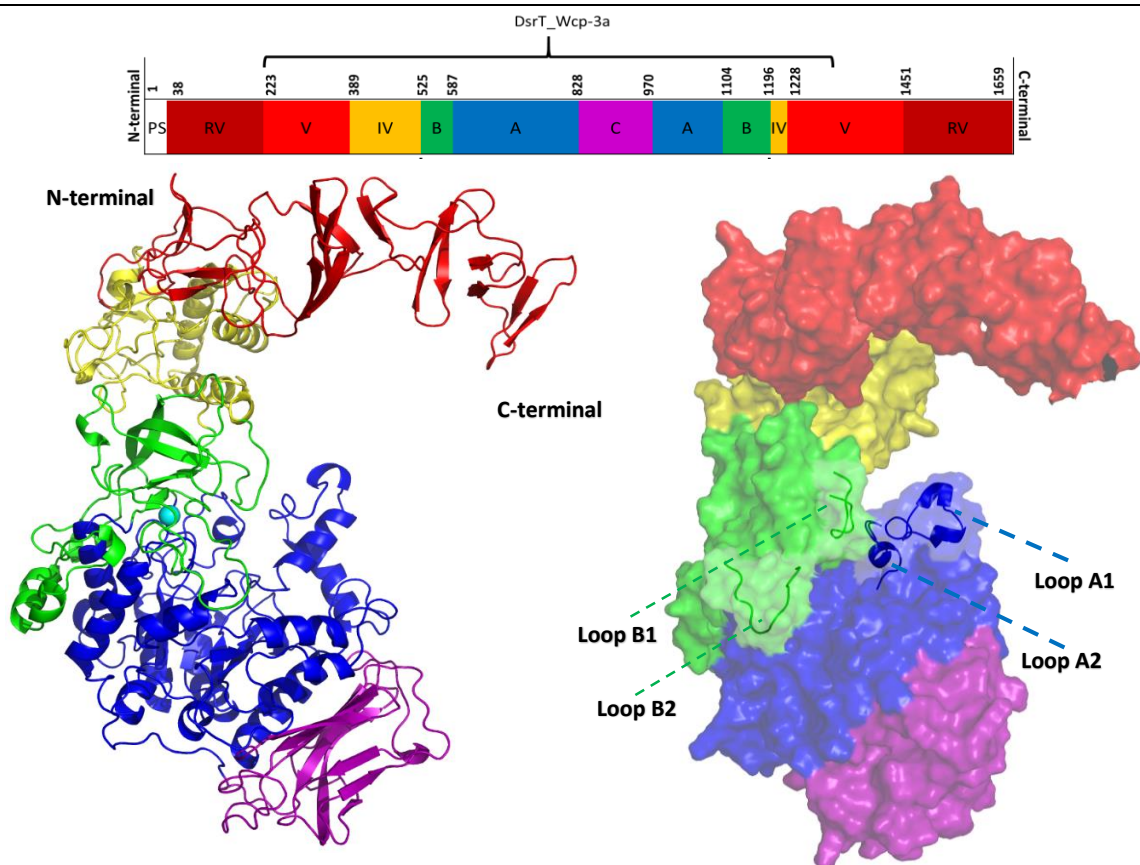
(b) La cobertura representa la cobertura de la alineación, que denota la relación entre el número de residuos alineados y el número total de residuos en la proteína consulta.

### 6.7.3 Modelamiento 3D y validación

El modelo fue generado tomando el máximo de cobertura posible y abarca desde el aminoácido 223 al 1313 de un total de 1659 aa, designado DsrT\_Wcp-3a (Figura 25). Los segmentos que faltan se pueden construir *de novo*, usando un servidor como el de I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) que ofrece opciones basadas en la identificación de las plantillas estructurales dentro de la base de datos del PDB y mediante

enfoque de múltiples subprocesos de iteraciones que ensamblan los fragmentos de diferentes plantillas mejor calificadas para enhebrar el modelo 3D. Sin embargo, para fines de este proyecto no creemos obtener información relevante que sume a los objetivos planteados.

Mediante la interface de Chimera v1.14 se accedió al servidor Modeller v9.25 para la construcción del modelo por homología (Šali *et al.*, 1995), dentro del modelo se incluye cualquier molécula de agua y otros residuos HETATM de la plantilla de entrada. Se utilizó dos plantillas por lo cual se utilizó la opción de modelado de múltiple templados con la finalidad de realizar la mejor captura del modelo entre las posibles conformaciones que satisfacen las restricciones espaciales. Se preparó un archivo de multialineamiento de las plantillas junto con la secuencia objetivo y se utilizó como entrada para el modelado. Inicialmente, se generaron 20 modelos independientes y se clasificaron por puntuación de energía proteica optimizada discreta (DOPE) (Shen y Sali, 2006). Se eligió el mejor modelo con puntuaciones DOPE razonables para su posterior minimización de energía.



**Figura 25.** Representación animada de la enzima DsrT\_Wcp-3a modelada de la secuencia 223 a 1313 aa. Los diferentes dominios están representados en color rojo, dominio V; amarillo, dominio IV; verde, dominio B; azul, dominio A; y magenta para el dominio C. En color cian y en forma de esfera se representa el ion calcio.

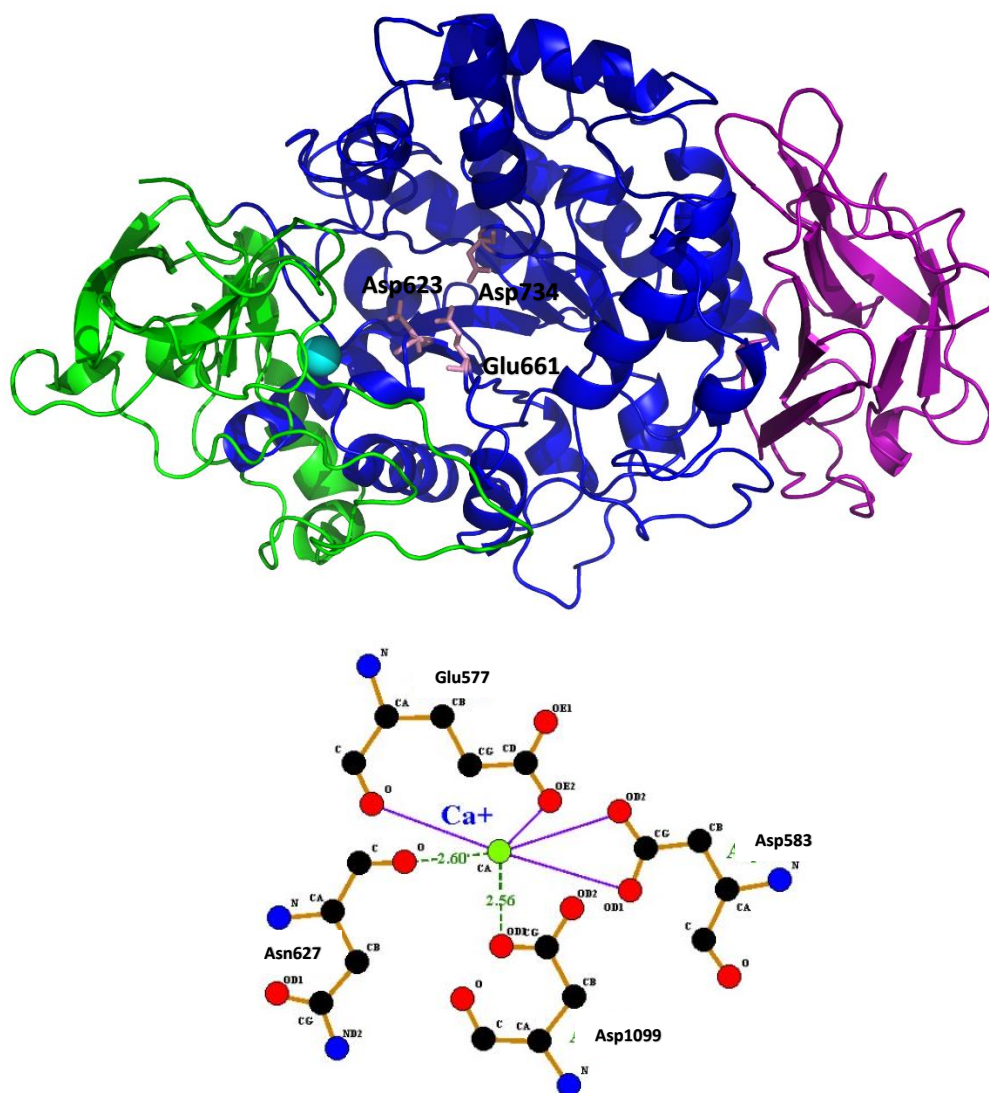
Los resultados de validación para el modelo resultante DsrT\_Wcp-3a con la energía minimizada usando el servidor YASARA (<http://www.yasara.org/minimizationserver.htm>) mostraron que el 87.6% de los residuos de aminoácidos se encuentran en las regiones más favorecidas, el 11.7% en las adicionales y el 0.7% en las regiones no permitidas, lo que implica que la mayoría de los ángulos diédricos phi ( $\phi$ ) y psi ( $\psi$ ) de la cadena principal ocuparon las estadísticas aceptables de acuerdo a los diagramas de Ramachandran generados por PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993).

Tal y como se ha reportado para las estructuras cristalizadas, en la Figura 25 se aprecian los dominios V, IV, B, A y C que conforman la cadena polipeptídica que sigue la ruta de "U" exhibiendo la estructura secundaria que conforma cada uno de los dominios.

El dominio A (color azul) representa el sitio catalítico que consiste de ocho hebras  $\beta$  soporte rodeadas por ocho  $\alpha$ -hélices formando el dominio más grande después del dominio V. También se puede apreciar los distintivos Loops A1 y A2 los cuales delimitan la cavidad catalítica. El dominio B (color verde) conforma junto con el dominio A el sitio de unión a calcio (esfera color cyan), además se observan los Loop B1 y B2 cuya función estructural está relacionada con la interacción de las moléculas aceptora y la cadena creciente de glucana. El Loop B2 y el Loop A2 a detalle muestran la siguiente secuencia aminoacídica: **HYNTDTSEGGY**, y **TSFLDSIIK** respectivamente, habiendo dos residuos aromáticos de tirosina y uno de fenilalanina para los Loops para B2 y B1 respectivamente, acusándolos de su posible participación funcional descrita en el apartado 6.6 "Especificidad de producto". El dominio C (color magenta) está compuesto por diez hebras  $\beta$ . Este dominio se compone de una sola cadena polipeptídica que permite la permutación circular en los otros dominios conectando los dominios del lado N-terminal a C-terminal. El dominio IV (color amarillo) tiene la mayor parte de la secuencia en el lado del N-terminal y se observa que está compuesto principalmente por "randoms coils". Por último, el dominio V (color rojo) menos de la mitad de la secuencia que comprende este dominio se logró modelar y se observa que está compuesto por hebras  $\beta$  antiparalelas y por "randoms coils".

En la Figura 26 panel superior se observa los dominios A, B y C del modelo DsrT\_Wcp-3a mostrando el calcio como heteroátomo que se introdujo tomando las coordenadas de los PDB plantilla. El ion calcio ocupó el lugar en la interfaz de los dominios A y B. Los residuos de aminoácidos que interactúan con el ion calcio se muestran en la Figura 26 panel inferior, los aminoácidos Asn627 (N) y Asp1099 (D) tiene interacciones por puente de hidrógeno y los aminoácidos Glu577 (E) y Asp583 (D) interaccionan mediante fuerzas de van der Waals. Estos aminoácidos coinciden con los motivos predichos mediante el mapeo de los residuos conservados obtenidos a partir del Multialineamiento de secuencias (Figura 23). En conjunto estos aminoácidos conforman el sitio de unión a calcio descrito en las enzimas GS. En la misma Figura en color rosado se observa la posición de los residuos de aminoácidos clave que formaron la tríada catalítica de Dsr\_Wcp-3a y están participando en el mecanismo de

reacción. El Asp623 actúa como un nucleófilo y el Glu661 actúa como un ácido/base, mientras que el Asp734 actúa como un estabilizador del estado de transición.



**Figura 26.** Panel superior. Dominios A, B y C de la proteína modelada DsrT\_Wcp-3a donde se muestra la ubicación de unión a calcio (esfera cian). Mismos colores que la figura 25. En color rosado los residuos que conforman la triada catalítica, Asp623 (D) actúa como el nucleófilo; Glu661 (E) actúa como el ácido/base; y Asp734 (D) actúa como estado de transición. Panel inferior. Representación bidimensional de los residuos que interactúan con el calcio en la estructura de la enzima modelada DsrT\_Wcp-3a (enlaces generados por LIGPLOT).

En resumen, los análisis del modelado por homología nos permiten concluir que la enzima Dsr\_Wcp-3a mantiene semejanza con las GS cristalizadas mostrando ser una enzima multidominio con un plegamiento predicho en forma de “U”. También, habiendo demostrado que tiene el característico barril TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> en el dominio catalítico y los residuos que participan en la catálisis altamente conservados. Además, conserva los motivos y “Loops” descritos para las GS. Sin embargo, la enzima Dsr\_Wcp-3a se diferencia de la

mayoría de las GS (GTF-A, GTF-180, GTF-SI, CBD-CD2. Ver Tabla 2) en que el dominio V estaría manteniendo un acercamiento hacia el sitio catalítico. Aunque esta última afirmación debe tomarse con cautela debido a que la mayoría de las GS cristalizadas están truncadas en el dominio V, por lo cual no se muestra por completo su posible posición durante la generación del modelado generado a partir de la cristalización.

## 7. Conclusiones

- El gen Dsr\_Wcp-3a de *Weissella confusa* Wpc-3a se expresó en el sistema BL21 DE3 Star™ *E. coli*. Sin embargo, los productos de expresión se obtienen como tres formas de la enzima de menor peso molecular. No se encontraron evidencias de que dichas formas provengan de una proteólisis.
- Se demostró que las formas de menor peso molecular de las enzimas, aunque incompletas, tienen la misma especificidad de reacción produciendo los mismos isomalto-oligosacáridos (IMOS) a partir de una mezcla de isomaltosa e isomaltotriosa como aceptor.
- Se logró identificar y delimitar los diferentes dominios dentro de la estructura primaria de la enzima, identificando las secuencias altamente conservadas, y la secuencia consenso de GBD.
- A partir de la identificación de residuos importantes y delimitación de los dominios se logró la generación de un modelo 3D de la enzima Dsr\_Wcp-3a por homología.
- Se demostró que los tres fragmentos que conforman Dsr\_Wcp-3a sintetizan un polímero de bajo peso molecular (8,200 Da), no habiendo diferencias de especificidad entre ellas.
- Se realizó la caracterización de productos por RMN y la dextrana sintetizada por Dsr\_Wcp-3a tiene una estructura lineal constituida principalmente por enlaces D-glucopiranosilo  $\alpha$ -(1-6), conteniendo aproximadamente 7.34% de enlaces de ramificación en  $\alpha$ -(1-3) y 0.92% de un enlace que no pudo determinarse.
- Se puso de manifiesto que la sacarosa actúa como sustrato donador de grupos glucosilo, pero también como aceptor de la reacción, lo que conduce a dos patrones de secuencia  $\alpha$ -(1-6) diferentes obtenidos a través de un mecanismo no procesivo.
- Series de IMOS y MOS con un DP hasta 17 y 12 pueden sintetizarse con el extracto de Dsr\_Wcp3a cuando se agrega al medio de reacción isomaltosa y maltosa respectivamente, ya que se comportan como aceptores con alta especificidad en la reacción modificando radicalmente la especificidad de la enzima.
- La isomaltosa y la maltosa desvían la reacción de tal manera que ya no se produce polímero.

## 8. Perspectivas

- Realizar una construcción del gen con la idea de producir una enzima que no sea sujeta a proteólisis, es decir, de manera estable.
- Establecer una técnica para cuantificar dextrana y fructana en la fermentación del pozol, vinculando dicho estudio con el rol e importancia del producto sintetizado por la enzima Dsr\_Wcp-3a de *Weissella Confusa* Wcp-3a.



## 9. Anexos

### 9.1 Anexo A: Multialineamiento de secuencias

```

Dsr_Wcp-3a/1-1659      1  ..MEKIKKHYKLYKSGKFLTAGLMTVTAIV.SVMGNV.HADESQAVTPDTSLEQAGLLAEAGE
ASR/1-2057              1  MKQQETVTRK KLYKSGKVWVAATAFAVILGVSTVTT.VHADTNSNV..AVKQINNTG.....
DSR-M/1-2065            1  MKIKETIIRK KLYKSGKSWVAATAFAVIMGVSAVTT.VSADTQTPV..GTQSQDDL.....
GTF-180/1-1772         1  ...MEIKKHFKLYKSGKQWVTAAVATVAVSTALLYGGVAHADQQVQS..STIQEQTSTVNADTT
GTF-A/1-1781           1  ...MEIKKHFKLYKSGKQWVTAAVATVAVSTALLYGGVAHADQQVQS..ASTTQDQSTVNNDTD
GTF-SI/1-1455          1  ...MEKKVRFKLRKVKKRWVTVSVAASAVVTLTSLSGSLVKADSTDDRQQAVTESQASLV.....
GBD-CD2/1-1102         1  .....
WcCab3-DSR/1-1401      1  .....MYKAGKFWVAAGAMF LGMIM..LAGPV.QADQI.TLQPTE SVE.....

Dsr_Wcp-3a/1-1659      61  GQLVLTPAGQKAA.....PVSEDTSSDDSE.....RFTPTVANN.....
ASR/1-2057              55  .....TNDSSG.....EKKVFPVSTNNDSLKQGTDFGWY
DSR-M/1-2065            55  .....TGQTGQDKPTTKEVIDKKEPVPRVSAQNAG...DLSA
GTF-180/1-1772         60  KTVNLDNTDQPAQTDDKNQVANDTTTNGSKTDSSTTVKNPTFIPVSTLSSSDNEKQSQNYNK
GTF-A/1-1781           61  KTVALDNTDQSAQTDDKQVVSNTNQSKTDDTSTADKNSTSTPVSVLPSNNTKQAKNYNE
GTF-SI/1-1455          57  ....T.....TSE.....AAKET.....
GBD-CD2/1-1102         1  .....
WcCab3-DSR/1-1401      39  .....VTQNETTDSQ.....APDSV.....

Dsr_Wcp-3a/1-1659      95  .DKPAID.....SVDTSQPATAAPK.....ADTDV.....
ASR/1-2057              83  DSDGNR.....VDQK.....
DSR-M/1-2065            89  DAKTTK.....ADDKQ.....
GTF-180/1-1772         124 PDNGNYGNVDAAYFNNNQLHISGWATNASQGTDSRQVIVRDIITKTELGRNTVNNVLRPDKV
GTF-A/1-1781           123 QDKGNYGNIIDTAYFSNNQLHVSGWATNASQGTNSRQIIVRDIITNNELGRDVTNNVLRPDKV
GTF-SI/1-1455          66  ....LT.....ADTSTAT.....
GBD-CD2/1-1102         1  .....
WcCab3-DSR/1-1401      55  .....TSL.....

Dsr_Wcp-3a/1-1659      119 .....STLQVDA...TTK...TDS.DIK...EDTPTDTPVVPVAQA.....
ASR/1-2057              93  .....T.....
DSR-M/1-2065            100 .....DTQPT.....
GTF-180/1-1772         188 NVHNVYNADNSGFDVNIIDFSGMKDYRDSIEIVSRYSGNGKSVDDWWSQPITFDKNNYAYLDTF
GTF-A/1-1781           187 NVHNVYNADNSGFDVNVNIIDFSGMKDYRDSIEIVSRYSGNGKSVDDWWSQPITFDKNNYAYLDTF
GTF-SI/1-1455          76  .....SATSQPTATV.....
GBD-CD2/1-1102         1  .....
WcCab3-DSR/1-1401      58  .....S.....DS.TVV...G...QSS...MASV.....

Dsr_Wcp-3a/1-1659      151 ESDTPQLTSGGT..TDKAT.....DKTV.QSTTVEGTSKQ.....V.....
ASR/1-2057              94  ...NQILLTAEQ..LKKN.....NEKNL...S.....V.....
DSR-M/1-2065            105 ...NAQLPDQGNKQTNSEN.....SDKGV.....KESTTAPVKTTD...V.....
GTF-180/1-1772         252 EVKNGELHATGWNATNKAINYNHFFVILFDRTNGKEVTRQEVDRDQSRPDKVAVYPPQVVGANS
GTF-A/1-1781           251 EVKNGELHATGWNATNSAINYNHFFVILFDQRTNGKEVARQEVREGQSRPDKVAVYPPQVVGANS
GTF-SI/1-1455          86  TD.NV.....
GBD-CD2/1-1102         1  .....
WcCab3-DSR/1-1401      72  DSNNVAISS.....

Dsr_Wcp-3a/1-1659      185 .....VITPKKESSTDE S.....
ASR/1-2057              114 .....ISDDTSKKDDE.....
DSR-M/1-2065            138 .....PSKSVAPETNT.....
GTF-180/1-1772         316 GFDVTFNIGDLDYTHQYQLSRYSNADNGEGDYVTYWFAPQSIAPANQSNQGYLDSFDISKNGE
GTF-A/1-1781           315 GFNVTFNISDLDYTHQYQVLSRYSNSDNGEGDNVTYWFNPQSIAPANQSNQGYLDSFDISKNGE
GTF-SI/1-1455          90  .....STTNQ S.....
GBD-CD2/1-1102         1  .....
WcCab3-DSR/1-1401      81  .....SASEVS.SQT.....

Dsr_Wcp-3a/1-1659      198 .....SSVSKQTDKAS.....LPTVATAT.....
ASR/1-2057              125 .....NISKQTKIANQ.....QTVDTAK.....
DSR-M/1-2065            149 .....SINASDAISKS.....QEKQF.....
GTF-180/1-1772         380 VVTVGWNAIDLSELQTNHYVILFDQTAGQVQASAKVDLISRPDVAKAYPTVKTAETSGFKVTFK
GTF-A/1-1781           379 VVTVGWNAIDLSELQNNHYVILFDQTAGKQVQASAKADLISRPDVAKAYPTVKTATNSGFKVTFK
GTF-SI/1-1455          96  .....TNTT.....ANTA.....
GBD-CD2/1-1102         1  .....
WcCab3-DSR/1-1401      90  .....SSVSSVASSAT.....MLSATSSA.....

```

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 218 .....IASKIPSVTGKYQFDA....  
 ASR/1-2057 143 .....GLTTSNLSDPITGGHY.....  
 DSR-M/1-2065 165 .....EKAPDSVPEITIGGRY.....  
 GTF-180/1-1772 444 VSNLQPGHQYSVVSFRFSADENGNNGDKRHTDYWYSPVILNQATASNIDTITMTSNGLHIATGWMAS  
 GTF-A/1-1781 443 VNNLQPGHQYSVVSFRFSADENGNNGDKRHTDYWYSPVILNQATASNIDTITMTSNGLHIAGWMAS  
 GTF-SI/1-1455 104 .....NFDVKPITITSEQS.....  
 GBD-CD2/1-1102 .....  
 WcCab3-DSR/1-1401 110 .....SASTIAATTTDGYHDEG.....

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 234 .....KTKTYTFTGKDGQPVTVGLVY.....  
 ASR/1-2057 159 .....ENHNGYFVYIDA SGKQVTVGLQN.....  
 DSR-M/1-2065 181 .....SLKDGYYVYLDDKQKQVTVGPKN.....  
 GTF-180/1-1772 508 DNSINEATPYAIILNNGREVTQRKLTLIARPDVAAVYPSLYNSAVSGFDTTIKLTNAQYQALNG  
 GTF-A/1-1781 507 DNSINETTPYAIILNNGREVTQRKMSLTARPDVAAVYPSLYNSAVSGFDTTIKLTNDQYQALNG  
 GTF-SI/1-1455 117 .....KTDNSDKIIATSKAVNR.....  
 GBD-CD2/1-1102 1 .....AQAGHYITKNGND.....WQYDTNGELAKGLRQDSNG  
 WcCab3-DSR/1-1401 126 .....GNWVYVRDGRKLTGRQL.....

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 254 .ANNVLOQYFDE.....TGHQVKGQVVTIAGHVYVYFDPDSGAAQTGT.....  
 ASR/1-2057 181 .IDGNLQYFDD.....NGYQVKGSFVRDVGKHIYFDSVTGKASSNVDIVNG.....  
 DSR-M/1-2065 203 .IDNHLOQYFDET.....TGKQVKGDFRVSNGKRIYFNANLGYADDTTAVAG.....  
 GTF-180/1-1772 572 QLQVLLRF SKAVDGNPNGTNTVTDQFSKNYATTGNFDFV.KVNGNQI.....EFSGWHTATN  
 GTF-A/1-1781 571 QLQVLLRF SKAADGNPSGDNVTVDQFSKNYATTGNFDFV.KVNGNQV.....EFSGWHTATN  
 GTF-SI/1-1455 134 .....LTA.....T.....GKFFVPANN.....TAH.....S.....  
 GBD-CD2/1-1102 33 KLR.....YFDLTTGIQA.....KGFQVTVIGQETVYFSKDHGDAQLLPMVTEGHYGTITLK  
 WcCab3-DSR/1-1401 143 .IDTFNVYFDE.....DGHQVKGQVRETDRGKHAAYDQGEGRALTE.....

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 294 .....NQIDGKMGVGF  
 ASR/1-2057 226 .....KAQGYDAQGNQLKKSIVADSSGQTYFFDG.....NGQPLIGLQTIIDGNLQYF  
 DSR-M/1-2065 249 .....KLVGYSNGNQKAGYVNTSQQKTYFFNN.....QGEAIIGLKTDNNKTQYF  
 GTF-180/1-1772 628 QSNDKNSQWIIIVLVNGKEVQRQLVNDTKDGAAGFNRRNDVYKVNPAIENSIMSGFQGITITLPVTV  
 GTF-A/1-1781 627 QSNDKDSQWIIIVLVNGKEVQRQLVNDTKDGAAGFNRRNDVYKVNPAIENSIMSGFQGITITLPVTV  
 GTF-SI/1-1455 151 .....RTVTDKIVPI  
 GBD-CD2/1-1102 84 QGQDTKTAWVYRDQ.....NNTILKGLQNIING.....  
 WcCab3-DSR/1-1401 183 .....QVVDGVVVRGF

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 304 KSDGSGQITSGFSKD.....  
 ASR/1-2057 273 NQQGVQ.....IKGGFQDVNNKRIYFAPNTGNAVANTEIINGKLGQRDANGNQVKNAFSK  
 DSR-M/1-2065 296 GPDGAQ.....VKGAFQVNGKNIYFDAQTGYARQNVGFLDGTAKGFDEQGNQIKSGIAT  
 GTF-180/1-1772 692 KDENVQLVHRFSND.....AKTGEENYVDFWSEVMVS.....KDSFQKG...  
 GTF-A/1-1781 691 KENNVQLVHRFSND.....VKTGEGNYVDFWSELMPV.....KDSFQKG...  
 GTF-SI/1-1455 161 K.....PKIGKL.....  
 GBD-CD2/1-1102 111 ...TLQFFDPYTGELKGGVAKYDDKLFYFESGKGNLVST.....V.....AGDYQDGHYI  
 WcCab3-DSR/1-1401 193 DADGYEITNGFGQT.....

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 318 .KAGNSYFDF..KSGSMVITGLQTIIDGKTYFDFDK.DGHLRKGYSIIIDNQLYVFDLKTGESVSTT  
 ASR/1-2057 328 DVAGNTFYFD..ANGVMLITGLQTIIDGKTYLDE.QGHLRKNYAGTFNNQFMVYFDADTGAAGTAI  
 DSR-M/1-2065 351 DLSGNVYFDF..ASCKMLITGVQNIIDGKTYFDFDK.QGHLRKNYAGTFNNQFMVYFDADTGAAGTAI  
 GTF-180/1-1772 731 .....NGPLNQFGLQTIIDGKTYFDFDK.QGHLRKNYAGTFNNQFMVYFDADTGAAGTAI  
 GTF-A/1-1781 730 .....NGPLNQFGLQTIIDGKTYFDFDK.QGHLRKNYAGTFNNQFMVYFDADTGAAGTAI  
 GTF-SI/1-1455 168 .KQPSSLSQDDIAALGNVKNIRKVNKGKYYFDFDK.DGTLQKNYALNINNGKTFDFDETALSNNTL  
 GBD-CD2/1-1102 159 SQDQTRYAD..KQNQLVKGGLVTVNGALQYFDNA.TGNQIKNQVIVDQKTYFDFDK.GNGEYLF  
 WcCab3-DSR/1-1401 207 .SNRDTYFDF..NDGNCVITGIQVIDGQTYNFD.D.QGRMLKGLAAEVNGTMMVYFDQGTGVATPTS

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 378 TSNFKSGLTIS..QTDDTTPHNSAVNMSKDSF..TIVDGFLLTAESWYVPKDITQTSATDWRASTPED  
 ASR/1-2057 389 EYQFDQGLVS..QSNENTPHNAAKSYDTKSSF..ENVDGYLTADTWYRPDILKNGDGTWASTETD  
 DSR-M/1-2065 411 EYQFEKGLTS..QNSVATSHNAAKSYDTKSSF..TNVDGFLTANSWYRPTDILKNGDGTWASTETD  
 GTF-180/1-1772 783 KLQFDKGTIS..ADEQYRRNGEAYSYDDKSI..ENVNGYLTADTWYRPKQILKDGTTWTDKSTED  
 GTF-A/1-1781 782 ELQFAKGTVS..SNEQYRRNGEAYSYDDKSI..ENVNGYLTADTWYRPKQILKDGTTWTDKSTED  
 GTF-SI/1-1455 230 PS.KKGNITNNDNTNSFAQYQVSYDAAAF..EHVDHYLTAEWYRPKQILKDGTTWTDKSTED  
 GBD-CD2/1-1102 220 TNT...LDM..STNAFSTKNVAFNHDSSEFDHTVDGFLTADTWYRPKSILANGTWRDSTEDK  
 WcCab3-DSR/1-1401 267 DPKFSPLEPE..VPTENAQHNAHGHTPEDE.DNMAGYLTADTWYRPNLILDNQVTVRESTPTE

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 439 FRPIMMTWVPTKQIQAAVYLNHMVSEGLLSS..DKKFSATDDQTLNQAHAHVQLQIELKIQQTK  
 ASR/1-2057 450 MRPLLMTWVPTKQIQAAVYLNHMVSEGLLSS..DKKFSATDDQTLNQAHAHVQLQIELKIQQTK  
 DSR-M/1-2065 472 FRPLLMTWVPTKQIQAAVYLNHMVSEGLLSS..DKKFSATDDQTLNQAHAHVQLQIELKIQQTK  
 GTF-180/1-1772 844 MRPILMVWVPTKQIQAAVYLNHMVSEGLLSS..DKKFSATDDQTLNQAHAHVQLQIELKIQQTK  
 GTF-A/1-1781 843 MRPILMVWVPTKQIQAAVYLNHMVSEGLLSS..DKKFSATDDQTLNQAHAHVQLQIELKIQQTK  
 GTF-SI/1-1455 292 FRPLLMTWVPTKQIQAAVYLNHMVSEGLLSS..DKKFSATDDQTLNQAHAHVQLQIELKIQQTK  
 GBD-CD2/1-1102 278 MRPLITVWVPTKQIQAAVYLNHMVSEGLLSS..DKKFSATDDQTLNQAHAHVQLQIELKIQQTK  
 WcCab3-DSR/1-1401 328 YRPLIETWVPTKQIQAAVYLNHMVSEGLLSS..DKKFSATDDQTLNQAHAHVQLQIELKIQQTK

Dsr_Wcp-3a/1-1659	501	SVEWLRRTTMMHN.....FIKSPGYNVTSETPS...NDHLOGGALSINS.VLTPD.A
ASR/1-2057	511	STEWLRDAIDSFVKTA.....NWNKQTEDEAFDGLQWLQGGFLAYQDDSHRTPNTD
DSR-M/1-2065	533	STKWLLDDSIKSFIKSKRKDIQGNLVDTPGWTIDSETGS...TNHLOGGAFITNSPLVPEANA
GTF-180/1-1772	908	STDWLRRTLMHE.....FVTKNSMWNKDSENVYDYG.LQLQGGFLKYVNS.DLTKY.A
GTF-A/1-1781	907	NTDWLRRTLMHD.....FVTNNPMWNKDSENVNFS.GIQFOGGFLKYENS.DLTPY.A
GTF-SI/1-1455	352	NTNWLRTQITISA.....FVKTSAWNSDSEKPF...DDHLOGGALLYSNNSKLTSA.A
GBD-CD2/1-1102	340	GTDWLRQLLFFESQ.....NNNPSFVKKQFIWKNKDSYHGGG.DAWFOGGFLKYGNP.PLTPT.T
WcCab3-DSR/1-1401	389	STDWLRHELMMAA.....FVAIQPQWKNKSEEDEN...DDHLOGGALSFEENN.S.DTD.A

Motivo V

Dsr_Wcp-3a/1-1659	548	NSNFRRLMNRNPTQODGTR..HYN..TDTSEGGYELLLANDWDNSNPVQAEQLNWLHYLTHFGE
ASR/1-2057	563	SGNRRKLGROPIINIDG.....SKDTTDDGKSEFLLANDWDNSNPVQAEQLNWLHYLTHFGE
DSR-M/1-2065	594	AEGNRLINRTPSQOTGNHISYASQPYSGDDWGYELLLANDWDNSNPVQAEQLNWLHYLTHFGE
GTF-180/1-1772	957	NSDWRLMNRRTATNIDGKN.....YGGAEFLLANDWDNSNPVQAEQLNWLHYLTHFGE
GTF-A/1-1781	956	NSDYRLLGRMPINIKDQT.....YRGGQEFLLANDWDNSNPVQAEQLNWLHYLTHFGE
GTF-SI/1-1455	400	NSNYRILNRTPTNQTGKKDPRYT..ADRTIGGYEFLLANDWDNSNPVQAEQLNWLHYLTHFGE
GBD-CD2/1-1102	396	NSDYRQPGN.....AFDFLLANDWDNSNPVQAEQLNWLHYLTHFGE
WcCab3-DSR/1-1401	435	NSDYRRLMNRTPNQTGDR..LYH..IDDSLGGYELLLANDWDNSNPVQAEQLNWLHYLTHFGE

Motivo II

Motivo III

Dsr_Wcp-3a/1-1659	608	IVKNDP...SANFDSVRVDAVDNVDA...LLNITAAAYFRD...VYGVDKNDITANQHLSIIE...D...WGHND
ASR/1-2057	620	ITGNND...NANFDGIRVDAVDNVDA...LLKIAAGDYFKALYGTDKSDANANKHLSIIE...D...WNGKD
DSR-M/1-2065	658	ITAPQDPDAHLANFDSIRIDAVDNDVADLLQIAGDYFKAAAYQVGENDKNANKHLSIIE...D...WSPND
GTF-180/1-1772	1010	ITGNPP...BANFDGIRVDAVDNVDA...LLSIAARDYFNAAAYNMEQSDASANKHLSIIE...D...WGWDD
GTF-A/1-1781	1009	ITANNND...QANFDSVRVDAVDNVDA...LLSNIAQDYFNAAAYGMDSDAVSNKHSIIE...D...WNHAD
GTF-SI/1-1455	462	IYANDP...DANFDSIRVDAVDNVDA...LLQIAAGDYFKAAAGIHKNDKAAANDHLSIIE...D...EWSYND
GBD-CD2/1-1102	438	ITAGQD...DANFDSIRVDAVDNVDA...LHNDLIRQTYDYVLRDAYQVQSEAKANQHLSIIE...D...EAGLDAG
WcCab3-DSR/1-1401	495	ITANDP...DANFDAIRVDAVDNVDA...LLQLAAQYFREAYGMATNDATSNDHLSIIE...D...WSHND

Dsr_Wcp-3a/1-1659	668	PLYVKD.HGSDQLTMDDYMHTQLIWSLTKNPDNRRSARRRFME.....Y
ASR/1-2057	680	PQYVNVQ.QGNAQLTMDYVTSQFNGSLTHGANNRSNMWYFLDTGYLNGDLNKKIIVDKNRPNSSG
DSR-M/1-2065	722	VWYNQVNGNSQLTMDATMQNQLLASLITRPIITSRDSMKSF.....KDA
GTF-180/1-1772	1070	PAYVVK.IGNPQLTMDDRLRNAIMDTLSGAPDKNQALNKLIIT.....Q
GTF-A/1-1781	1068	PEYFNK.IGNPQLTMDDTIKNSLNHGSLSDATN.RWGLDAIVH.....Q
GTF-SI/1-1455	522	TPYLHD.DGDNMINMDNRRLSLSLYSLAKPLNRSGMNPPLIT.....N
GBD-CD2/1-1102	498	TSTI...HND.ALIESNLRREAAATLSLITNEPGKNKPLTNMLQDV.....DGGT
WcCab3-DSR/1-1401	555	PAYMND.HGNDQLTMDDYMHTQLIWSLTKSDAQRRGKMDRFLD.....F

Motivo IV

Dsr_Wcp-3a/1-1659	710	YLVDRSKDNTSDQAIIPNYEVRVAHDSEVQIVTICDITVAKLYFDVK...NSLAPSMEQLAFAAFK
ASR/1-2057	743	TLVNRRIANSQDITKVIPNYEVRVAHDYDAQDPITRKAMIDHGI...KNMQDIFT...FDQLAQGME
DSR-M/1-2065	766	LLVNRRTADNSYNQAVPNYSFVRAHDSVQVITIAKIIISDKHPDLYPTVDKALLAKDSALYDEAFT
GTF-180/1-1772	1112	SLVNRRIANDTENAVIPSYEVRVAHDSNAQDQIRQAIQAATGK.....PYGEFNLDDEKKGME
GTF-A/1-1781	1109	SLADRENNSTENVVIPNYEVRVAHDSNSQDQIQNAIRDVTGK.....DYHTFTFEDEQKQKID
GTF-SI/1-1455	564	SLVNRRTDDNAETAAVPYSFVRAHDSVQDLIRNIIIRAEINPNV...VGSYFTMEIEIKKAFE
GBD-CD2/1-1102	541	LITDHTQNSTENQATPNYSIHAHDKGVQEKVGAAITDATGA...DWNFTTDEQLKAGLE
WcCab3-DSR/1-1401	597	YLTNRRIANDNTENEAQPSYEVRVAHDSVQVITIAEIVTKLHP...EAG...NGLMPTQAQMEFAFK

Dsr_Wcp-3a/1-1659	769	VYDADMN..SVNKKYTOYNMPSAYAYAMLTKNKDTPRVIYGDMYTDDGOYMATKSPYDAISALL
ASR/1-2057	802	FYKYDQENPSGFKKYNDYNLPSAYAYAMLTKNKDTPRVIYGDMYTDDGOYMEKGTIYNPVIALL
DSR-M/1-2065	830	EYNADMQKISSQKQYTHNMPASAYAILTKNKDTPRVIYGDLYTDDGOYMANKTPIYDAITSL
GTF-180/1-1772	1169	AYINDQN..STNKKWNLNMPASAYITLTKNKDTPRVIYGDLYTDDGOYMEHKTIFYDTITNLL
GTF-A/1-1781	1166	AYIQDQN..STVKKYNLNPASAYAILTKNKDTPRVIYGDLYTDDGOYMEHKTIFYDTITNLL
GTF-SI/1-1455	623	IYNKDLL..ATEKKYTHYNTALSAYALLTKNKDTPRVIYGDLYTDDGOYMAHKTINYEAIETLL
GBD-CD2/1-1102	598	LFYKQDR..ATNKKYNSYNLPSIYALMLTKNKDTPRVIYGDLYTDDGOYMANKSIYDVALVSLM
WcCab3-DSR/1-1401	656	IYNADQK..KAVKEYTHYNMPASAYAMLTKNKDTPRVIYGDLYTDDGOYMATKSPYFDAIDALL

Dsr_Wcp-3a/1-1659	831	KARIKYVAGGQTM...VD...KHDILTSVRFEGDGIMNAS...DKGSTTARTQIGIVIVS
ASR/1-2057	866	KARIKYVAGGQTMATDSSGKDLKDGEDLLTSVRFEGKIMTSDQTTTQDNSQDYKNOGIGVIVG
DSR-M/1-2065	894	TARTKFFVSGGQSLSDV...KNDVLTSVRYGKALSAT...DNGSSDTRNOGIGVIVS
GTF-180/1-1772	1231	KTRVKYVAGGQTM...KNGILTNVRFEGKAMNAT...DTGTDETRTEGIGVIVS
GTF-A/1-1781	1228	KSRVKYVAGGQTM...GNNILTSVRYGKAMTAT...DTGTDETRTEGIGVIVS
GTF-SI/1-1455	685	KARIKYVAGGQTM...NSEIITSVRYGKALKAT...DTGDRTRTEGVAIEG
GBD-CD2/1-1102	660	TARKSYVAGGQTM...NHGLLKSVRFGKAMTAN...DLGTSARTTEGLVIVIG
WcCab3-DSR/1-1401	718	KARTKYVAGGQTM...VD...KNDVLTSVRFEGKAMTVN...DAGTAETRTGIVIVS

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 882 **NNDALAL.KGDITVTLHMGTAHANQAYRALLLTTDGLMKYITSDNG..APIR...YTDANGDLIF**  
 ASR/1-2057 930 **NNPDKLKNNDKTIITLHMGRAHKNOQYRALVLSNDSGITDVEDSDDK..APTL...RNDNDGDLIF**  
 DSR-M/1-2065 945 **NNPNLDLNNDK.VTLSMGTSHAHQAYRPLLLTNSQGITVAYATDSE..VPONLYKTNDKGGELTF**  
 GTF-180/1-1772 1282 **NNTNLLKLDNGE.SVVLHMGAAHKNOQYRAVLLTTEDEGVKNYNTDND..APVA...YTDANGDLIF**  
 GTF-A/1-1781 1283 **NTPNLKLKLGANDKVVVHMGAAHKNOQYRAAVLTITDGVINYTSDQG..APVA...MTDENGDLYL**  
 GTF-SI/1-1455 739 **NNPSLRLKASDRVVVNMGAAHKNOQYRPLLLTNDNGIKAYHSDQEAAGLV...YTDNDGGELIF**  
 GBD-CD2/1-1102 711 **NDPKLLQLNDSDKVTLDMGAAHKNOQYRAVLLTTRDGLATFNSDQ...APTA...WTNDQGTLIF**  
 WcCab3-DSR/1-1401 769 **NNHDLKMGADSDQVVLHMGTAHANQAEFRAVIMTTATGLAVYND.DN..ABIR...YTDANGDLIF**

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 940 **TSADI.....KGYQNVESGFLSVWVWVPGASDTQDARATGSSA.ANKRTGDTLHNSNA**  
 ASR/1-2057 989 **HKTNTFFVKQDGTIINYEMKGSLNALISGVLGVWVWVPGASDSODARTVATESSSSNDGSVFHSNA**  
 DSR-M/1-2065 1006 **D.....ASEIKGYDVTQTSGLAVWVWVPGASDEQDARTIASTE.KNNGNSVYHSNA**  
 GTF-180/1-1772 1341 **TNTNLD...GQ.QYTAVRGYANPDVTGFLAVWVWVPGAAADDQDARTAPSE.AHTTKTAYRSNA**  
 GTF-A/1-1781 1342 **SSHNLVVNGKEE.ADTAVQGYANPDVSGYLAWVWVPGASDNQDARTAPSTE.KNSGNSAYRTNA**  
 GTF-SI/1-1455 800 **TAADI.....KGYANPQVSGYLVWVWVPGAAADDQDVRTAASTA.PSTDGKSVHONA**  
 GBD-CD2/1-1102 769 **SNQEIN...GQ.DNTQIRGYANPQVSGYLAWVWVPGASDNQDARTAAATT.ENHDKVLSHNSNA**  
 WcCab3-DSR/1-1401 827 **TNKDV.....YGVLPNPOVSGFLAVWVWVPGASATQDARTAASTE.ATTDGSAYHSNA**

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 990 **AIDSNVIYEGFSNFQEMPTH...DEFTNVKTAQNADLFLKSWGVTSTFOLAPOYRSSDDETSE...**  
 ASR/1-2057 1053 **AIDSNVIYEGFSNFQAMPTSP...EQSTNVVIAATKANLFLKELGITSTFOLAPOYRSSGDTNYGGM**  
 DSR-M/1-2065 1056 **AIDSNLIYEGFSNFQVTPSKNASADEYANVIAAKHAADFNKVGVTSTFOLAPOYRSSDGTGSLD.**  
 GTF-180/1-1772 1399 **AIDSNVIYEGFSNFQIYWPTTE...SERINVRTAQNADLFLKSWGITTFELAPOYRSSKDGTF...**  
 GTF-A/1-1781 1404 **AIDSNVIFEGFSNFVYPTRE...SERANVRTAQNADFLASLGFSTFEMAPOYRSSKDRTF...**  
 GTF-SI/1-1455 850 **AIDSRVMFEGFSNFQAFATKK...EETNVVIAAKNVDKFAEWGVTDFEMAPOYRSSDGTGSE...**  
 GBD-CD2/1-1102 827 **AIDSNLIYEGFSNFQPKATTH...DELTNVVIAAKNADVFNNWGVTSTFEMAPOYRSSGDHIF...**  
 WcCab3-DSR/1-1401 877 **AIDSOVIFEGFSNFQAMPTTH...DEYTNVVLAKHADLLTDWGVTSVQLAPOYRSSDGTGTF...**

Motivo I

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1048 **.LDSITIKNGYAFTDRYDLGFN.....TPTKYGDVDDLADAIRAMHSV.....GIQVMADV**  
 ASR/1-2057 1114 **SFLDSFLNNGYAFTDRYDLGFNAKADGNPPTKYGTDQDLRINAIEALHKN.....GMQAIADWV**  
 DSR-M/1-2065 1119 **..AVDVTONGYAFTDRYDLGFNAADGSKNPTKYGTDQDLRINAIKSIHAQKTYDGS.SIQVMADV**  
 GTF-180/1-1772 1457 **..LDSITIDNGYAFTDRYDLGMS.....TPNKYGSDEDLRNALQALHKA.....GLQAIADWV**  
 GTF-A/1-1781 1462 **..LDSITIDNGYAFTDRYDLGMS.....EPNKYGTQDLRINAQALHKA.....GLQVMADV**  
 GTF-SI/1-1455 908 **..LDSVIQNGYAFTDRYDLGIS.....KPNKYGTADDLVKAIKALHKA.....GIKVMADV**  
 GBD-CD2/1-1102 885 **..LDSITIDNGYAFTDRYDLGFN.....TPTKYGTDQDLRATIQAALHHA.....NMQVMADV**  
 WcCab3-DSR/1-1401 935 **..LDSITIDNGYAFTDRYDLGFN.....TPTKYGDNDLRLDVIKAIHAN.....GIQVMADV**

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1098 **PDQIYNLPQGEVAVNRITNNEGTPNQSDLQNLQLYVTNSKGGGEYOAKYGGEFLLDLRL..EH**  
 ASR/1-2057 1172 **PDQIYNLPQGEVVATRVVDERGNQLNKDFVNLLYVANTKSSGVVDYOAKYGGEFLLDKLRE..EY**  
 DSR-M/1-2065 1181 **PDQIYNMPLEQAVSVIRTDKYGKNSENPDIIYAANIKSSGTDYOISLYGGKYLAELOKPNLF**  
 GTF-180/1-1772 1507 **PDQIYNLPQGEAVTVTRSDDHGTWEVSPVKNVVYITNTIG.GGEYOAKYGGEFLLDTLQK..EY**  
 GTF-A/1-1781 1512 **PDQIYNLPQGEVAVTVRVDDRGNVWKDAITNNNLYVVNTIG.GGEYOAKYGGAFLLDKLQK..LY**  
 GTF-SI/1-1455 958 **PDQIYNLPQGEVAVTVRVVDRGNVWVSKIKNTLYVVDGKSSGKDDOAKYGGAFLEELQA..KY**  
 GBD-CD2/1-1102 935 **DNQVYNLPQGEVAVTVRAGVYGNDD.ATGFGTQLYVVTNSVGGQYQEKYAGQYLEALKA..KY**  
 WcCab3-DSR/1-1401 985 **PDQIYNLPQGEVAVTVRITNNEGEPDKNSPDIQLHMYVTSTRG.GGEYOAKYGGEFLLAKLRE..LY**

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1159 **PDFLFTTNQI.....STGVPIDGSTIKKQWSAKYNGSDIQGKGAAYVVLK**  
 ASR/1-2057 1234 **PSLFKQNV.....STGQPIDASTIKKQWSAKYNGTNIILHRGAGYVVLK**  
 DSR-M/1-2065 1245 **KSFLFDRIQI.....STKKTIDPNTRIITQWSAKYNGSNIQGGKINYYVLK**  
 GTF-180/1-1772 1568 **PQLFSQVYP.....VTQTTIDPSVKIKQWSAKYNGTNIILHRGAGYVLR**  
 GTF-A/1-1781 1573 **PEIFTKKQV.....STGVAIDPSQKITQWSAKYNGTNIILHRGAGYVLR**  
 GTF-SI/1-1455 1020 **PELFAARKQI.....STGVPMDPSVKIKQWSAKYNGTNIILGRGAGYVLR**  
 GBD-CD2/1-1102 995 **PDLFEGKAYDYWKYANDGSNPYTTLSHGDRESIPADVAIKQWSAKYNGTNIILVNGMGYVVLK**  
 WcCab3-DSR/1-1401 1046 **PDLFFTTNQY.....STGKPIDSVKIKQWSAKYNGTAIQGRGAGYVLR**

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1203 **DGASQEYFKITSNANDESFPFKQFMNQ.....DAMTGFITTD.EKGTYYSTSGYQAKQSF**  
 ASR/1-2057 1278 **DWATNQYFNIAKTNEVF..LPLQLQNK.....DAQTGFISD.ASGVKYYSISGYQAKDFTFI**  
 DSR-M/1-2065 1289 **DWASNKYNFNSSNDDMYSRLPKQLMNQ.....ESNTGFIVD.DIGVKYYSISGYQAKNTFV**  
 GTF-180/1-1772 1612 **SN.DGKYNNLGTST..TQFLPQLSVQDNEGY.....GFVKE.GNNYHYDENKQMVKDAFI**  
 GTF-A/1-1781 1617 **AD.GGQYNNLGTST..TKQFLPQLLTGPKKQGN.....EGFVKNGDGNYYFYDLAGNMVKNTFI**  
 GTF-SI/1-1455 1064 **DQATNTYFSLVS...DNITFLPKSLVNPNHGTS...SSVTGLVFD.GKGYVYYSITSGNQAKNAFI**  
 GBD-CD2/1-1102 1059 **DWHNGQYFKLDGD..KSTL.PQIKGELKLEGKPIPNNLLGLDSTRG.....**  
 WcCab3-DSR/1-1401 1090 **DAGNNSYRVVTANTGN.TNLPNQMLGK.....PVMTGFHKL.ADGYHFETLSSVATDAFI**

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1258 **QGDDGQYFFDADGYMVITGSQ.....TIN.....GKQYFFLPNGVELREAFQNASGNNTVYY**  
 ASR/1-2057 1331 **EDGNGNWYFFDKDGYMVRSGQGENPRTVETSVNTRNGNYVYFMPNGVELRKGFGTDSGNVYFF**  
 DSR-M/1-2065 1344 **EDRNGEYFFDNDGYMVKSTEESSGPLRTVNA.....SSKYYILPNGVELRNSFGQDQIGNTYFF**  
 GTF-180/1-1772 1665 **QDSVGNWYFFDKGNMVAANQS.....PVIEISSNGASGYTLFLNNGTFSRGLVKTADG.TYFF**  
 GTF-A/1-1781 1672 **EDSVGNWYFFDKGQMKVENKH.....FVDVDSYGEKGTYYFFLNGVSVRGGVLQTDNG.TYFF**  
 GTF-SI/1-1455 1121 **SLG.NNWYFFDNNGYMVTGAQ.....SIN.....GANYYFLSNGIQLRNAIYDNGKVLSSYY**  
 GBD-CD2/1-1102 .....  
 WcCab3-DSR/1-1401 1144 **KDDNGELYFFDENSMVMTGKQ.....TRH.....GSQYFFLPNGIALTDAFVEAEDGNMQYY**

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1310 GKTGS<sup>AVK</sup>SKYVVDQSGATY<sup>YFDVN</sup>GN<sup>MV</sup>ADRMMLDGH<sup>TQ</sup>YFFAGGSQAKDQFLIGADGNLRY  
 ASR/1-2057 1395 DDQ<sup>GK</sup>MV<sup>RD</sup>KYI<sup>INDDANNF</sup>YHLNVD<sup>GT</sup>MSRGLFKFDS<sup>DTL</sup>QYFFASNGVQIKDSYAKDSKGNKYY  
 DSR-M/1-2065 1404 DAR<sup>GEMV</sup>TSQYI<sup>SDDTQNI</sup>Y<sup>YFNND</sup>GT<sup>MA</sup>KGLIQLNT.NLQYFGTNGAQ<sup>LK</sup>GAYVHDISSDKWY  
 GTF-180/1-1772 1722 DGD<sup>GRMV</sup>R<sup>NQ</sup>TVSDG.AMTYVLDEN<sup>GK</sup>L<sup>V</sup>SESF<sup>DSS</sup>ATEAH<sup>PL</sup>KPGDLN<sup>GQ</sup>K.....  
 GTF-A/1-1781 1729 DNY<sup>GK</sup>MV<sup>RN</sup>Q<sup>TI</sup>INAG.AMIY<sup>TLDEN</sup><sup>GK</sup>L<sup>I</sup>KASYN<sup>S</sup>DAEY<sup>PT</sup>STDV<sup>GK</sup>MLD<sup>Q</sup>NKL.....  
 GTF-SI/1-1455 1172 GND<sup>GR</sup>RYE<sup>NG</sup>Y<sup>Y</sup>LF<sup>GQ</sup>QWR<sup>Y</sup>.FQNG<sup>IM</sup>AVGL<sup>TR</sup>IHGAV<sup>Q</sup>YFDASGFQAKGQFITADGKLYR  
 GBD-CD2/1-1102 .....  
 WcCab3-DSR/1-1401 1196 DKN<sup>GK</sup>L<sup>V</sup>V<sup>N</sup>Q<sup>Y</sup>V<sup>Y</sup>TDHQANA<sup>E</sup>RVDAD<sup>GN</sup>V<sup>I</sup>RSQAL<sup>T</sup>VDGND<sup>Q</sup>YFGSNGVQAKAQLVRDANGQAHY

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1374 FDQSGSNMVT...NRF<sup>AVNR</sup>NGD<sup>W</sup>FY<sup>F</sup>ENG<sup>D</sup>GIAL<sup>K</sup>GW<sup>Q</sup>T.....IAGKTYFF.....  
 ASR/1-2057 1459 FDSATGNNDTGKAQTWDG..NGYYITIDSDANNTIGVNTDY<sup>TAY</sup>ITSS<sup>RED</sup>DGLFANAPYGVVT  
 DSR-M/1-2065 1467 QFDAGSGNGRQLTQRPDDVNANNYIS..IDSSSNIGVNTDY<sup>TAY</sup>ITSS<sup>RED</sup>DGLFANAPYGVVT  
 GTF-180/1-1772 .....  
 GTF-A/1-1781 .....  
 GTF-SI/1-1455 1233 FDRD<sup>SGN</sup>QIS...NRFV<sup>RNS</sup>KGEW<sup>F</sup>LFDH<sup>NG</sup>VAVTGTVT.....FNGQRLYF.....  
 GBD-CD2/1-1102 .....  
 WcCab3-DSR/1-1401 1260 YAAGNGNMIK...RQFILD<sup>T</sup>DGH<sup>W</sup>LYADQNGN<sup>L</sup>ARGMTT.....INQDTLYF.....

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1418 .DET<sup>GK</sup>QLK<sup>D</sup>TFIP<sup>NG</sup>NT.ISY<sup>L</sup>NG<sup>T</sup>DG<sup>T</sup>KV<sup>V</sup>NELI.HSH<sup>D</sup>H<sup>W</sup>YLAD<sup>NN</sup>GN<sup>L</sup>V<sup>S</sup>G<sup>F</sup>K<sup>P</sup>F<sup>NG</sup>K<sup>S</sup>Y  
 ASR/1-2057 1521 KDQNGNDLKWQYINHT...KQYEGQ.QVQVTRQY<sup>T</sup>DSK<sup>G</sup>V<sup>SW</sup>NLIT<sup>F</sup>AGGDLQ.....GQRL  
 DSR-M/1-2065 1529 KDQNGNDLKWQYINHT...KQYEGQ.QVQVTRQY<sup>T</sup>DSK<sup>G</sup>V<sup>SW</sup>NLIT<sup>F</sup>AGGDLQ.....GQKL  
 GTF-180/1-1772 .....  
 GTF-A/1-1781 .....  
 GTF-SI/1-1455 1277 .KPNGVQAKGEFIRDADGHLRY<sup>Y</sup>DPNSGNEV<sup>R</sup>NR<sup>F</sup>V<sup>R</sup>NSKGEW<sup>F</sup>LFDH<sup>NG</sup>I<sup>AV</sup>TGTRV<sup>V</sup>NGQRL  
 GBD-CD2/1-1102 .....  
 WcCab3-DSR/1-1401 1304 .DDQNHQVKDDFVYDADG.VHYFNGTNGAEV<sup>K</sup>NDYA.YHNGK<sup>W</sup>Y<sup>F</sup>DENGRM<sup>V</sup>TGLQ<sup>T</sup>INGELR

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1479 YFDKITHVMTNARVQDSNNTVYYNA.....NGEQV<sup>S</sup>NTWVE.  
 ASR/1-2057 1574 WVDSRAL<sup>T</sup>MTPFK<sup>T</sup>MN<sup>Q</sup>I..SFI<sup>S</sup>YAN<sup>R</sup>NDGL<sup>F</sup>LNAPYQ<sup>V</sup>KGY<sup>Q</sup>LAGMS<sup>N</sup>OYK<sup>G</sup>Q<sup>V</sup>TIAGVAN  
 DSR-M/1-2065 1582 WVDSRAL<sup>T</sup>MTPFK<sup>T</sup>MN<sup>Q</sup>I..SFI<sup>S</sup>YAN<sup>R</sup>NDGL<sup>F</sup>LNAPYQ<sup>V</sup>KGY<sup>Q</sup>LAGMS<sup>N</sup>OYK<sup>G</sup>Q<sup>V</sup>TIAGVAN  
 GTF-180/1-1772 .....  
 GTF-A/1-1781 .....  
 GTF-SI/1-1455 1340 YFKSNGVQAKGELITE..RKGR<sup>I</sup>K<sup>Y</sup>YDPN.....SGNEV<sup>R</sup>NR<sup>Y</sup>YV<sup>R</sup>.  
 GBD-CD2/1-1102 .....  
 WcCab3-DSR/1-1401 1365 YFGADGSQ<sup>L</sup>KGGQ<sup>A</sup>TN<sup>Q</sup>ET.HQTYV<sup>F</sup>DAT.....NGSG.....

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1518 NDDSTWSYFG.....NDGGMLTGLQ.  
 ASR/1-2057 1636 VSGKDWSLISFNGTQY<sup>W</sup>IDS<sup>Q</sup>ALNT<sup>N</sup>F<sup>T</sup>HDM<sup>N</sup>Q<sup>K</sup>V<sup>F</sup>VNT<sup>T</sup>SNLDGL<sup>F</sup>LNAPY<sup>R</sup>Q<sup>P</sup>GY<sup>K</sup>LAGLAK  
 DSR-M/1-2065 1644 VSGKDWSLISFNGTQY<sup>W</sup>IDS<sup>Q</sup>ALNT<sup>N</sup>F<sup>T</sup>HDM<sup>N</sup>Q<sup>K</sup>V<sup>F</sup>VNT<sup>T</sup>SNLDGL<sup>F</sup>LNAPY<sup>R</sup>Q<sup>P</sup>GY<sup>K</sup>LAGLAK  
 GTF-180/1-1772 .....  
 GTF-A/1-1781 .....  
 GTF-SI/1-1455 1378 TSSGNWY<sup>Y</sup>FG.....NDGYALIGWH.  
 GBD-CD2/1-1102 .....  
 WcCab3-DSR/1-1401 1397 .....QLVTI..

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1538 .....TVNNQ<sup>T</sup>VY<sup>F</sup>FDADGR<sup>V</sup>KAAADKAK<sup>NN</sup>ID.....QATTADSIN..DA...  
 ASR/1-2057 1700 NYNNQ<sup>T</sup>V<sup>T</sup>VSQ<sup>Y</sup>FDDQ<sup>G</sup>TV<sup>W</sup>SQ<sup>V</sup>VLGG<sup>Q</sup>TV<sup>W</sup>V<sup>D</sup>NHALAQ<sup>M</sup>Q<sup>V</sup>SD<sup>T</sup>DQ<sup>L</sup>YV<sup>N</sup>SNG<sup>R</sup>NDGL<sup>F</sup>LN  
 DSR-M/1-2065 1708 NYNNQ<sup>T</sup>V<sup>T</sup>VSQ<sup>Y</sup>FDDQ<sup>G</sup>TV<sup>W</sup>SQ<sup>V</sup>VLGG<sup>Q</sup>TV<sup>W</sup>V<sup>D</sup>NHALAQ<sup>M</sup>Q<sup>V</sup>RD<sup>T</sup>NQ<sup>L</sup>YV<sup>N</sup>SNG<sup>R</sup>NDGL<sup>F</sup>LN  
 GTF-180/1-1772 .....  
 GTF-A/1-1781 .....  
 GTF-SI/1-1455 1398 .....VVEGR<sup>R</sup>VY<sup>F</sup>DENGV<sup>Y</sup>RASHD<sup>Q</sup>RN.HWD.....YDYRRD.FG..RG...  
 GBD-CD2/1-1102 .....  
 WcCab3-DSR/1-1401 .....

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1577 .....QAT...G.IPDIDNQHVP<sup>G</sup>TSVDN<sup>Q</sup>KQAEK<sup>V</sup>TEDIK<sup>N</sup>DPDN<sup>K</sup>TLPEA<sup>I</sup>ELP<sup>N</sup>TGV<sup>D</sup>KTE  
 ASR/1-2057 1764 APYRGQGSQ<sup>L</sup>IGMTADY<sup>NG</sup>HV<sup>Q</sup>VTK.....QGQDAY.....GAQWRLITLNNQ<sup>V</sup>WV.D  
 DSR-M/1-2065 1772 APYRGQGSQ<sup>L</sup>IGMTADY<sup>NG</sup>HV<sup>Q</sup>VTK.....QGQDAY.....GAQWRLITLNNQ<sup>V</sup>WV.D  
 GTF-180/1-1772 .....  
 GTF-A/1-1781 .....  
 GTF-SI/1-1455 1435 .....S.SSAV<sup>R</sup>FR<sup>H</sup>SRNG<sup>F</sup>FDN<sup>F</sup>FRF.....  
 GBD-CD2/1-1102 .....  
 WcCab3-DSR/1-1401 .....

Dsr\_Wcp-3a/1-1659 1632 SITITGVVMLILTTIFGLLFTSKKHKKD.....  
 ASR/1-2057 1813 SRALST...TIMQAMNDNMYV<sup>N</sup>SSQ<sup>R</sup>TDGL<sup>W</sup>LNAPY<sup>T</sup>MSGAK<sup>W</sup>AGD<sup>T</sup>RSANG<sup>R</sup>YV<sup>H</sup>ISKAY<sup>S</sup>NE  
 DSR-M/1-2065 1821 SRALST...TIMQAMNDNMYV<sup>N</sup>SSQ<sup>R</sup>TDGL<sup>W</sup>LNAPY<sup>T</sup>MSGAK<sup>W</sup>AGD<sup>T</sup>RSANG<sup>R</sup>YV<sup>H</sup>ISKAY<sup>S</sup>NE  
 GTF-180/1-1772 .....  
 GTF-A/1-1781 .....  
 GTF-SI/1-1455 .....  
 GBD-CD2/1-1102 .....  
 WcCab3-DSR/1-1401 .....

Dsr_Wcp-3a/1-1659		.....
ASR/1-2057	1874	VGNTYYLTNLNGQSTWIDKRAFTVTFDQVVALNATIVARQRPDGMFKTAPYGEAGA QFVDYVTN
DSR-M/1-2065	1882	VGNTYYLTNLNGQSTWIDKRAFTATFDQVVALNATIVARQRPDGMFKTAPYGEAGA QFVDYVTN
GTF-180/1-1772		.....
GTF-A/1-1781		.....
GTF-SI/1-1455		.....
GBD-CD2/1-1102		.....
WcCab3-DSR/1-1401		.....

Dsr_Wcp-3a/1-1659		.....
ASR/1-2057	1938	YNQQTVPVTKQHSDAQGNQWYLATVNGTQYWIDQRSFSPVVTKVVDYQAKIVPRTTRDGVFSGA
DSR-M/1-2065	1946	YNQQTVPVTKQHSDAQGNQWYLATVNGTQYWIDQRSFSPVVTKVVDYQAKIVPRTTRDGVFSGA
GTF-180/1-1772		.....
GTF-A/1-1781		.....
GTF-SI/1-1455		.....
GBD-CD2/1-1102		.....
WcCab3-DSR/1-1401		.....

Dsr_Wcp-3a/1-1659		.....
ASR/1-2057	2002	PYGEVNAKLVNMATAYQNQVVHATGEYTNASGITWSQFALSGQEDKLWIDKRALQA
DSR-M/1-2065	2010	PYGEVNAKLVNMATAYQNQVVHATGEYTNASGITWSQFALSGQEDKLWIDKRALQA
GTF-180/1-1772		.....
GTF-A/1-1781		.....
GTF-SI/1-1455		.....
GBD-CD2/1-1102		.....
WcCab3-DSR/1-1401		.....

## 9.2 Anexo B: Técnicas 2D RMN

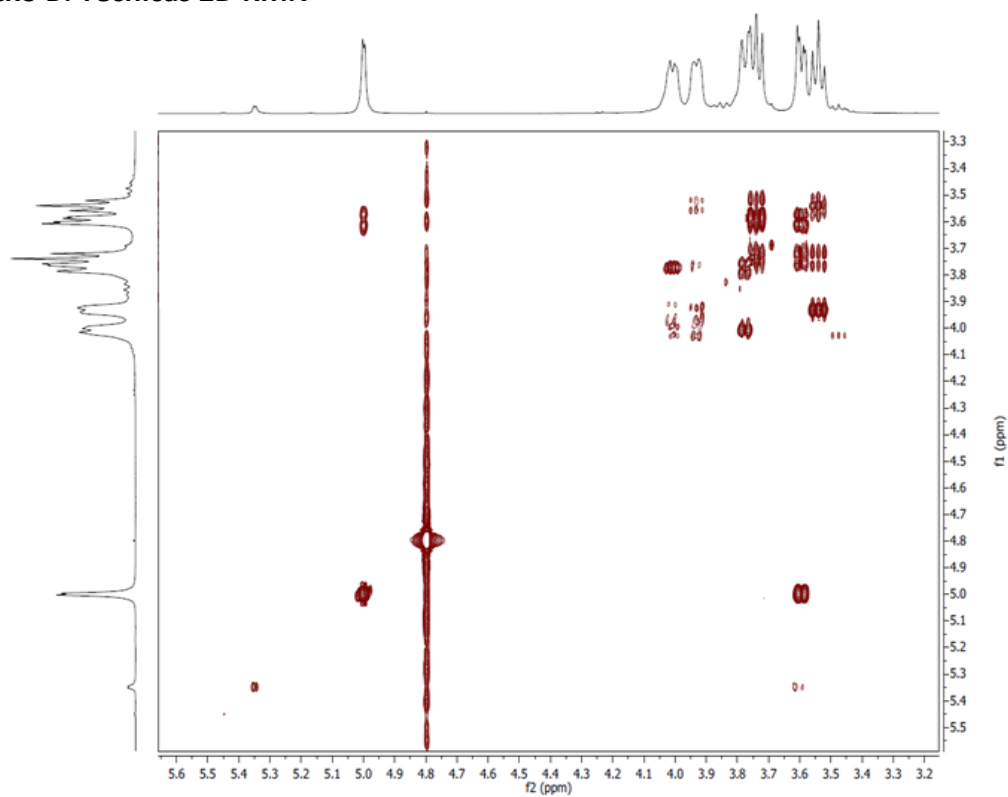


Figura b1. Espectro COSY de la dextrana de Dsr\_Wcp-3a.

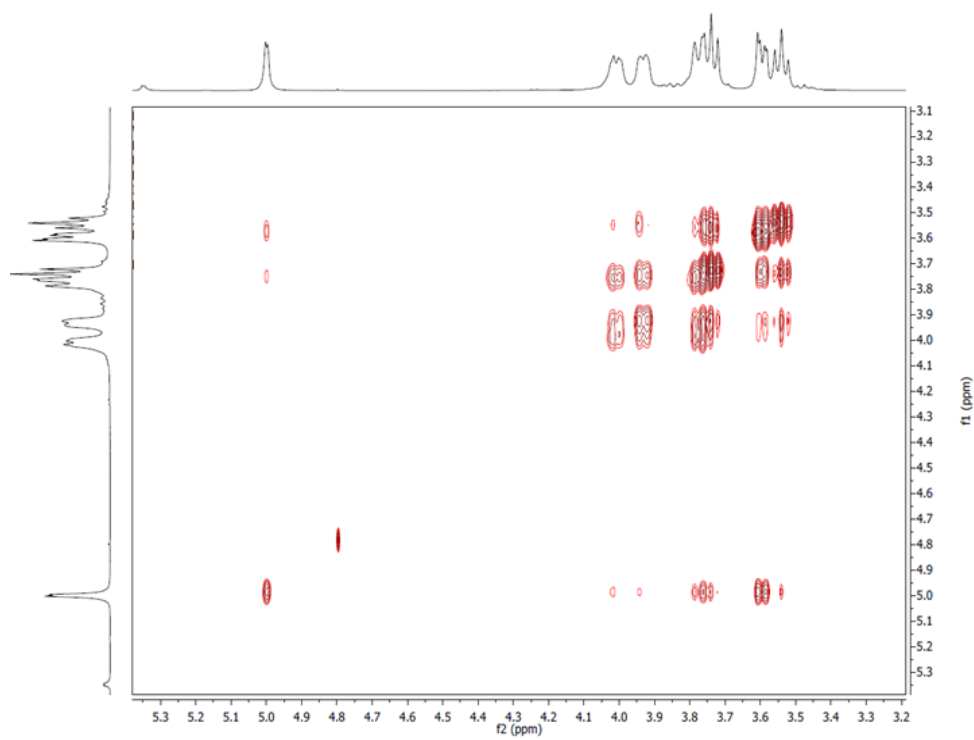


Figura b2. Espectro NOESY de la dextrana de Dsr\_Wcp-3a.

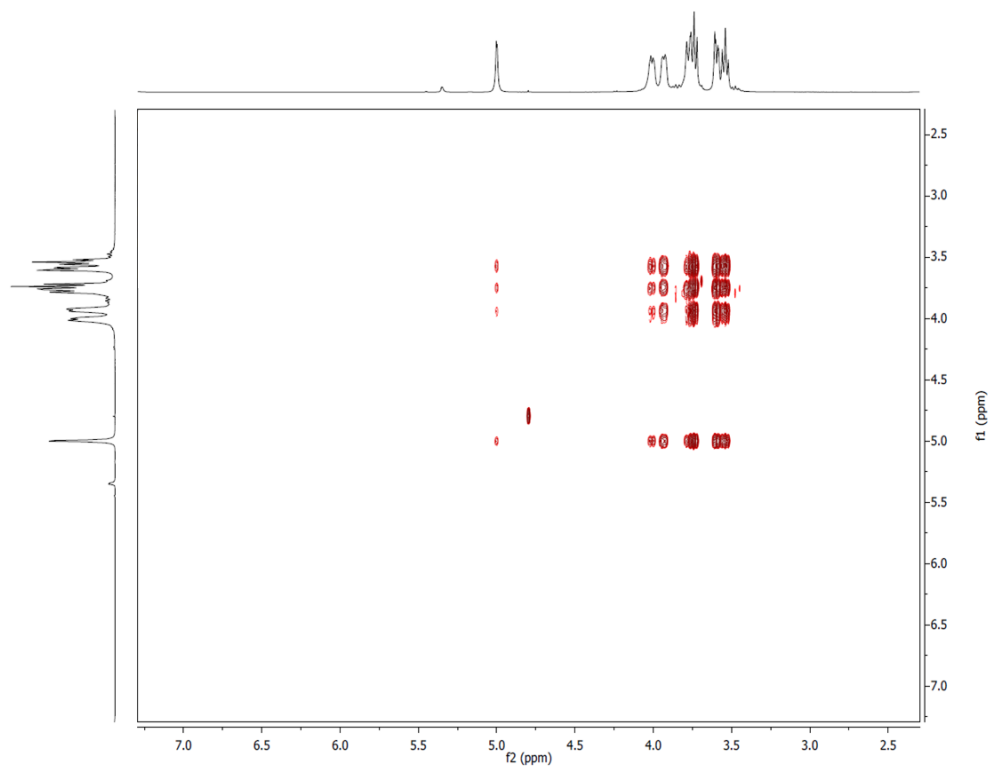


Figura b3. Espectro TOCSY de la dextrana de Dsr\_Wcp-3a.

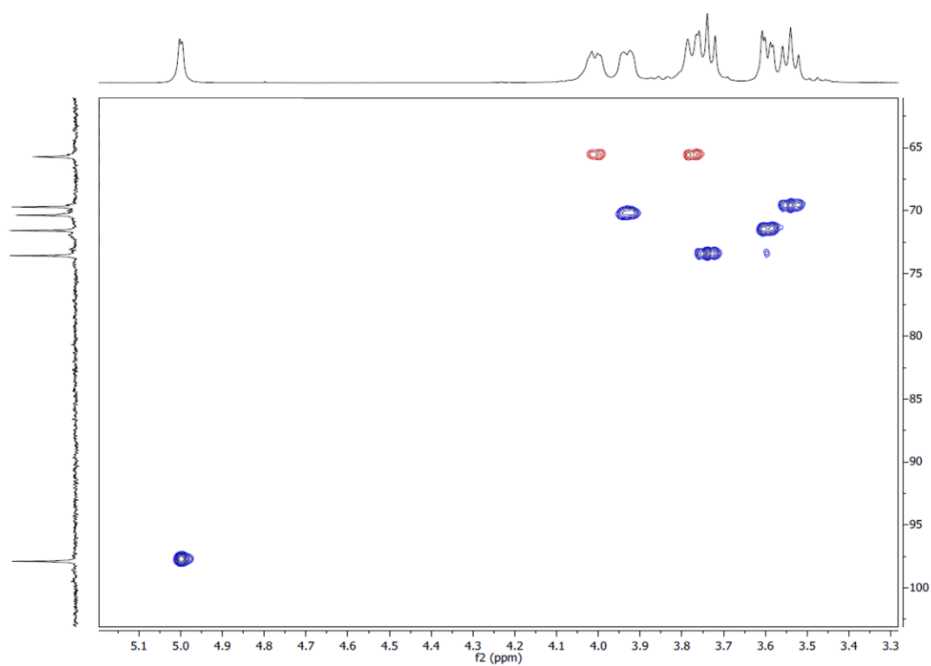


Figura b4. Espectro HSQC de la dextrana de Dsr\_Wcp-3a.



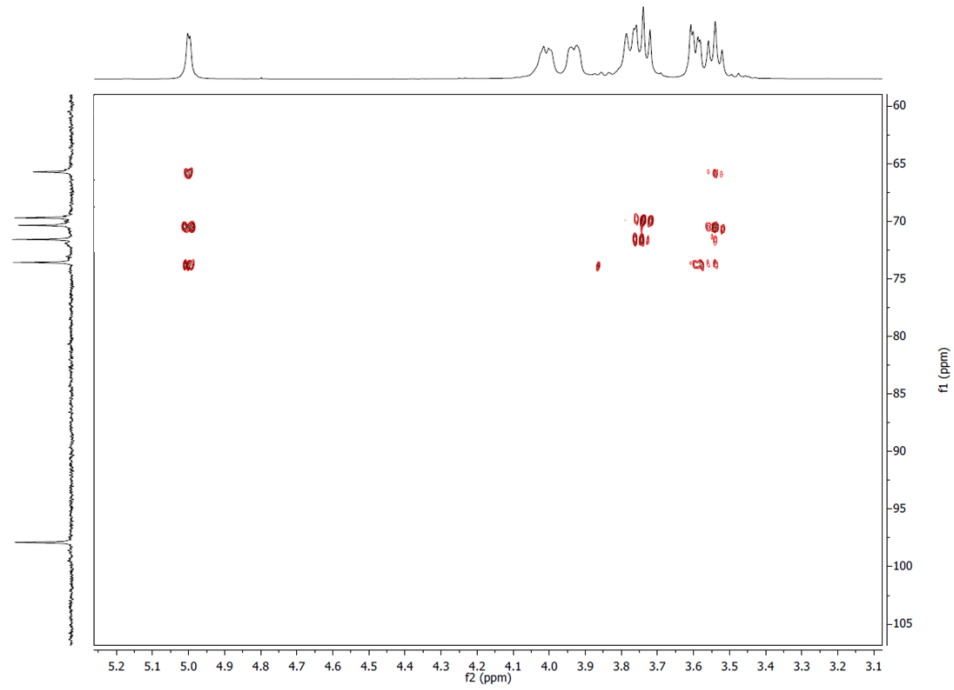


Figura b5. Espectro HMBC de la dextrana de Dsr\_Wcp-3a.

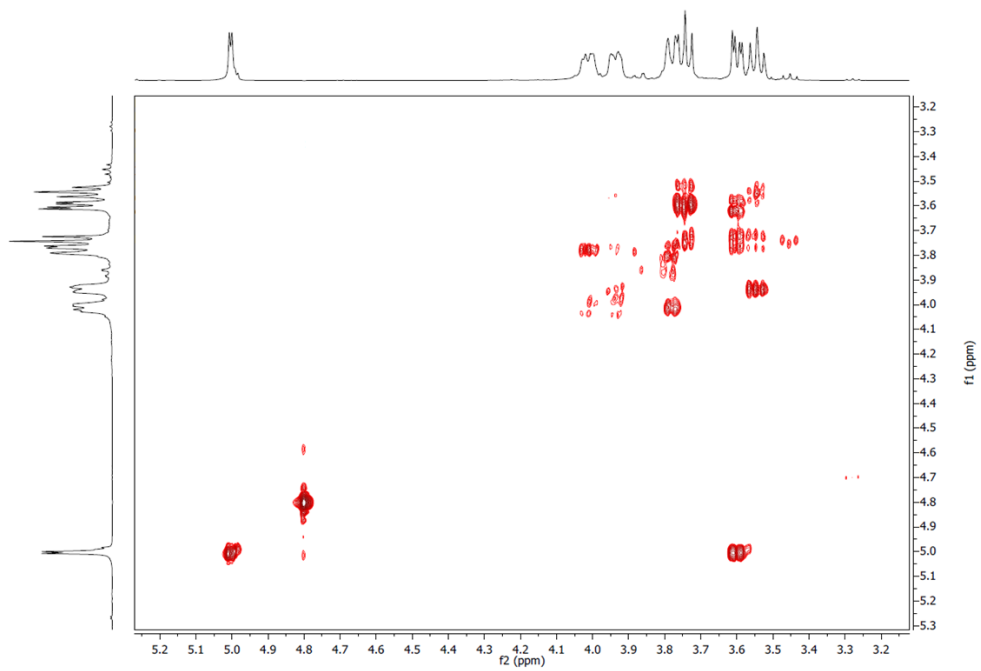


Figura b6. Espectro COSY de la dextrana de B-512F.

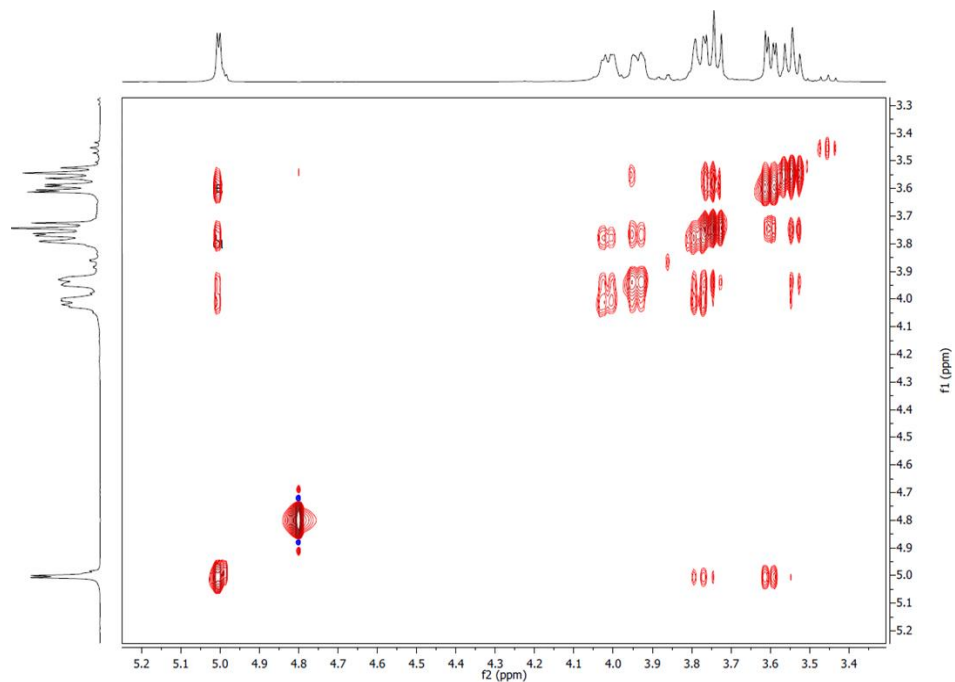


Figura b7. Espectro NOESY de la dextrana de B-512F.

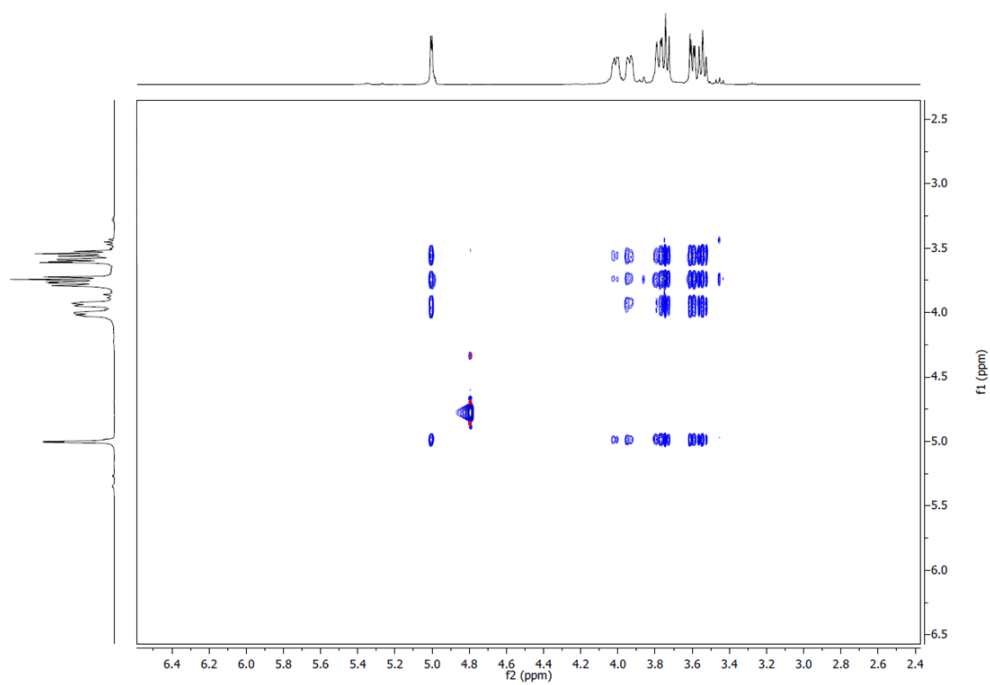


Figura b8. Espectro TOCSY de la dextrana de B-512F.

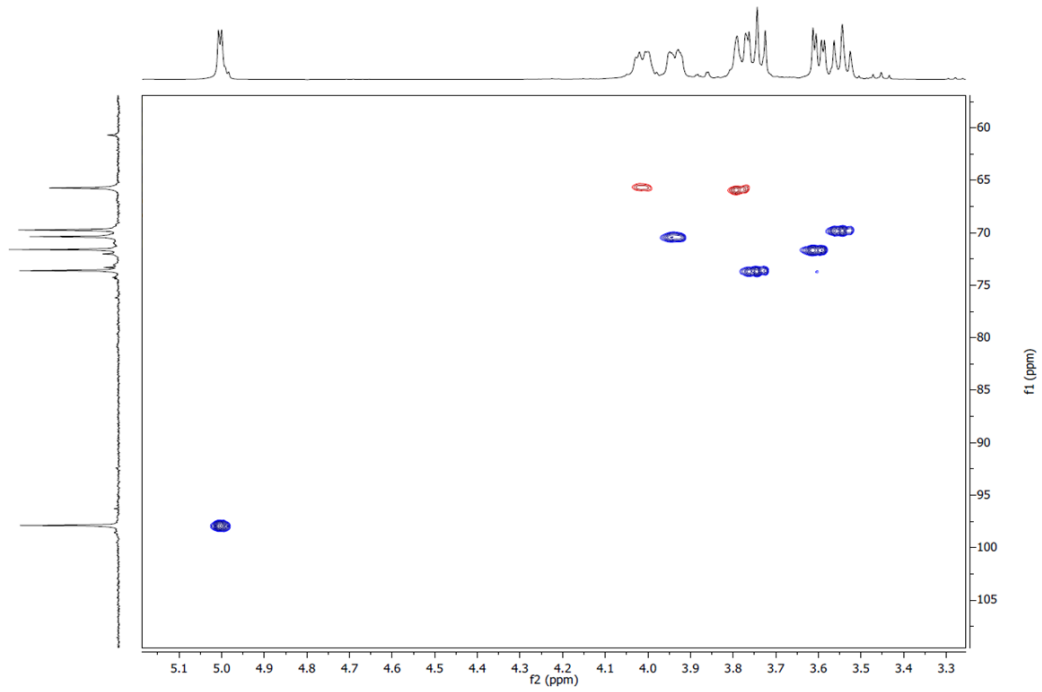


Figura b9. Espectro HSQC de la dextrana de B-512F.

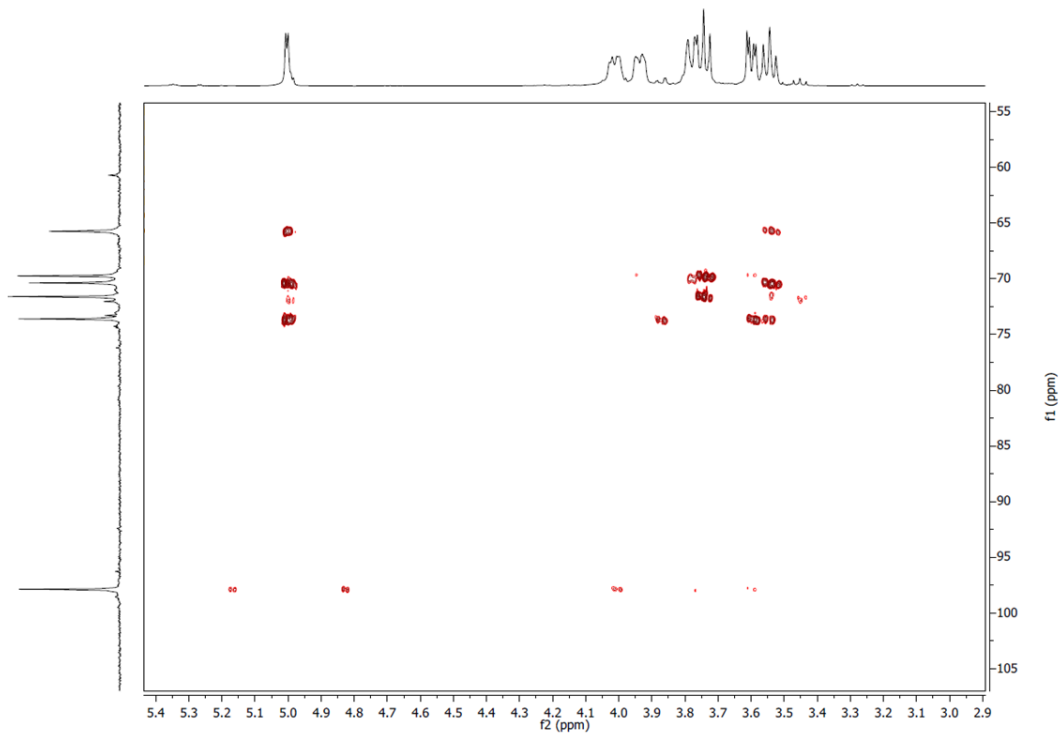


Figura b10. Espectro HMBC de la dextrana de B-512F.

## 10. Bibliografía

- Adesulu-Dahunsi, A. T., Sanni, A. I., Jeyaram, K., Ojediran, J. O., Ogunsakin, A. O., and Banwo, K. (2018). Extracellular polysaccharide from *Weissella confusa* OF126: Production, optimization, and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 514-525.
- Ahmed, R. Z., Siddiqui, K., Arman, M., and Ahmed, N. (2012). Characterization of high molecular weight dextran produced by *Weissella cibaria* CMGD3. *Carbohydrate Polymers*, 90(1), 441-446.
- Amari, M., Arango, L. F. G., Gabriel, V., Robert, H., Morel, S., Moulis, C., ... Fontagné-Faucher, C. (2013). Characterization of a novel dextransucrase from *Weissella confusa* isolated from sourdough. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(12), 5413-5422.
- André, I., Potocki-Véronèse, G., Morel, S., Monsan, P., and Remaud-Simeon, M. (2010). Sucrose-Utilizing Transglucosidases for Biocatalysis. En A. P. Rauter, P. Vogel, and Y. Queneau (Eds.), *Carbohydrates in Sustainable Development I* (pp. 25-48).
- Baruah, R., Maina, N. H., Katina, K., Juvonen, R., and Goyal, A. (2017). Functional food applications of dextran from *Weissella cibaria* RBA12 from pummelo (*Citrus maxima*). *International Journal of Food Microbiology*, 242, 124-131.
- Bejar, W., Gabriel, V., Amari, M., Morel, S., Mezghani, M., Maguin, E., ... Chouayekh, H. (2013). Characterization of glucansucrase and dextran from *Weissella* sp. TN610 with potential as safe food additives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, 125-132.
- Belinky, F., Rogozin, I. B., and Koonin, E. V. (2017). Selection on start codons in prokaryotes and potential compensatory nucleotide substitutions. *Scientific Reports*, 7(1), 12422.
- Bivolarski, V., Vasileva, T., Gabriel, V., and Iliev, I. (2018). Synthesis of glucooligosaccharides with prebiotic potential by glucansucrase URE 13–300 acceptor reactions with maltose, raffinose and lactose. *Engineering in Life Sciences*, 18(12), 904-913.
- Bounaix, M. S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Simeon, M., ... Fontagné-Faucher, C. (2009). Biodiversity of Exopolysaccharides Produced from Sucrose by Sourdough Lactic Acid Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10889-10897.

- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Besrouer-Aouam, N., Fhoula, I., Hernández-Alcántara, A. M., Mohedano, M. L., Najjari, A., Prieto, A., Ruas-Madiedo, P., López, P., and Ouzari, H.-I. (2021). The role of dextran production in the metabolic context of *Leuconostoc* and *Weissella* Tunisian strains. *Carbohydrate Polymers*, 253, 117254.
- Brison, Y., Pijning, T., Malbert, Y., Fabre, É., Mourey, L., Morel, S., Potocki-Véronèse, G., Monsan, P., Tranier, S., Remaud-Simeon, M., and Dijkstra, B. W. (2012). Functional and Structural Characterization of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) Branching Sucrase Derived from DSR-E Glucansucrase. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 7915-7924.
- Chao, S.-H., Tomii, Y., Watanabe, K., and Tsai, Y.-C. (2008). Diversity of lactic acid bacteria in fermented brines used to make stinky tofu. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2), 134-141.
- Chen, F., Huang, G., and Huang, H. (2020). Preparation and application of dextran and its derivatives as carriers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 827-834.
- Claverie, M., Cioci, G., Vuillemin, M., Monties, N., Roblin, P., Lippens, G., ... Moulis, C. (2017). Investigations on the Determinants Responsible for Low Molar Mass Dextran Formation by DSR-M Dextranase. *ACS Catalysis*, 7(10), 7106-7119.
- Claverie, M., Cioci, G., Guionnet, M., Schörghuber, J., Lichtenecker, R., Moulis, C., Remaud-Simeon, M., and Lippens, G. (2019). Futile Encounter Engineering of the DSR-M Dextranase Modifies the Resulting Polymer Length. *Biochemistry*, 58(25), 2853-2859.
- Claverie, M., Cioci, G., Vuillemin, M., Bondy, P., Remaud-Simeon, M., and Moulis, C. (2020). Processivity of dextranases synthesizing very-high-molar-mass dextran is mediated by sugar-binding pockets in domain V. *Journal of Biological Chemistry*, 295(17), 5602-5613.
- Cote, G. L., and Skory, C. D. (2012). Cloning, expression, and characterization of an insoluble glucan-producing glucanase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1118. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2387-2394.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M., and Brenner, S. E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190

- De Belder, A. N. (1993). DEXTRAN. *Industrial Gums*, 399–425.
- Diz-Küçükkaya, R., and López, J. A. (2018). Acquired Disorders of Platelet Function. *Hematology*, 1932–1943.e6.
- Elizaquível, P., Pérez-Cataluña, A., Yépez, A., Aristimuño, C., Jiménez, E., Cocconcelli, P. S., Vignolo, G., and Aznar, R. (2015). Pyrosequencing vs. Culture-dependent approaches to analyze lactic acid bacteria associated to chicha, a traditional maize-based fermented beverage from Northwestern Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 198, 9-18.
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., and Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 126-134.
- Fabre, E., Bozonnet, S., Arcache, A., Willemot, R.-M., Vignon, M., Monsan, P., and Remaud-Simeon, M. (2005). Role of the Two Catalytic Domains of DSR-E Dextranuclease and Their Involvement in the Formation of Highly  $\alpha$ -1,2 Branched Dextran. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 296-303.
- Fiser, A. (2010). Template-Based Protein Structure Modeling. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 673, 73-94.
- Fraga Vidal, R., Moulis, C., Escalier, P., Remaud-Simeon, M., and Monsan, P. (2011). Isolation of a Gene from *Leuconostoc citreum* B/110-1-2 Encoding a Novel Dextranuclease Enzyme. *Current Microbiology*, 62(4), 1260-1266.
- Fukushima, K., Ikeda, T., and Kuramitsu, H. K. (1992). Expression of *Streptococcus mutans* *gtf* genes in *Streptococcus milleri*. *Infection and Immunity*, 60(7), 2815-2822.
- Galle, S., Schwab, C., Arendt, E., and Gänzle, M. (2010). Exopolysaccharide-Forming *Weissella* Strains as Starter Cultures for Sorghum and Wheat Sourdoughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5834-5841.
- Garibay, M. G., Ramírez, R. Q., and Canales, A. L.-M. (1993). *Biotecnología alimentaria*. Editorial Limusa.
- Giffard, P. m. (1), and Jacques, N. a. (2). (1994). Definition of a Fundamental Repeating Unit in Streptococcal Glucosyltransferase Glucan-binding Regions and Related Sequences. *Journal of Dental Research*, 73(6), 1133-1141.

- Grönwall, A., and Ingelman, B. (1984). The Introduction of Dextran as a Plasma Substitute. *Vox Sanguinis*, 47(1), 96-99.
- Hall, M., and Ricketts, C. R. (1952). The Use of Dextran Sulphate as a Blood Anticoagulant in Biological Research. *Journal of Clinical Pathology*, 5(4), 366.
- Hernández Oaxaca, D., y López-Munguía Canales, A. (2018). *Estudio de cepas de Weissella confusa para metabolizar carbohidratos disponibles en el pozol*. (Tesis de maestría). Instituto de biotecnología de la UNAM. Cuernavaca, Morelos.
- Hernández-Oaxaca, D., López-Sánchez, R., Lozano, L., Wachter-Rodarte, C., Segovia, L., and López Munguía, A. (2021). Diversity of *Weissella confusa* in pozol and its carbohydrate metabolism. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Hu, Y., Winter, V., Chen, X. Y., and Gänzle, M. G. (2017). Effect of acceptor carbohydrates on oligosaccharide and polysaccharide synthesis by dextransucrase DsrM from *Weissella cibaria*. *Food Research International*, 99, 603-611.
- Jabeen, A., Mohamedali, A., and Ranganathan, S. (2019). Protocol for Protein Structure Modelling. En S. Ranganathan, M. Gribskov, K. Nakai, & C. Schönbach (Eds.), *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 252-272).
- Johnson, C. S. (1979). Intravenous Iron-Dextran in the Treatment of Iron Deficient Anemia. *Journal of the National Medical Association*, 71(11), 1101-1105.
- Kang, H.-K., Oh, J.-S., and Kim, D. (2009). Molecular characterization and expression analysis of the glucansucrase DSRWC from *Weissella cibaria* synthesizing a alpha(1->6) glucan. *FEMS Microbiology Letters*, 292(1), 33-41.
- Katina, K., Maina, N. H., Juvonen, R., Flander, L., Johansson, L., Virkki, L., Tenkanen, M., and Laitila, A. (2009). In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiology*, 26(7), 734-743.
- Ko, J.-A., Jeong, H. J., Ryu, Y. B., Park, S.-J., Wee, Y.-J., Kim, D., Kim, Y.-M., and Lee, W. S. (2012). Large increase in *Leuconostoc citreum* KM20 dextransucrase activity achieved by changing the strain/inducer combination in an *E. coli* expression system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 510-515.
- Kothari, D., Das, D., Patel, S., and Goyal, A. (2015). Dextran and Food Application. En K. G. Ramawat and J.-M. Mérillon (Eds.), *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* (pp. 735-752). Springer International Publishing.

- Kralj, S., van Geel-Schutten, I. G. H., Faber, E. J., van der Maarel, M. J. E. C., and Dijkhuizen, L. (2005). Rational Transformation of *Lactobacillus reuteri* 121 Reuteransucrase into a Dextransucrase. *Biochemistry*, 44(25), 9206-9216.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21), 2947-2948.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283-291.
- Lee, J.-S., Lee, K. C., Ahn, J.-S., Mheen, T.-I., Pyun, Y.-R., and Park, Y.-H. (2002). *Weissella koreensis* sp. Nov., isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 4), 1257-1261.
- Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., Dijkstra, B. W., and Dijkhuizen, L. (2012). Glycosidic bond specificity of glucansucrases: On the role of acceptor substrate binding residues. *Biocatalysis and Biotransformation*, 30(3), 366-376.
- Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W., and Dijkhuizen, L. (2013). Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism,  $\alpha$ -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 250-272.
- Maina, N. H., Tenkanen, M., Maaheimo, H., Juvonen, R., Virkki, L. (2008) NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. *Carbohydrate Research*, 343, 1446–1455.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Molina, M., Moulis, C., Monties, N., Pizzut-Serin, S., Guieysse, D., Morel, S., ... Remaud-Simeon, M. (2019). Deciphering an Undecided Enzyme: Investigations of the Structural Determinants Involved in the Linkage Specificity of Alternansucrase. *ACS Catalysis*, 9(3), 2222-2237.



- Molina, M., Moulis, C., Monties, N., Guieysse, D., Morel, S., Cioci, G., and Remaud-Simeon, M. (2020). A specific oligosaccharide-binding site in the alternansucrase catalytic domain mediates alternan elongation. *Journal of Biological Chemistry*, 295(28), 9474-9489.
- Monchois, V., Willemot, R.-M., and Monsan, P. (1999). Glucansucrases: Mechanism of action and structure–function relationships. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 131-151.
- Moulis, C., Arcache, A., Escalier, P.-C., Rinaudo, M., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., and Potocki-Veronese, G. (2006a). High-level production and purification of a fully active recombinant dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *FEMS Microbiology Letters*, 261(2), 203-210.
- Moulis, C., Joucla, G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., and Remaud-Simeon, M. (2006b). Understanding the Polymerization Mechanism of Glycoside-Hydrolase Family 70 Glucansucrases. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31254-31267.
- Osorio, M. I., Zúñiga, M. A., Mendoza, F., Jaña, G. A., and Jiménez, V. A. (2019). Modulation of glucan-enzyme interactions by domain V in GTF-SI from *Streptococcus mutans*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 87(1), 74-80.
- Patel, S., and Goyal, A. (2011). Functional oligosaccharides: Production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1119-1128.
- Petrova, P., and Petrov, K. (2017). Prebiotic–Probiotic Relationship: The Genetic Fundamentals of Polysaccharides Conversion by Bifidobacterium and Lactobacillus Genera. *Food Bioconversion*, pp. 237-278.
- Pijning, T., Vujičić-Žagar, A., Kralj, S., Dijkhuizen, L., and Dijkstra, B. W. (2012). Structure of the  $\alpha$ -1,6/ $\alpha$ -1,4-specific glucansucrase GTFA from *Lactobacillus reuteri* 121. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 68(Pt 12), 1448-1454.
- Pijning, T., Vujičić-Žagar, A., Kralj, S., Dijkhuizen, L., and Dijkstra, B. W. (2014). Flexibility of truncated and full-length glucansucrase GTF180 enzymes from *Lactobacillus reuteri* 180. *The FEBS Journal*, 281(9), 2159-2171.
- Plengvidhya, V., Breidt, F., Lu, Z., and Fleming, H. P. (2007). DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), 7697-7702.

- Purama, R. K., Goswami, P., Khan, A. T., Goyal, A. (2009) Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Carbohydrate Polymers*, 76, 30–35.
- Remaud-Simeon, M., Lopez-Munguia, A., Pelenc, V., Paul, F., and Monsan, P. (1994). Production and use of glucosyltransferases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 for the synthesis of oligosaccharides containing  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) linkages. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 44(2), 101-117.
- Rifat Z. Ahmed, Khaizran Siddiqui, Muhammad Arman, Nuzhat Ahmed (2012) Characterization of high molecular weight dextran produced by *Weissella cibaria* CMGDEX3, *Carbohydrate Polymers*, 90, 441– 446.
- Sajna, K. V., Gottumukkala, L. D., Sukumaran, R. K., and Pandey, A. (2015). White Biotechnology in Cosmetics. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*, 607–652.
- Šali, A., Potterton, L., Yuan, F., Vlijmen, H. van, and Karplus, M. (1995). Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 23(3), 318-326.
- Sánchez-González, M., Alagón, A., Rodríguez-Sotres, R., and López-Munguía, A. (1999). Proteolytic processing of dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides*. *FEMS Microbiology Letters*, 181(1), 25-30.
- Seymour, F. R. (1979a) Correlation of the structure of dextran to their  $^1\text{H}$  NMR spectra. *Carbohydrate Research*, 74, 77–92.
- Seymour, F. R. (1979b) Structural analysis of dextrans containing 2-O- $\alpha$ -D-glucosylated  $\alpha$ -D-glucopyranosyl residues at the branch points, by use of  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy and gas–liquid chromatography–mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 71, 231–250.
- Shen, M.-Y., and Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 15(11), 2507-2524.
- Shi, Q., Hou, Y., Juvonen, M., Tuomainen, P., Kajala, I., Shukla, S., ... Tenkanen, M. (2016). Optimization of Isomaltooligosaccharide Size Distribution by Acceptor Reaction of *Weissella confusa* Dextransucrase and Characterization of Novel  $\alpha$ -(1- $\rightarrow$ 2)-Branched Isomaltooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(16), 3276-3286.

- Shi, Q., Hou, Y., Xu, Y., Mørkeberg Krogh, K. B. R., and Tenkanen, M. (2019). Enzymatic analysis of levan produced by lactic acid bacteria in fermented doughs. *Carbohydrate Polymers*, 208, 285-293.
- Shukla, S., Verma, A. K., Kajala, I., Nyssolä, A., Baruah, R., Katina, K., ... Goyal, A. (2016). Structure modeling and functional analysis of recombinant dextransucrase from *Weissella confusa* Cab3 expressed in *Lactococcus lactis*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(8), 822-832.
- Stiles, M. E., and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
- Tamang, J. P., Watanabe, K., and Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 377.
- Torres-Rodríguez, I., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Giles-Gómez, M., Conca Morales, R., López-Munguía, A., Bolívar, F., and Escalante, A. (2014). Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchii* isolated from traditional fermented pulque beverage. *SpringerPlus*, 3(1), 583.
- Von Eichel-Streiber, C., Laufenberg-Feldmann, R., Sartingen, S., Schulze, J., and Sauerborn, M. (1992). Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. *Molecular and General Genetics MGG*, 233(1), 260-268.
- Vuillemin, M., Grimaud, F., Claverie, M., Rolland-Sabaté, A., Garnier, C., Lucas, P., ... Moulis, C. (2018). A dextran with unique rheological properties produced by the dextransucrase from *Oenococcus kitaharae* DSM 17330. *Carbohydrate Polymers*, 179, 10-18.
- Vujičić-Žagar, A., Pijning, T., Kralj, S., López, C. A., Eeuwema, W., Dijkhuizen, L., and Dijkstra, B. W. (2010). Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21406-21411.
- Wacher C. (1993). Alimentos y bebidas fermentadas tradicionales. *En: Biotecnología alimentaria*, ed. M García Gariba y, R Quintero Ramírez, A López-Munguía Canales, pp. 635. México: Limusa

- Waegeman, H., and Soetaert, W. (2011). Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(12), 1891-1910.
- Welman, A. D., and Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269-274.
- Yi, A.-R., Lee, S.-R., Jang, M.-U., Park, J.-M., Eom, H.-J., Han, N. S., and Kim, T.-J. (2009). Cloning of dextransucrase gene from *Leuconostoc citreum* HJ-P4 and its high-level expression in *E. coli* by low temperature induction. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(8), 829-835.
- Zhou, Y., Cui, Y., and Qu, X. (2019). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate Polymers*, 207, 317-332.