



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio del sitio de reconocimiento a oligosacáridos OBS2 de la levansacarasa
SacB de *Bacillus subtilis*

Tesis para optar por el grado de:
Maestría en ciencias bioquímicas

PRESENTA:

I.B. KARLA ANAHI PANTOJA ALVARADO

TUTORA:

DRA. CLARITA OLVERA CARRANZA
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Adelaida Díaz Vilchis
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dra. Carmina Montiel Pacheco
[Facultad de Química, UNAM](#)

Ciudad de México. Mayo de 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIACIONES	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Fructanas.....	11
1.2. Reacciones que catalizan las levansacararas.....	12
1.3. Estructura de la levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i>	12
1.4. Mecanismo molecular de reacción de la levansacarasa de SacB	13
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1. Mecanismo de elongación	14
2.2. Estructura cristalográfica de SacB en complejo con un hexasacárido.....	14
2.3. Sitios de unión a carbohidratos	16
2.3.1. Contribución sobre la procesividad.....	17
2.3.2. Regulación alostérica	18
2.3.3. Orientación de la enzima hacia el sustrato.	18
2.3.4. Guía del sustrato hacia el sitio activo.....	18
2.3.5. Transmisión de productos de reacción	19
2.3.1. Contribución a la especificidad de la enzima	19
2.4. Aplicación de herramientas computacionales para el estudio de la procesividad de las enzimas.	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
5. HIPÓTESIS	23
6. OBJETIVOS	23
6.1. Objetivo general.....	23
6.2. Objetivos particulares:.....	23
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
7.1. Cepas y plásmidos.....	25
7.2. Generación de mutantes	25
7.2.1. Diseño de oligonucleótidos	25
7.2.2. Mutagénesis sitio dirigida	25
7.2.1. Transformación en <i>E. coli</i> DH5 α y BL21 (DE).....	26

7.2.2. Producción y purificación de plásmido	26
7.2.3. Verificación de la mutación por secuenciación.....	26
7.3. Expresión heteróloga de enzimas recombinantes.....	26
7.4. Purificación y análisis de proteínas.....	27
7.4.1. Purificación de SacB y mutantes	27
7.4.2. Cuantificación de proteínas.....	27
7.4.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	27
7.4.4. Ensayo enzimático estándar.....	27
7.5. Determinación de las propiedades cinéticas de las mutantes del OBS2.....	28
7.6. Determinación de estabilidad al almacenamiento de las mutantes Q159A y E162A	28
7.7. Identificación y análisis de productos.....	29
7.7.1. Azúcares simples.	29
7.7.2. Oligosacáridos.	29
7.7.3. Polímeros.....	30
7.8. Simulación por dinámica molecular (DM).	30
8. RESULTADOS.....	31
8.1. Selección y obtención de las mutantes del OBS2	31
8.2. Efecto de las mutaciones en los residuos del OBS2 en la actividad enzimática y constantes cinéticas de la levansacarasa	32
8.3. Efecto en la especificidad de reacción: relación hidrólisis/transferencia.....	34
8.4. Caracterización del perfil de productos de las mutantes del OBS2.....	35
8.4.1. Caracterización de las mutantes sobre la producción de polímero.....	35
8.4.2. Caracterización del perfil de fructooligosacáridos de las mutantes.	40
8.4.3. Análisis de la mutación de los residuos Q159A y E162A con 1 U/mL	42
8.5. Estabilidad al almacenamiento de las mutantes Q159A y E162A	43
8.6. Dinámica molecular de SacB WT en complejo con oligosacáridos.....	46
9. DISCUSIÓN	48
9.1. Modulación de los parámetros cinéticos por las mutantes del OBS2	48
9.2. Análisis de la función de los residuos del OBS2 sobre el mecanismo de elongación de la LS SacB WT	51
9.3. Evaluación del OBS2 por dinámica molecular	55
10. CONCLUSIÓN	58
11. PERSPECTIVAS	59
12. ANEXOS.....	60
A. Oligonucleótidos totalmente superpuestos. Secuencia 5'->3'	60

B.	Metodología de la simulación por dinámica molecular (DM).....	60
C.	Secuenciación de DNA de SacB WT y las mutantes.	62
D.	Purificación de SacB y mutantes	68
E.	Relación hidrólisis / transferencia.....	69
F.	Cinética de reacción 0.1 μ M SacB y mutantes	70
G.	Curvas de progreso de reacción con 0.01 μ M y 1 μ M de enzima.....	71
H.	Cinética de reacción de mutantes Q159A y E162A con 1 U/mL	72
I.	Multialineamiento levansacarosas.....	73
J.	Motivo conservados de la familia GH68	76
13.	BIBLIOGRAFÍA	77

Este trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Clarita Olvera Carranza.

La realización de este proyecto estuvo financiada por la UNAM en el marco del proyecto PAPIIT No. IN 213616 y por el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca no. 777697.

Dedicatoria

A mis padres, sin duda mi mejor ejemplo de amor y trabajo duro. Gracias por enseñarme el camino para lograr mis sueños.

A mis hermanos Chris y Amanda, por siempre motivarme a ir más lejos, los quiero.

A Dios, porque a tu lado nada me faltara

AGRADECIMIENTOS

Para Andy, porque esta experiencia no hubiera sido posible sin todo tu apoyo. Gracias por estar siempre ahí para mí cuando más te necesitaba, me siento enormemente bendecida por la pareja que tengo a mi lado.

A la Dra. Clarita Olvera porque más que una tutora, ha sido mi guía en mi desarrollo personal y profesional. Gracias por su confianza, su dedicación y por enseñarme que no existen límites para lograr nuestros objetivos.

Gracias a la Dra Marcela, porque sus comentarios enriquecieron mi trabajo y despertaron mi análisis crítico. A la técnica Rosa, por todas las facilidades suministradas para realizar el proyecto.

A doña Leo porque su apoyo y experiencia me ayudaron a integrarme al grupo.

A Flor y Enrique, gracias por transmitirme su experiencia y conocimientos. Son un ejemplo de trabajo y esfuerzo para mí.

A mis compañeros del grupo, Jorge, Ray, Salvador, Maura, Ingrid, Gerardo y Chava, porque son los mejores compañeros que alguien desearía. Los momentos con ustedes dentro y fuera del laboratorio enriquecieron mi experiencia.

A luna y gauss porque Dios siempre envía ángeles a nuestras vidas, cuando se le acaban las alas les pone colitas.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos parcialmente superpuestos utilizados en la generación en la mutagénesis sitio dirigida.	25
Tabla 2 Resumen de los resultados de la caracterización cinética de SacB WT y mutantes.	33
Tabla 3. Producción de polímeros de levana de SacB WT y mutantes del OBS2.	37
Tabla 4. Comparativa de producción de polímeros de levana de SacB WT y mutantes Q159A y E162A con 1 U/mL.....	43
Tabla 5. Estabilidad (vida media) de SacB WT y mutantes	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del enlace glicosídico en levanas e inulinas.....	11
Figura 2. Especificidad de la reacción de levansacarosas. FTF:Fructosiltransferasa.....	12
Figura 3. Vistas ortogonales del plegamiento β propela a y b.....	13
Figura 4. Mecanismo de reacción de SacB.....	13
Figura 5 . Mecanismo de elongación de SacB.....	14
Figura 6. Comparación estructural de los subsitios de unión de SacB en complejo con sacarosa, rafinosa y levanohexaosa.....	15
Figura 7. Interacciones enzima-ligando presentes en el OBS2.....	16
Figura 8. Roles funcionales de los sitios de unión a carbohidratos en glicósido hidrolasas.....	17
Figura 9. Modelo de unión a xilano mediado por OBS.....	19
Figura 10. Sitio de unión a oligosacárido de <i>E. tasmaniensis</i>	20
Figura 11. Esquema del proceso de mutagénesis sitio dirigida.....	31
Figura 12. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de reacción de las mutantes del OBS2.....	33
Figura 13. Perfil de polímero de SacB y mutantes obtenidos por GPC.....	35
Figura 14. Comparativa de la producción de levana de las mutantes del OBS2 bajo las 3 condiciones de reacción.....	37
Figura 15. Efecto de las mutaciones en las curvas de progreso de las reacciones enzimáticas evaluadas con 0.1 μ M de enzima.....	39
Figura 16. Perfil de oligosacáridos sintetizados medidos por HPAEC-PAD.....	40
Figura 17. Perfil de productos de SacB y mutantes Q159A y E162A con conversión mayor del 80% y 1 U/mL de enzima.....	42
Figura 18. Interacciones de los residuos Q159 y E162.....	44
Figura 19. Dinámicas moleculares realizadas en el OBS1 y OBS2 de SacB WT.....	46
Figura 20. Interacción de la cadena de levana y RMSD de oligosacaridos de GP 6 a GP 30 en SacB WT.	47
Figura 21. Residuos mutados del OBS2.....	48
Figura 22. Secciones del multialineamiento de secuencias de levansacarosas que contienen los residuos equivalentes pertenecientes al OBS2.....	50
Figura 23. Representación de la estructura cristalográfica y mapa de la estructura secundaria de SacB.....	50
Figura 24. Modelo en <i>cartoon</i> de SacB WT.....	52
Figura 25. Interacciones enzima-ligando presentes en el canal hacia el OBS2.....	54
Figura 26. Estructuras cristalográficas superpuestas de levansacarosas GH 68.....	55
Figura 27. Representación esquemática del modelo propuesto para el mecanismo bimodal en SacB.....	56
Figura 28. Cromatograma de purificación de SacB K148A.....	68

Figura 29. Gel de electroforesis SDS-PAGE.	68
Figura 30. Relación hidrólisis/transferencia de la enzima SacB WT y diversas mutantes del OBS2	69
Figura 31. Cinética de reacción 0.1 μ M de SacB WT	70
Figura 32. Cinética de reacción 0.1 μ M de SacB N115A.....	70
Figura 33. Cinética de reacción 0.1 μ M de SacB D145A.....	70
Figura 34. Cinética de reacción 0.1 μ M de SacB K148A.....	70
Figura 35. Cinética de reacción 0.1 μ M de SacB E162A	70
Figura 36. Cinética de reacción 0.1 μ M de SacB Q159A.....	70
Figura 37. Efecto de las mutaciones en las curvas de progreso de las reacciones enzimáticas evaluadas con 0.01 μ M de enzima.	71
Figura 38. Efecto de las mutaciones en las curvas de progreso de las reacciones enzimáticas evaluadas con 1 μ M de enzima.....	71
Figura 39. Cinética de producción de polímero de Q159A con 1 U/mL	72
Figura 40. Cinética de producción de polímero de E162A con 1 U/mL.	72
Figura 41. Representación esquemática de los motivos conservados de la familia GH68..	76

LISTA DE ABREVIACIONES**DM:** dinámica molecular**FOS:** fructooligosacáridos**FTF:** fructosiltransferasas**GH:** glicosilhidrolasa**GP:** grado de polimerización**GPC:** Cromatografía de permeación en gel**H/T:** Relación hidrólisis/transferencia determinada a partir de los valores de fructosa (F) y glucosa (G) libres empleando las siguientes ecuaciones:

$$\%H = \frac{F}{G}$$

$$\%T = \frac{G - F}{G}$$

HPAEC-PAD: *High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection.***HPLC:** *High-performance liquid chromatography***IR:** Espectroscopia infrarroja**Levan A:** Polímero de levana de alto peso molecular sintetizado por la levansacarasa de *Bacillus subtilis* con un peso aproximado de 2300 kDa.**Levan B:** Polímero de levana de bajo peso molecular sintetizado por la levansacarasa de *Bacillus subtilis* con un peso aproximado de 7.2 kDa.**LS:** levansacarasa**OBS:** sitios de unión a oligosacárido**SacB:** Levansacarasa de *Bacillus subtilis***SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS**TLC:** cromatografía en capa fina **$t_{1/2}$:** Tiempo de vida media de la enzima**WT:** Enzima silvestre, por sus siglas en ingles *Wild type*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fructanas

Las fructanas son polímeros de fructosa que consisten en residuos de D-fructosa unidos por enlaces β -glicosídicos y pueden tener puntos de ramificación. De acuerdo con su grado de polimerización (GP) las fructanas se dividen en fructooligosacáridos (FOS) que tienen un GP de 2 a 10 moléculas de fructosa, mientras que los polímeros presentan un GP superior a 10. Las fructanas bacterianas por lo general poseen pesos moleculares altos que puede alcanzar un GP de 10^4 a 10^6 , mientras que los obtenidos de plantas son de pesos moleculares bajos de un GP de 30 a 200. Otra clasificación es de acuerdo al tipo de enlace glicosídico que los une, definiéndose como: inulinas las que tienen un enlace β -(2,1) y en levanas con enlace β -(2,6) (Banguela & Hernández, 2006; Vijn & Smeekens, 1999). (Figura 1).

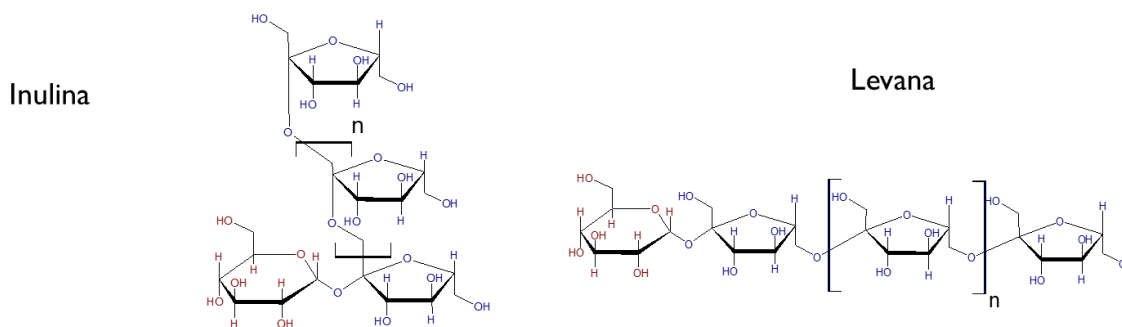


Figura 1. Representación del enlace glicosídico en levanas e inulinas.

Las levanas y los FOS de tipo levanas tienen propiedades importantes que permiten su aplicación en la industria alimentaria, médica, farmacéutica y nanotecnológica. Desde el punto de vista tecnológico las levanas se han utilizado como espesantes y emulsificantes (Bersaneti *et al.*, 2018). Desde el punto de vista médico farmacéutico a las levanas se les han atribuido propiedades inmunorreguladoras (Liu *et al.*, 2010), antitumorales (Abdel-Fattah *et al.*, 2012), reducción del colesterol (Dahech *et al.*, 2013); así como ser idóneas para la producción de sistemas de administración de fármacos (Sezer *et al.*, 2011) y fabricación de películas para aplicaciones médicas (Costa *et al.*, 2013). También se ha reportado que pueden actuar como prebióticos, es decir, ser un alimento no digerible que afecta beneficiosamente al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de especies de bacterianas residentes en el colon (Gibson & Roberfroid, 1995; Yang *et al.*, 2015). Por otro lado, los FOS son considerados buenos edulcorantes no cariogénicos y bajos en calorías, también tienen actividad prebiótica y capacidad para mejorar la absorción de calcio (Bersaneti *et al.*, 2018).

1.2. Reacciones que catalizan las levansacarinas

Las levanas son sintetizadas por enzimas denominadas levansacarinas (LS) (EC. 2.4.1.10) que son fructosiltransferasas (FTF) pertenecientes a la familia de las glucósido hidrolasas (GH68) de acuerdo con el sistema de clasificación CAZy, que se basa en la similitud de la secuencia de aminoácidos, el plegamiento y su función (Cantarel *et al.*, 2009). Las levansacarinas bacterianas son enzimas que sintetizan levanas a partir de sacarosa, catalizando tres reacciones diferentes dependiendo de la naturaleza del aceptor (Figura 2). La primera reacción denominada como transfructosilación se realiza cuando se utiliza como aceptor del residuo fructosilo, una sacarosa, un oligosacárido inherente a la reacción o cadena de fructano en crecimiento (polimerización). La segunda reacción se realiza cuando se utiliza como aceptor del residuo fructosilo a monosacáridos, oligosacáridos no inherentes a la reacción o cualquier alcohol primario (reacciones de aceptor). Finalmente, la tercera reacción es la denominada de hidrólisis y se realiza cuando se utiliza agua como aceptor de los residuos fructosilos (Ozimek *et al.*, 2006; Seibel *et al.*, 2006).

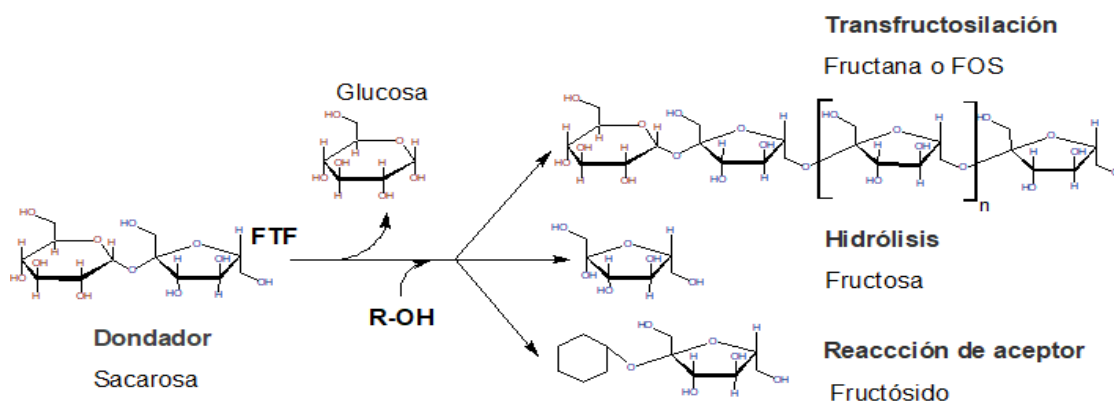


Figura 2. Especificidad de la reacción de levansacarinas. FTF:Fructosiltransferasa.

1.3. Estructura de la levansacarina de *Bacillus subtilis*

La levansacarina de *Bacillus subtilis* (SacB) es una de las FTFs más estudiadas hasta el momento, debido a su estructura unidominio, estabilidad y perfil de productos bimodal. La levansacarina SacB está conformada por 473 aminoácidos (52.9 kDa), su estructura cristalográfica fue determinada en forma nativa (PDB ID: 1OYG) y en complejo con sustratos (sacarosa PDB ID: 1PT2 y rafinosa PDB ID: 3BYN) con una resolución de 1.5 y 2.1 Å, respectivamente (Meng & Fütterer, 2003, 2008). En esta estructura, SacB contiene un único dominio catalítico con forma de embudo con estructura de β propela de 5 hélices en la cual cada hélice está compuesta de cuatro hebras β antiparalelas que adoptan una topología tipo "W" (figura 3). En el centro de la β propela se encuentra una cavidad donde se alojan los residuos de la triada catalítica que son D86 (nucleófilo), D247 (estabilizador del estado de transición) y E342 (ácido/base) (Meng & Fütterer, 2003).

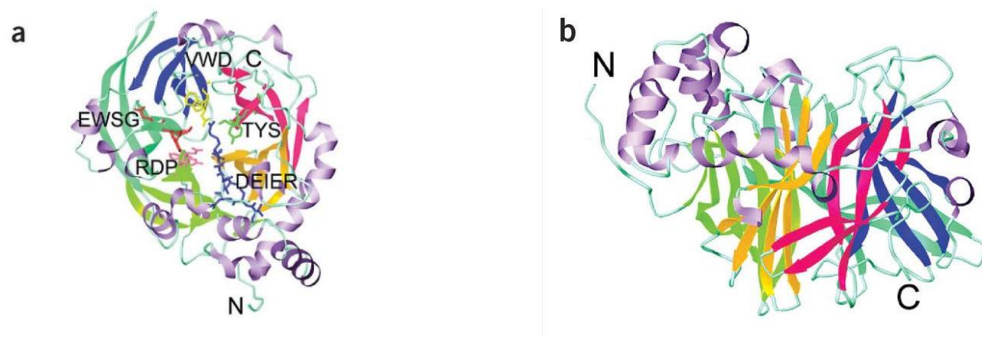


Figura 3. Vistas ortogonales del plegamiento β propela a y b (Meng & Fütterer, 2003).

1.4. Mecanismo molecular de reacción de la levansacarasa de SacB

Durante la catálisis en la LS de Sac, el nucleófilo D86 realiza un ataque nucleofílico en el carbono anomérico del sustrato de azúcar, formando un intermediario covalente de fructosa-enzima (etapa de glicosilación). Este intermediario covalente es estabilizado por el D247 que coordina enlaces de hidrógeno con el grupo fructosilo en las posiciones 3-OH y 4-OH. Posteriormente, el catalizador ácido/base (E342) actúa como un ácido general donando un protón al grupo saliente glicosilo (glucosa). En una segunda etapa (desglicosilación), el catalizador ácido/base (E342) actúa como una base general, eliminando un protón del aceptor del fructosilo entrante (agua o molécula aceptor) que hidroliza el intermediario enzima-fructosa mediante un segundo ataque nucleofílico al C2 del grupo fructosilo en el intermediario para formar finalmente el enlace fructosil aceptor (Figura 4). (Lammens *et al.*, 2009; Raga Carbajal & Olvera Carranza, 2019).

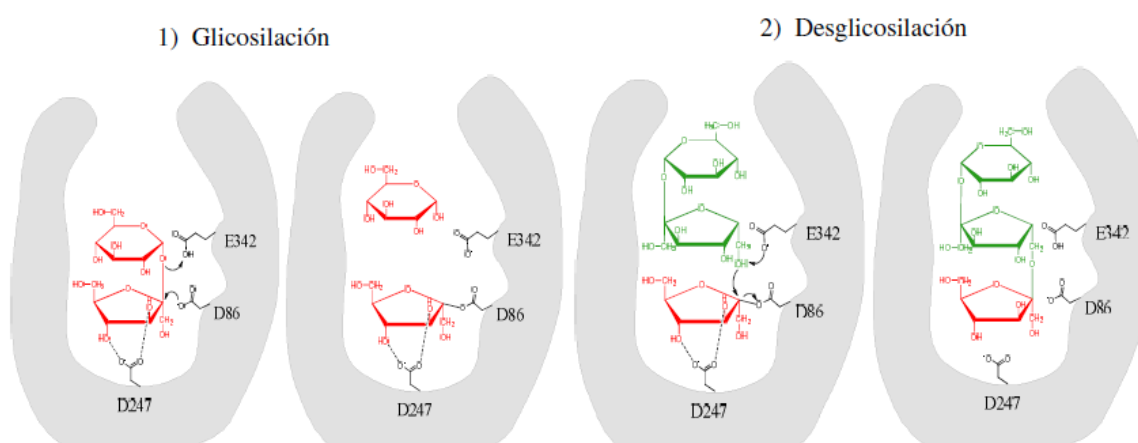


Figura 4. Mecanismo de reacción de SacB. Adaptado de (Chuankhayan *et al.*, 2010).

2. ANTECEDENTES

2.1. Mecanismo de elongación

En presencia de sacarosa como único sustrato y bajo condiciones estándar de reacción (sacarosa 0.29 M, 1 U/mL de enzima, acetatos 50 mM, pH 6 y 37 °C), SacB cataliza la formación de productos poliméricos bajo una distribución bimodal a través de dos procesos: un mecanismo procesivo, por la disociación del producto después de múltiples reacciones de transferencia de fructosa y donde se sintetiza polímero de levana de alto peso molecular (Levan A) (2300 kDa); y un mecanismo no procesivo, donde se sintetiza polímero de levana de bajo peso molecular (Levan B) (7.2 kDa) que implica la disociación del producto resultante por cada residuo fructosilo transferido. Los mecanismos de elongación de SacB están determinados por una relación inversamente proporcional a la concentración de enzima, es decir, a bajas concentraciones se presenta el mecanismo procesivo, mientras que altas concentraciones se presenta el mecanismo no procesivo (Raga-Carbajal *et al.*, 2016) (Figura 5).

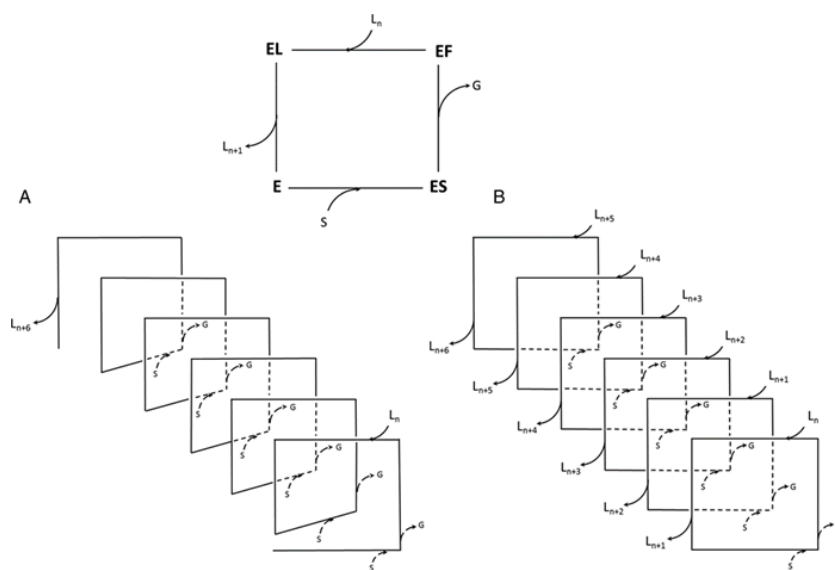


Figura 5 . Mecanismo de elongación de SacB. A) Procesivo, B) No Procesivo. S, sacarosa; G Glucosa; L, aceptor (Raga-Carbajal *et al.*, 2016).

2.2. Estructura cristalográfica de SacB en complejo con un hexasacárido

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha determinado la estructura cristalográfica de un complejo SacB (D86A/E342A)-kestolevanohexaosa (PBD ID: 6VHQ)(Raga-Carbajal *et al.*, 2021). Esta estructura permitió identificar dos sitios de unión a oligosacárido (OBS) en la enzima SacB. El primer sitio de unión a oligosacárido (OBS1) está ubicado en la periferia de la cavidad catalítica, mientras que el segundo sitio de unión a oligosacárido (OBS2) se encuentra en una región

superficial a 20 Å del sitio activo. En el OBS1, seis unidades de fructosa con enlaces β 2-6 se unieron a los subsitios de unión correspondientes que coinciden con el contacto con la fructosa en el sitio -1 hasta la fructosa que se extiende hacia el solvente (subsitio +5) (Figura 6) (Raga-Carbajal *et al.*, 2021). Complementando la información ya reportada por Meng & Fütterer en 2003, se reportó que los residuos en contacto con la unidad del glucósilo que pertenecen al subsitio +1 son R246, E340, E342 y R360. También se identificó que, existen residuos externos implicados en el reconocimiento del aceptor destacando N242, Y237, H243, R246 y K363 en el subsitio +2; D117, F182 en el subsitio +3 y Y237 en el subsitio +4 (Meng & Fütterer, 2003, 2008; Raga-Carbajal *et al.*, 2021). Con un estudio de mutagénesis sitio dirigida se ha demostrado que los residuos del OBS1 participan en el mecanismo de elongación no procesivo (Raga-Carbajal *et al.*, 2021)

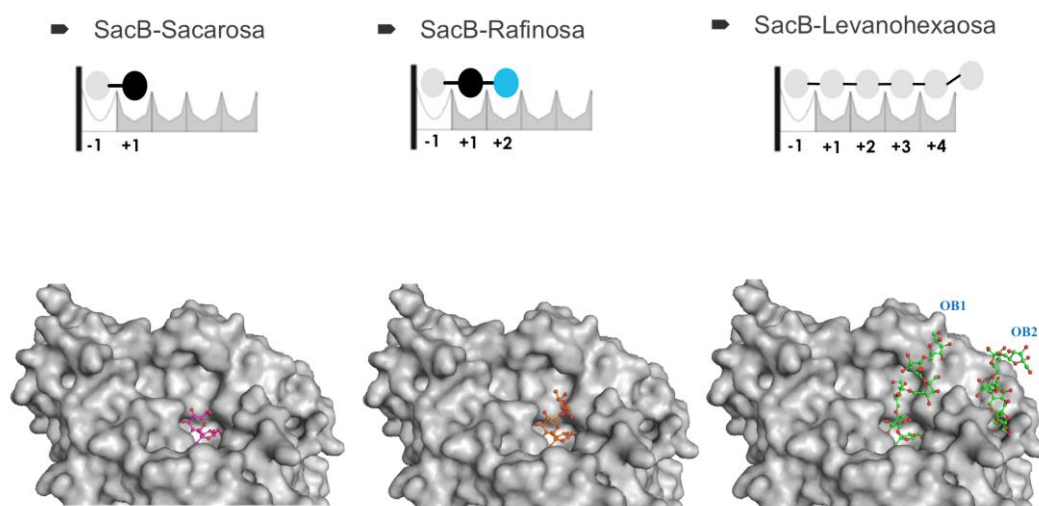
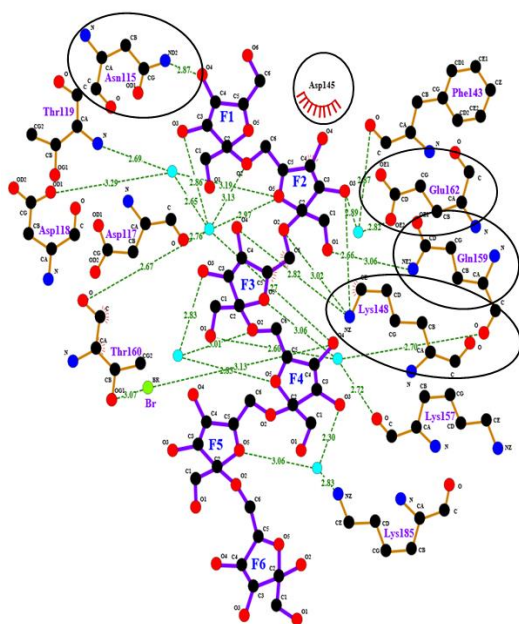


Figura 6. Comparación estructural de los subsitios de unión de SacB en complejo con sacarosa, rafinosa y levanohexaosa. Las esferas grises representan moléculas de fructosa, mientras que las esferas negras y azules representan unidades de glucosa y galactosa respectivamente (Raga-Carbajal *et al.*, 2021)

El segundo sitio de unión a oligosacárido está situado a 20 Å del sitio catalítico. En este sitio la interacción con la kestolevanohexaosa está mediada por cinco residuos en contacto directo con tres unidades de fructosa en el extremo no reductor (Fru1, Fru2 y Fru3). Para el primer residuo fructosilo Fru1 se establece la participación de los residuos N115, D117 y T160. El segundo residuo fructosilo Fru2 mantiene interacciones con los residuos T119, F143, D145, K148, Q159 y E162. Las interacciones del tercer residuo fructosilo Fru3 se realizan con los residuos K147, K148 y Q159. Adicionalmente, esta estructura se mantiene estable en la cuarta unidad de fructosa a través de puentes de hidrógeno con moléculas de agua con la cadena lateral del residuo K185 y a través de un ion bromuro (artefacto de la cristalización) con la cadena lateral de T160. Fru5 y Fru6 forman un puente de hidrógeno con solo una molécula de agua cada una (Figura 7) (Raga-Carbajal *et al.*, 2021).



Residuo Fructosilo	Residuos	
	<i>Cadena lateral</i>	<i>Cadena principal</i>
1	N115[ND2]	D117[O]• T160[O]•
2	D145[OD1] E162[OE2] Q159[NE2] K148[NZ] E162[OE2]•	T119[O]• F143[O]•
3	K148[NZ]	K147[O]• Q159[O]•
4	K185[NZ]•	

• Contacto a través de moléculas de agua

Figura 7. Interacciones enzima-ligando presentes en el OBS2. Las líneas punteadas representan puentes de hidrógeno, mientras que las interacciones no polares se muestran como arcos. Los residuos en contacto directo con el ligando por puente de hidrógeno se muestran en círculos. Imagen obtenida de Ligplot + (Laskowski & Swindells, 2011).

La identificación del OBS2 abre la puerta para nuevos estudios que versen sobre la implicación de este sitio en la actividad y polimerización de las fructanas. A través del estudio por mutagénesis sitio dirigida de los residuos implicados en este segundo sitio de unión podríamos complementar el mecanismo de elongación ya descrito en el OBS1. De esta manera y a través del perfil de productos se podría explicar el papel de los residuos implicados en el mecanismo bimodal de SacB; y probablemente ver un efecto en la afinidad por el sustrato, la actividad hidrolítica o transferasa de la enzima.

2.3. Sitios de unión a carbohidratos

En la estructura de las glicosilhidrolasas (GH), se pueden presentar sitios de unión a carbohidratos en una posición fija en relación con el sitio catalítico. Usualmente estos sitios se han identificado por cristalografía de rayos X en estructuras de enzimas en complejos con sustratos o análogos de sustratos en cristales obtenidos después de la co-cristalización o por remojado de los cristales. Por otro lado, la espectroscopía de RMN y el marcaje químico también se han utilizado en la detección de estos sitios (Sven Cuyvers *et al.*, 2012). En algunas enzimas GH, se ha identificado el papel funcional de los OBS dado el contexto de su ubicación y la actividad de la enzima. Entre las posibles funciones (Figura 8) de los OBS se encuentran: 1) orientación del sustrato, 2) guía del sustrato hacia el sitio activo, 3)

mejora de la procesividad, 4) regulación alostérica, 5) transmisión de productos de reacción, 6) contribución a la especificidad de la enzima, entre otras (Cockburn & Svensson, 2013; Sven Cuyvers *et al.*, 2012).

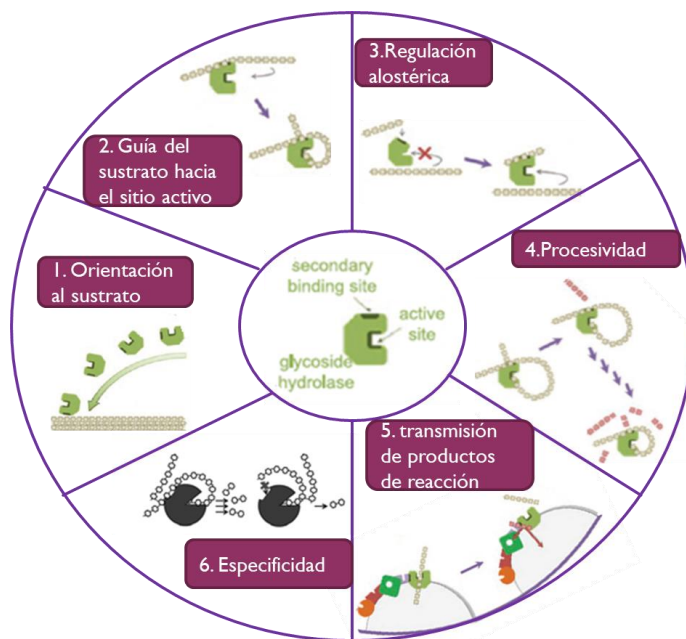


Figura 8. Roles funcionales de los sitios de unión a carbohidratos en glicosidasas. Adaptado de Cuyvers *et al.*, 2012 y Cockburn & Svensson, 2013.

Los GH que comprenden uno o más OBS pueden ser categorizados según su especificidad (α -amilasas, enzimas amilolíticas, transglicosidasas, xilanasas y otras enzimas GH). La levansacarasa SacB, comparte similitud con enzimas transglicosidasas que utilizan disacáridos, oligosacáridos o polisacáridos como donantes de azúcar. Además, la levansacarasa forma parte de la superfamilia de furanosidasas que incluyen los clanes GH-F (familias GH43 y GH62) y GH-J (GH32 y GH68), así como las familias GH117 y GH43. Esta superfamilia incluye enzimas que actúan sobre un residuo de furanosido (fructosa, arabinosa, ribosa, xilano etc.) (Sven Cuyvers *et al.*, 2012; Naumoff, 2001). A continuación, se detalla cada uno de los roles de los OBS con base a la evidencia experimental reportada hasta el momento en la literatura.

Transglicosidasas

2.3.1. Contribución sobre la procesividad.

La amilosa de *Neisseria polysaccharea* es una enzima que en presencia de glucógeno, transfiere residuos de D-glucosa a ramificaciones de glucógeno α -1,4, originando un polímero insoluble y sin formación de oligosacáridos (Albenne *et al.*, 2007). Con base en las estructuras cristalográficas de la enzima en complejo con sacarosa y maltoheptaosa se definieron tres OBS que se localizaron en el

sitio activo (OBS1), en el dominio B' (OBS2) y en el dominio C-terminal (OBS3). Además se observó dos sitios de unión a sacarosa (SB) situados en la superficie de la cavidad catalítica (SB2) y en el sitio activo (SB1) coincidiendo este último con el OBS1 (Skov *et al.*, 2002). La mutación de un residuo del subsitio +4 del OBS1, redujo significativamente la afinidad de la enzima hacia el glucógeno y también mostró un menor efecto activador del glucógeno sobre la catálisis. Por otro lado, las mutaciones en el OBS2 mostraron una actividad catalítica reducida y un menor efecto de activación por glucógeno en la reacción comparada con la enzima silvestre WT; así como una síntesis de maltooligosacáridos. Con base en los resultados, se propone un mecanismo semiprocesivo en el cual una ramificación del glucógeno permanece capturada en el sitio OBS2 mientras que otra está siendo alargada en el sitio activo. Posteriormente, esta ramificación podría guiarse a través de R415 hacia el OBS1 para la elongación asistida por un movimiento alostérico del dominio B' hasta que la ramificación alcance un tamaño crítico que provoque la liberación del glucógeno (Albenne *et al.*, 2007).

2.3.2. Regulación alostérica

La superposición de las estructuras de la amilomaltasa de *Thermus aquaticus* con y sin análogo de sustrato (acarbosa), reveló un cambio conformacional causado por la unión de la molécula de glucano al OBS2, el cual sería un desencadenante para que la enzima tome una conformación completamente activa para realizar óptimamente cuatro tipos de reacciones: desproporción (transglucosilación intermolecular), hidrólisis, ciclación (transferencias intramoleculares de glucano dentro de una única molécula de glucano lineal) o la reacción inversa denominada acoplamiento (Fujii *et al.*, 2007).

Xilanasas

2.3.3. Orientación de la enzima hacia el sustrato.

Las mutantes W249A y Y315A del OBS2 de la endo- β -1,4-D-xilanasas (pXyl) de *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAH3a, evidenciaron que la afectación del OBS2 en la enzima conducía a un incremento de 5 veces en el valor de la K_d de la enzima sobre sustratos insolubles, con una reducción significativa de la capacidad de la enzima para solubilizar este sustrato. En este contexto, el OBS2 serviría para dirigir la enzima hacia su sustrato, logrando mantener muy cerca de la enzima los sustratos insolubles y haciendo más eficiente su actividad (Sven Cuyvers *et al.*, 2011; De Vos *et al.*, 2006).

2.3.4. Guía del sustrato hacia el sitio activo

Los ensayos experimentales en las enzimas hidrolíticas de las xilanasas de *Bacillus subtilis* (XBS) y *Aspergillus niger* (XAN), reportaron que el OBS2 no influye significativamente en las propiedades catalíticas del sitio activo hacia pequeños sustratos. Sin embargo, debido a que los xilanos poliméricos

se unen cooperativamente en ambos sitios (sitio activo y OBS2), el OBS2 mejora significativamente la actividad catalítica hacia el xilano polimérico soluble a través de una mejor interacción (S. Cuyvers *et al.*, 2011; Ludwiczek *et al.*, 2007) (Figura 9). Debido a que algunas mutantes del OBS2 en XBS, presentaron una K_d ligeramente menor pero sin una actividad superior, se sugiere que el OBS2, podría tener un papel más pronunciado como ayudar en la catálisis llevando el sustrato al sitio activo (S. Cuyvers *et al.*, 2011).

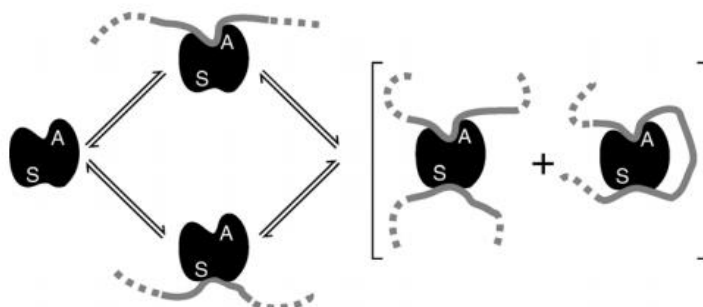


Figura 9. Modelo de unión a xilano mediado por OBS. La unión puede ocurrir en el sitio catalítico o el OBS2 individualmente o en ambos sitios de manera simultánea en una forma cooperativa (Ludwiczek *et al.*, 2007).

α -amilasas

2.3.5. Transmisión de productos de reacción

SusG es una α -amilasa (GH13) que forma parte de un gran complejo de proteínas en la superficie externa de la célula bacteriana y juega un papel importante en la adquisición de carbohidratos por la microbiota intestinal animal. A través de la estructura cristalográfica en complejo con maltoheptaosa y ascarbosa, se identificó que esta enzima cuenta con un dominio de unión a carbohidratos y un sitio de unión al almidón superficial adyacente al sitio activo. Como la eliminación de estos sitios sólo tuvo un efecto limitado cuando se evaluaron contra almidón soluble y amilopeptina, se sugiere que puedan tener un papel más importante en el intercambio de productos con otras enzimas componentes del sistema Sus (Koropatkin & Smith, 2010).

2.3.1. Contribución a la especificidad de la enzima

En la isoenzima 1 α -amilasa de cebada (Amy1), las mutaciones de un residuo del OBS2 no tiene efecto sobre sustratos lineales (amilosa). Sin embargo, el aumento en la K_m aparente por sustratos ramificados (amilopeptina), sugiere que el OBS2 se une preferentemente a un cierto tipo de elemento estructural en la amilopeptina durante la reacción de despolimerización. Bajo este contexto se plantea que un sustrato ramificado se une al OBS2, elevando la concentración eficaz de sustrato y consecutivamente disminuyendo la K_m aparente para esta reacción. Los extremos de la cadena del sustrato no podrían unirse al OBS y, por lo tanto, aumentarían la K_m aparente para la reacción cuando

la enzima y el sustrato se acercan en esta orientación (Cockburn & Svensson, 2013; Nielsen *et al.*, 2012).

Recientemente, se reportó un sitio de unión a oligosacáridos a partir de la estructura de una levansacarasa de la bacteria gram negativa *Erwinia tasmaniensis* en complejo con levanobiosa, un intermediario formado durante la síntesis de fructooligosacáridos. Este OBS está relacionado con una estructura de bucle conformada por los residuos 368–378 de *E. tasmaniensis*, que se encuentra conservado en varias especies de bacterias gram negativas, pero no esta presente en las levansacarazas de las bacterias gram positivas como *B. subtilis* y *B. megaterium* (Figura 10). Por lo que se sugiere que la capacidad de mantener FOS pequeños cerca del sitio activo de la enzima puede aumentar la probabilidad de que estas moléculas se utilicen como aceptores de fructosa para la producción de oligosacáridos con GP pequeños a medianos. Esta hipótesis explicaría porque los productos de las levansacarazas de bacterias gram negativas son FOS de cadena corta en contraste con bacterias gram positivas que producen oligosacáridos de cadena más larga o polímeros de levana (I. Polsinelli *et al.*, 2020).

En un estudio reciente, Hill *et al.*, 2020 mostraron una evidencia indirecta sobre la función de este OBS2 de *E. tasmaniensis*, al comparar por alineamiento de secuencia la naturaleza de los aminoácidos homólogos en la levansacarasa de *Puccinia graminis*. Los autores observaron que a diferencia de la LS de *E. tasmaniensis*, la zona del OBS2 equivalente en *P. graminis* contiene residuos de cadena más corta y menos polares, probablemente esta es la razón por la cual la LS de *P. graminis* presenta una menor tendencia a sintetizar FOS. De la misma forma, la naturaleza de éstos residuos podría favorecer la utilización de la sacarosa como molécula aceptora, produciendo mayores cantidades de 1-kestosa (74% p/p de productos de transfructosilación) (Hill *et al.*, 2020).

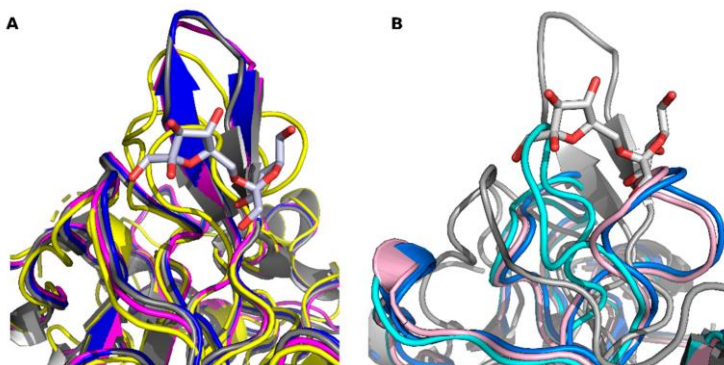


Figura 10. Sitio de unión a oligosacárido de *E. tasmaniensis*. Gris y azul, *E. tasmaniensis* (PDB: 6RV5 y 6FRW respectivamente). A) Unión propuesta de LS de bacterias gram negativas en magenta, *E. amylovora* (PDB 4D47); amarillo, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PDB 1W18). B) Superposición de LS de bacterias gram positivas. Azul marino, *B. subtilis* (PBD: 1OYG); cian y rosa, *B. megaterium* (PDB: 3OM7 y 3OM2, respectivamente) (I. Polsinelli *et al.*, 2020).

2.4. Aplicación de herramientas computacionales para el estudio de la procesividad de las enzimas.

A partir de simulaciones de DM (20 ns) se evaluó el papel del dominio V en la modulación de las interacciones glucano-enzima de la glucansacarasa de *S. mutans*, en los sistemas con (GTF-V) y sin dominio V (GTF). Los sistemas fueron diseñados para reproducir los aspectos estructurales esenciales de la asociación glucano-enzima, que surgen del crecimiento de la cadena de oligosacárido. Se construyeron una serie de modelos de glucano-enzima utilizando las estructuras equilibradas de la enzima GTF y GTF-V, y un conjunto de cadenas de oligosacáridos con 8, 13, 18 y 23 unidades de glucosa. Este último sistema, permite la interacción entre el final de la cadena de oligosacáridos y las regiones de unión a glucano del segmento C-terminal del dominio V. Se examinaron los cambios de flexibilidad local en la proteína tras la incorporación del dominio V mediante cálculos de RMSF (*Root mean square fluctuation*) en ambos modelos. Los resultados revelaron que el dominio V es una región proteica altamente flexible y su presencia implica cambios conformacionales locales significativos que permiten un mayor número de contactos glucano-enzima en los dominios A, B, IV y V. En el caso del modelo GTF sin dominio V, el oligosacárido en crecimiento sobresale fuera del dominio B hacia el solvente con contactos mínimos con la proteína. El grado de interacción entre el dominio V y el oligosacárido a lo largo de las unidades de glucosa 17 a 21 indicó que, este dominio proteico es fundamental para mantener los contactos glucano-enzima durante la síntesis de la cadena de polisacárido. Estos resultados sirvieron para apoyar la idea del dominio V como auxiliar de un mecanismo enzimático procesivo para la glucansacarasa de *S. mutans* (Osorio *et al.*, 2019).

En estudios sobre el OBS2, la aplicación de un enfoque de modelado molecular para imitar el acoplamiento de glucógeno en la superficie de la enzima, el análisis conformacional de los sistemas de acoplamiento, combinado con cálculos robóticos y experimentos de mutagénesis sitio dirigida, proporcionó información fructífera sobre la especificidad del amilosacarasa de *Neisseria polysaccharea* hacia el glucógeno (Albenne *et al.*, 2007). Estos resultados permitieron proponer un mecanismo dinámico avanzado de elongación del glucógeno mencionado en el apartado 2.3.2. Contribución sobre la procesividad.

3. JUSTIFICACIÓN

Aunque los resultados de investigaciones recientes han demostrado que los OBS pueden ser funcionales en enzimas fructosiltransferasas, los sitios de unión secundarios no se han estudiado a detalle en estas enzimas, al contrario de lo que se ha reportado para las enzimas glicosiltransferasas especialmente de la familia GH13 y GH11 (S. Cuyvers *et al.*, 2011; Koropatkin & Smith, 2010). La identificación del OBS2 en la estructura cristalográfica en la levansacarasa de SacB en combinación con su caracterización por mutagénesis sitio dirigida podría proporcionar información relevante sobre la modulación en formación de polímero y arrojar luz en otras enzimas LS sobre la importancia de un nuevo sitio de unión superficial secundario que se encuentra en el dominio catalítico pero alejado de la cavidad catalítica. De especial relevancia sería relacionar la funcionalidad del OBS2 sobre la diferencia estructural de LS gram positivas y gram negativas. De igual manera, comprender si este segundo sitio confiere alguna ventaja evolutiva a las enzimas unidominio sobre levansacarasa multidominio.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en el estudio de mutagénesis sitio dirigida se ha demostrado que el OBS1 participa en el mecanismo de elongación no procesivo. Sin embargo, aún no se ha estudiado la participación del sitio OBS2 en la actividad catalítica, la especificidad o el mecanismo de elongación.

A través del estudio por mutagénesis de los residuos presentes en el OBS2 podríamos complementar el mecanismo de elongación, de esta manera y a través del perfil de productos esperamos explicar el papel de estos residuos en el mecanismo bimodal de SacB; y probablemente ver un efecto en la afinidad por el sustrato, la actividad hidrolítica o transferasa de la enzima.

5. HIPÓTESIS

El sitio de unión OBS2 está implicado en la actividad, procesividad y/o especificidad de la enzima levansacarasa SacB de *B. subtilis*.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

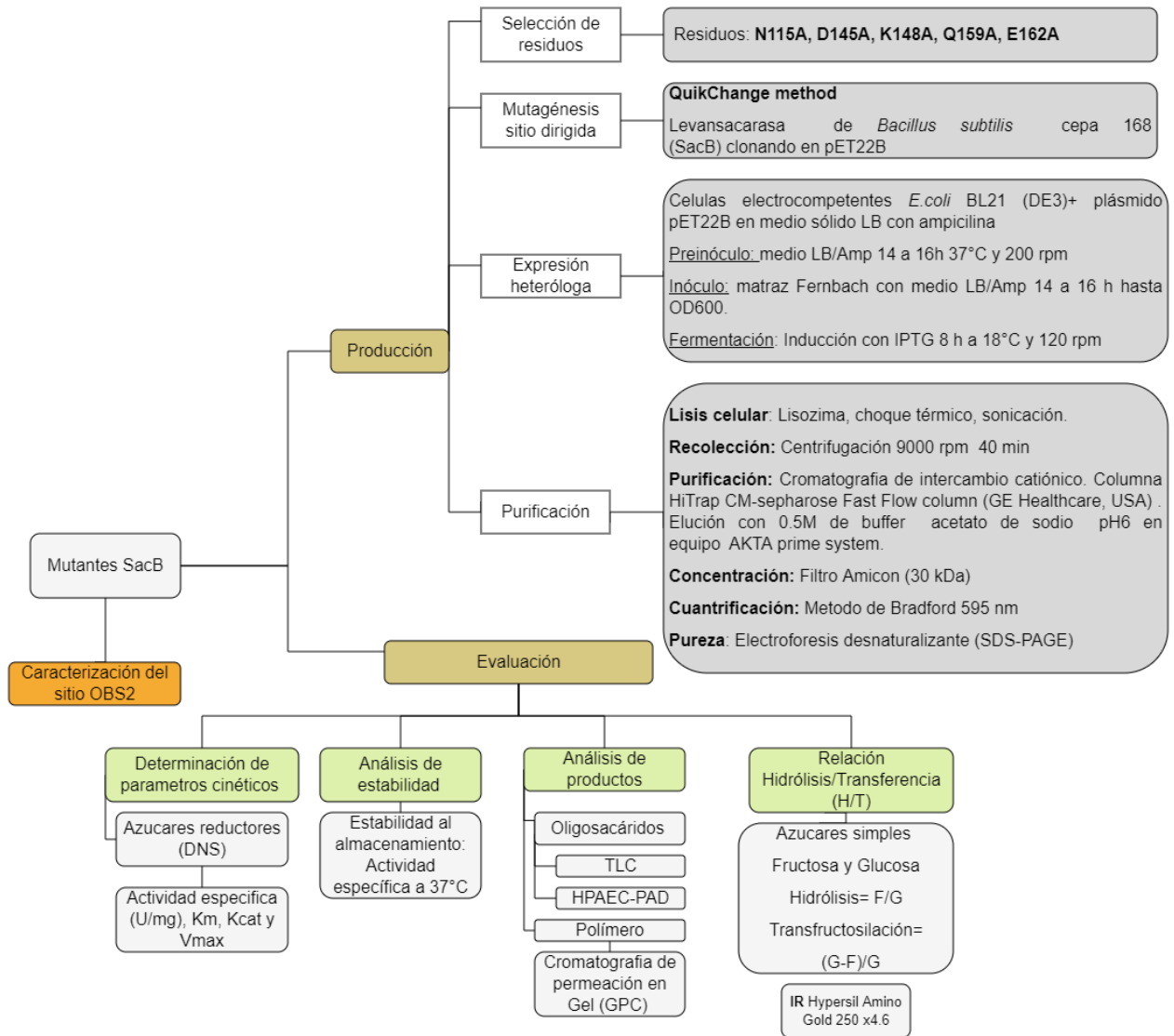
Estudiar la funcionalidad de los residuos presentes en el sitio secundario de unión a oligosacáridos (OBS2) de la levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis*.

6.2. Objetivos particulares:

Estudiar el papel de los residuos del sitio OBS2 sobre:

- La actividad enzimática y constantes cinéticas de la levansacarasa SacB.
- El mecanismo de elongación de SacB.
- La especificidad de la enzima.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7.1. Cepas y plásmidos

Las cepas de *E.coli* DH5 α y *E.coli* BL21 (DE) (Thermo Fisher Scientific) fueron utilizadas como hospederos para la producción de plásmido y proteína recombinante, respectivamente. El gen de la LS (sin contar con el péptido señal nativo, primeros 30 residuos de su secuencia), está insertado entre los sitios de restricción del NdeI y BamHI del vector pET22B, de modo que no contiene el péptido señal peIB del mismo vector y en cambio contiene un tag de 6 histidinas en el extremo C-terminal. El vector contiene un gen de resistencia al antibiótico ampicilina, un origen de replicación y un promotor LacI que induce la transcripción del gen clonado.

7.2. Generación de mutantes

Se introdujeron las mutaciones en el gen de la levansacarasa (LS) de *Bacillus subtilis* cepa 168 (SacB) clonado en el vector pET22B por mutagénesis sitio dirigida.

7.2.1. Diseño de oligonucleótidos

Para la generación de mutantes N115A, K148A, Q159A y E162A se evaluó el diseño de oligonucleótidos total y parcialmente sobrelapados, éstos últimos realizados a partir del método de optimización de QuicKChange II *site directed mutagenesis* (Stratagene) propuesto en la literatura (Xia *et al.*, 2015). Las secuencias de los oligonucleótidos parcialmente sobrelapados generados se muestran en la Tabla 1. Los oligonucleótidos totalmente sobrelapados se muestran en el Anexo A.

Tabla 1. Oligonucleótidos parcialmente sobrelapados utilizados en la generación en la mutagénesis sitio dirigida.

Oligonucleótido	Secuencia de DNA
N115A Fw	5'-GAT CCT AAA GCG GCG GAT GAC ACA TCG-3'
N115A Rv	5'- TC ATC CGC CGC TTT AGG ATC TCC GGC TAA -3'
K148A Fw	5'-GAC AGC GAC GCA TTC GAT GCA AAT GAT TCT ATC CT-3'
K148A Rv	5'-C ATC GAA TGC GTC GCT GTC TTT AAA GAC GCG-3'
Q159A Fw	5'-CTA AAA GAC GCA ACA CAA GAA TGG TCA GGT TCA-3'
Q159A Rv	5'-TC TTG TGT TGC GTC TTT TAG GAT AGA ATC ATT TGC-3'
E162A Fw	5'-AA ACA CAA GCA TGG TCA GGT TCA GCC ACA TTT ACA-3'
E162A Rv	5'-CC TGA CCA TGC TTG TGT TTG GTC TTT TAG GAT AGA-3'

7.2.2. Mutagénesis sitio dirigida

Se realizaron las reacciones de PCR con oligonucleótidos parcialmente sobrelapados con las enzimas *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific) ó *Q5 DNA polymerase* (New England Lab) bajo las siguientes condiciones 1) 98 °C 30 s; 2) 18 ciclos: 98 °C 10 s; 67 ó 69 °C, 30 s; 72 °C 210 s; 3) 72 °C 10 min. Para los oligonucleótidos totalmente sobrelapados para las mutantes N115A, K148A y Q159A se utilizó la enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo

Fisher Scientific) ó Vent polimerasa (New England Lab) bajo las siguientes condiciones: 1) 98 °C 30 s; 2) 18 ciclos: 98 °C 10 s; gradiente 56-64 °C, 30 s; 72 °C, 210 s, 3) 72 °C 10 min; y 1) 95 °C 1 min; 2) 16 ciclos: 94 °C 30 s; 60 °C 60 s; 72 °C 7 min; 3) 72 °C 10 min, respectivamente. Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para visualizar que el tamaño correspondiera a 6.8 kb (plásmido pET22-B con inserto del gen de SacB), posteriormente se siguió el protocolo de QuickChange II *Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene).

7.2.1. Transformación en *E. coli* DH5α y BL21 (DE).

Los plásmidos de SacB y las mutantes fueron transformados en células electrocompetentes de *E. coli* DH5α para la obtención de plásmidos y *E. coli* BL21 para la expresión proteica. El ADN plasmídico (10 μL pET22-B en DH5α y 1 μL en BL21 (DE)) fue clonado en 60μL de células electrocompetentes de *E. coli* cepa DH5α con un electroporador MicroPulcer (BioRad). Las bacterias transformadas fueron incubadas en 600 μL de medio LB en agitación a 37 °C por una hora. Posteriormente, se sembraron en medio sólido LB con ampicilina como antibiótico de selección a 37 °C durante 12 horas.

7.2.2. Producción y purificación de plásmido

Las clonas candidatas de DH5α fueron incubadas en 5 mL de medio LB con ampicilina a 37 °C por 12 horas. El plásmido de las clonas candidatas se purificó con *Zyppy Plasmid Miniprep Kit* (Zymo research), se concentró por medio del equipo *Savant SpeedVac Concentrator DNA* y se verificó su calidad por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

7.2.3. Verificación de la mutación por secuenciación

Las construcciones obtenidas se verificaron en la unidad de síntesis y secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología (UNAM). La mutante SacB D145A se retomó del trabajo de Jazmin Avilés (datos no publicados) y se verificó por secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron analizadas por blastnp en la página del NCBI (<http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast>).

7.3. Expresión heteróloga de enzimas recombinantes

A partir de las células transformadas de *E. coli* cepa BL21 (DE3), se realizó un preinóculo de las células transformadas en medio LB con ampicilina de 14 a 16 h a 37 °C y 200 rpm. Se tomó una alícuota del preinóculo para incubarla en matraces tipo *Fernbach* con medio LB adicionado con ampicilina por 14 a 16 h a 37 °C y 200 rpm hasta obtener una OD600 nm de 0.6, momento en el cual se realizó la inducción con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.2 mM durante 8 h a 18 °C y 120 rpm. Una vez transcurrido el tiempo de inducción, se separaron las células del sobrenadante por centrifugación a 3,700 x g y se lavaron en 3 ocasiones con amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 6. La lisis celular se realizó resuspendiendo en amortiguador adicionado con lisozima y se congeló y

descongeló tres veces, posteriormente se realizó una sonicación. El sobrenadante se obtuvo por centrifugación a 9,000 x g durante 40 min a 4 °C y se resuspendió en buffer de fosfatos 0.1M, pH 6.0.

7.4. Purificación y análisis de proteínas

7.4.1. Purificación de SacB y mutantes

Las enzimas se purificaron mediante cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC por sus siglas en inglés) en un equipo ÄKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech), empleando una columna de 5 mL de intercambio catiónico HiTrap CM-sepharose Fast Flow (GE Healthcare) de acuerdo al procedimiento establecido por (Méndez-Lorenzo *et al.*, 2015). La columna se equilibró con 5 volúmenes de buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 6 empleando una bomba peristáltica y posteriormente el extracto enzimático se hizo recircular durante 40 minutos a un flujo de 5mL/min. Una primera elución se realizó con buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.0. Posteriormente se realizó una segunda elución con 50% de buffer de fosfatos a 0.1 M, pH 6.0 y 50% de buffer de fosfatos a 1.0 M, pH 6.0, en donde se colectaron las fracciones donde eluyó la proteína identificada por UV a 280 nm. Se concentró la enzima transfiriendo las fracciones eluidas a filtros Amicon Ultra-4 (Merck Millipore corte molecular 30 kDa). Se centrifugó por 20 min a 3,700 x g, y se intercambió por buffer de trabajo añadiendo a los filtros moleculares amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 adicionado con CaCl₂ 1mM.

7.4.2. Cuantificación de proteínas

La proteína total del extracto enzimático se cuantificó mediante el método de Bradford utilizando el reactivo *Protein Assay* (Bio-Rad) utilizando una curva de albúmina sérica bovina como estándar medida a 595 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

7.4.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para analizar la pureza de las enzimas se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes al 10% (SDS-PAGE). Se cargaron las enzimas en carriles separados mezcladas con amortiguador de carga para proteínas adicionado 10% de β-mercaptoetanol. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara *Mighty Small II* empleado un campo eléctrico a 20 mA. Al finalizar, el gel se tiñó con solución de azul Coomassie y fue desteñido con una solución de metanol, ácido acético y agua (4:1:5).

7.4.4. Ensayo enzimático estándar

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo empleando una concentración de enzima de SacB y mutantes de 0.01 μM para evaluar el efecto sobre la síntesis preferencial de levan A, 1 μM para evaluar el efecto sobre la síntesis preferencial de levan B y 0.1 μM para evaluar el efecto en el perfil

bimodal de producción de polímero. También se evaluaron reacciones con 1 U/mL para las mutantes con actividad específica reducida. Todas estas concentraciones fueron evaluadas en presencia de 100 g/L de sacarosa en amortiguador de acetatos 50 mM, pH 6.0 adicionado con CaCl₂ a una temperatura de 37 °C y en un volumen de reacción de 600 µL con agitación constante (350 rpm). Las reacciones fueron evaluadas a distintos tiempos deteniendo la reacción de 600 µL por congelación en hielo seco/acetona y la posterior inactivación de la enzima calentándola por 15 minutos en agua hirviendo. Las reacciones fueron centrifugadas a 12000 rpm para la eliminación de la proteína precipitada, además fueron resguardadas en refrigeración hasta su análisis. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

La actividad enzimática de SacB y las mutantes se determinó mediante la cuantificación de azúcares reductores liberados mediante la técnica de DNS (Miller, 1959) midiendo la absorbancia a 540 nm y se compararon los valores con una curva de calibración con una solución equimolar de glucosa y fructosa como referencia. La actividad global de SacB y las mutantes se midió como la liberación de glucosa al medio. La actividad global será definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar un µmol de glucosa por minuto a partir de una solución de sacarosa de 100 g/L a 37 °C y pH de 6.

7.5. Determinación de las propiedades cinéticas de las mutantes del OBS2

Las velocidades iniciales de las mutantes del OBS2 realizadas a pH 6, 37°C y 1mM de CaCl₂ fueron determinadas en un intervalo de 0 a 300 mM de sacarosa. Se utilizó la técnica del DNS para cuantificación del poder reductor. Los valores de V_{max}, k_{cat} y K_m fueron calculados ajustando los datos a la ecuación no lineal de Michaelis-Menten utilizando el programa GraphPad Prism 9.

Ecuación de Michaelis-Menten

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \quad V_{max} = k_{cat} E_t$$

7.6. Determinación de estabilidad al almacenamiento de las mutantes Q159A y E162A

Se determinó la estabilidad a 37°C de la enzima SacB WT y las mutantes Q159 y E162A. Con tal finalidad, se incubó 1 U/mL de cada enzima a 37°C, a partir del cual se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para determinar la actividad residual a 37°C mediante la técnica de DNS. A partir de los datos recopilados se determinó el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la enzima silvestre y las mutantes antes mencionadas; así como la constante de desactivación de primer orden (k). Con la constante de desactivación fue posible estimar la vida media de la siguiente manera:

$$\ln Act = -kt$$

$$\ln \frac{A}{A_0} = kt$$

Donde A_0 y A son la actividad inicial y actividad al tiempo t respectivamente

A partir de estos valores se determinó la vida media ($t_{1/2}$) como:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

7.7. Identificación y análisis de productos

7.7.1. Azúcares simples.

La cuantificación de fructosa, glucosa y sacarosa liberadas de la síntesis enzimática de SacB y las mutantes se determinó por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y espectroscopía infrarroja (IR). La medición se realizará utilizando una serie de guarda-columna Hypersil GOLD™ Amino (250 x 4.5 mm, Thermo Scientific™) acopladas a un detector de índice de refracción Shodex RI-101 (Showa Denko). Se empleará una elución isocrática con acetonitrilo/agua (80:20) como fase móvil a un flujo de 1.2 mL/min y una temperatura de 35°C. Se compararán los resultados con una curva de calibración con reactivos comerciales de glucosa, fructosa y sacarosa. El cálculo de la relación hidrólisis/transferencia (H/T) se obtendrá a partir de los valores de fructosa (F) y glucosa (G) libres empleando las siguientes ecuaciones:

$$\%H = \frac{F}{G}$$

$$\%T = \frac{G - F}{G}$$

7.7.2. Oligosacáridos.

El análisis de FOS se realizará inicialmente por cromatografía en capa fina (TLC) empleando placas de sílica gel ALUGRAM Xtra SIL G/UV254 (Macherey Nagel) utilizando una mezcla de butanol-etanol-agua (10:6:4 v/v/v) como fase móvil y revelando por aspersion con difenilamina-anilina y calentando. Se utilizó estándares de FOS tipo levana purificados de reacciones del grupo de trabajo del laboratorio.

El análisis de oligosacáridos se realizará mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección de pulso amperométrico (HPAEC-PAD por sus siglas en inglés) en un sistema Dionex DX-500 IC con un detector de pulso amperométrico ED50 y una serie de guarda-columna CarboPac PA-200 (3x 250 mm, Dionex). Los productos se eluirán empleando dos gradientes lineales de acetato de sodio (5-100 mM y 100-400 mM). Como estándares se emplearán glucosa, fructosa, sacarosa (Sigma-Aldrich), fructooligosacáridos tipo inulina oligofructosa Orafti®P95. Así como estándares de la serie 6K y 1K (levanobiosa, 1-kestosa y 6-kestosa y neo kestosa)

7.7.3. Polímeros.

La distribución del peso molecular de los polímeros de levanas sintetizadas se determinará por cromatografía de permeación en gel (GPC). Las determinaciones se llevarán a cabo en un sistema de dos columnas conectadas en serie: Ultrahydrogel Linear (7.8x300 mm) y Ultrahydrogel 500 (7.8x300 mm) con un índice de exclusión entre 0.5 y 10,000 kDa, acopladas a un detector de índice de refracción Shodex RI-101(Showa Denko). Se empleará una elución isocrática con nitrato de sodio como fase móvil (0.1 M a 8 mL/min) a una temperatura de 30 °C. Se compararán los resultados con una curva de calibración a base de dextranas comerciales de distintos tamaños.

7.8. Simulación por dinámica molecular (DM).

Las simulaciones por dinámica molecular fueron realizadas en colaboración con la Dra. Verónica A. Jiménez de la Universidad Andrés Bello en Chile. En el anexo B se detalla el procedimiento seguido.

8. RESULTADOS

8.1. Selección y obtención de las mutantes del OBS2

Los residuos del OBS2 involucrados en la interacción con el segundo oligosacárido se seleccionaron con base en la estructura cristalográfica del complejo SacB (D86A/E342A)-kestolevanohexaosa (PBD ID: 6VHQ)(Raga-Carbajal *et al.*, 2021), en donde el criterio de selección fue la presencia de interacciones por puente de hidrógeno entre la cadena lateral de cada residuo y algún residuo fructosilo del hexasacárido. Se eligieron los aminoácidos N115, D145, K148, Q159 y E162, los cuales fueron mutados por alanina con el objetivo de investigar su función en la actividad enzimática y perfil de producto. Las cinco mutantes del OBS2 fueron obtenidas exitosamente por mutagénesis sitio dirigida con el uso de oligonucleótidos parcialmente sobrelapados empleando la técnica descrita por Xia *et al.*, 2015 (Figura 11) (Anexo C). Una vez obtenidas las proteínas fueron purificadas mediante cromatografía de intercambio catiónico. Finalmente, se logró purificar las cinco mutantes y la enzima SacB WT con un porcentaje mayor al 90% de pureza (Anexo D).

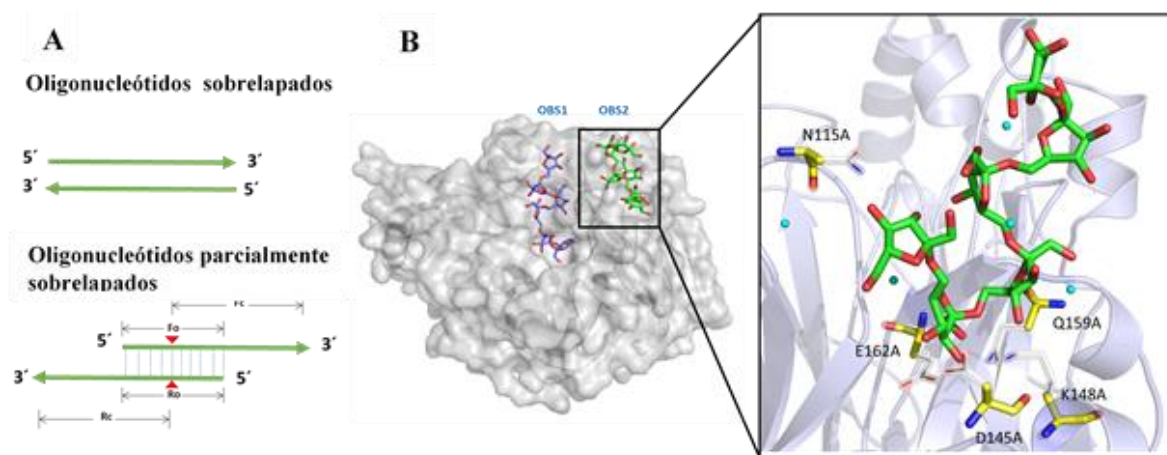


Figura 11. Esquema del proceso de mutagénesis sitio dirigida. A) Mutación sitio dirigida evaluada por modificación del protocolo *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene) a través del diseño de *primers* sobrelapados y parcialmente sobrelapados de acuerdo con la metodología propuesta por (Xia *et al.*, 2015). B) Residuos presentes en el OBS2 sujetos a mutación por alanina, los residuos fructosilo del hexasacárido se presentan en verde y las esferas cian representan moléculas de agua.

8.2. Efecto de las mutaciones en los residuos del OBS2 en la actividad enzimática y constantes cinéticas de la levansacarasa

Para la determinación de actividad enzimática de cada mutante se llevaron a cabo reacciones empleando diversos volúmenes de una solución stock a una concentración 0.165 mg/mL de proteína de cada mutante (correspondiente a 30 U/mL de SacB WT) y sacarosa (100 g/L), empleando buffer de acetatos 50 mM, pH 6 con CaCl₂ 1mM.

En la Tabla 2, se presentan los resultados de los ensayos de actividad específica de SacB WT y las mutantes. En el análisis de las actividades específicas de la enzima SacB WT y las mutantes N115A, D145A y K148A, se puede observar que son prácticamente iguales a la enzima silvestre. El efecto sobresaliente en la introducción de una mutación puntual se presentó en las mutantes E162A y Q159A, donde se evidenció una disminución en la actividad específica que representan un 44% y 39% de reducción de la actividad original de SacB WT.

Los parámetros cinéticos de las mutantes del OBS2 se presentan en la Tabla 2, y fueron determinados a partir de los gráficos de actividad enzimática versus concentración de sacarosa ajustados al modelo de Michaelis-Menten (Figura 12). El análisis de estos datos demostró que, las mutantes N115A, D145A y K148A, poseían valores similares de K_m en comparación a la enzima silvestre. Para la mutante D145A, la velocidad de la transformación de moléculas de sacarosa en producto, determinado como k_{cat} , presentó un valor similar a la enzima silvestre, mientras que las mutantes N115A y K148A mostraron una modesta disminución e incremento respectivamente en la k_{cat} . Sin embargo, ésta se mantuvo en el mismo orden de magnitud de la enzima silvestre. Por el contrario, el efecto de la mutación por alanina en los residuos Q159 y E162 reveló un aumento de casi el doble en el valor de K_m y una disminución en la k_{cat} del 40 % y 65% respectivamente, y como consecuencia una notable disminución en la eficiencia catalítica.

El efecto demostrado de los residuos E162 y Q159 pertenecientes al OBS2 de la LS de SacB confirma que los sitios de unión secundarios pueden ser de ayuda en la unión del sustrato como se ha reportado previamente en la literatura (Sven Cuyvers *et al.*, 2011), por lo que la mutación de estos dos residuos importantes en SacB lleva a una disminución significativa de la catálisis a través de una reducción en la afinidad del sustrato.

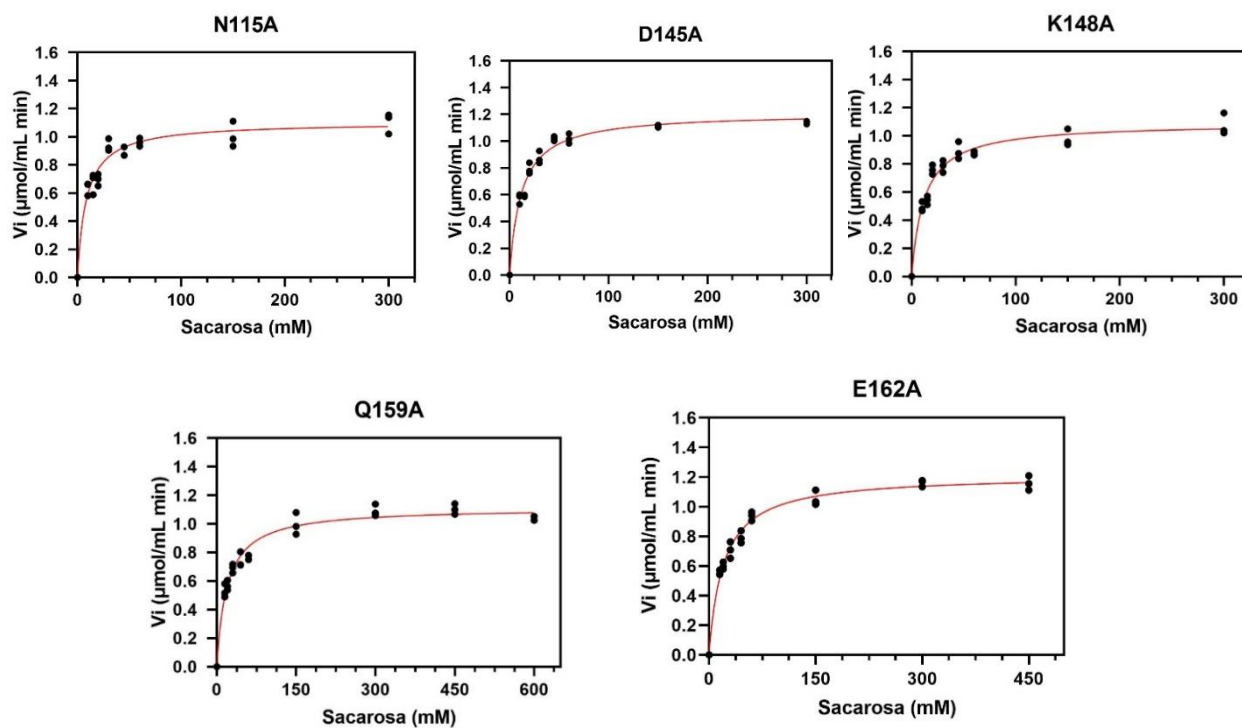


Figura 12. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de reacción de las mutantes del OBS2. En rojo se señala el ajuste no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten.

Tabla 2 Resumen de los resultados de la caracterización cinética de SacB WT y mutantes.

Enzima	1A_e (U/mg)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	V_{max} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)
SacB WT ²	175.91±15.51	9.0±1.80	236.7±10.3	1.36±0.06	26.3
SacB N115A	160.47±8.32	8.67±1.02	189.7±4.70	1.10±0.02	21.8
SacB D145A	192.45±18.07	11.77±0.82	237.6±3.63	1.21±0.02	20.2
SacB K148A	159.63±12.05	11.95±1.14	300.8±7.00	1.09±0.03	25.3
SacB Q159A	77.79±16.90	19.50±1.40	143.3±2.40	1.11±0.02	7.34
SacB E162A	68.92±13.13	20.26±1.14	83.78±1.20	1.22±0.02	4.13

¹Actividad específica;

²(Raga-Carbajal *et al.*, 2021)

8.3. Efecto en la especificidad de reacción: relación hidrólisis/transferencia.

Para determinar la especificidad de reacción de hidrólisis/transferencia (H/T) en las tres condiciones de reacción (0.1 μM , 1 μM y 0.01 μM) en las cuales se modula el perfil de SacB, se cuantificó la concentración de fructosa, glucosa y sacarosa por HPLC-IR (Anexo E).

En la condición de 0.1 μM de enzima, las variantes N115A y K148A mostraron una relación H/T similar a SacB WT (WT H/T 50/50). Para la mutante D145A, la actividad de transferencia disminuyó en un 8%, mientras que para las mutantes Q159A y E162A aumentó ligeramente en comparación con SacB WT (Q159A H/T 42/58 y E162A H/T 44/56). Este aumento en la reacción de transferencia se relaciona con la disminución en la actividad específica de las mutantes E162A y Q159A mencionado anteriormente, debido a que la actividad transferasa implica la liberación de solo un residuo de glucosa proveniente de la sacarosa y por lo tanto, una menor liberación de azúcares reductores.

Estudios previos informan que el efecto de la concentración enzimática de SacB sobre la reacción origina que, con bajas concentraciones, se presente un aumento en el porcentaje de transferencia (0.01 μM de enzima, H/T 27/73) en comparación con la condición estándar. En contraste, con altas concentraciones de enzima (1 μM SacB WT), se origina un aumento en la reacción de hidrólisis hasta un 59% (Raga-Carbajal *et al.*, 2016). La importancia de los residuos del OBS2 para la reacción de transfructosilación en condiciones donde se favorece el mecanismo procesivo (0.01 μM de enzima) de la LS de SacB, está representada por la disminución (9%) de la actividad transferasa del residuo N115. Todas las demás variantes presentaron una relación H/T similar a la enzima silvestre en estas condiciones. Por otro lado, la actividad de transferencia de la reacción durante la evaluación de la síntesis preferencial de levan B (1 μM de enzima), osciló entre 41%, y 47%. Los efectos sobre este parámetro aumentaron ligeramente en un 5% en las mutantes N115A y K148A en contraste con la enzima de tipo silvestre.

En la evaluación con 1 U/mL de enzima se observa que las mutantes E162A y Q159A no presentaron grandes cambios con respecto a lo observado en SacB WT. Sin embargo, debido al efecto de las mutaciones en las constantes catalíticas en estos residuos se resalta que las mutantes Q159A y E162A requirieron 15 horas más para alcanzar la misma conversión de sacarosa que la enzima silvestre.

Los cambios observados en la relación H/T de los residuos N115, K148, Q159 y E162 proporciona una evidencia de que el sitio OBS2 está implicado en la modulación de la especificidad de reacción, aunque este efecto no favorece únicamente una reacción en específico ya que dependería de localización del residuo y las condiciones de reacción evaluadas.

8.4. Caracterización del perfil de productos de las mutantes del OBS2.

8.4.1. Caracterización de las mutantes sobre la producción de polímero.

Con la finalidad de tener una comparación del perfil de productos precisa entre las mutaciones con la SacB WT, se presentan los resultados de la síntesis de polímero por porcentaje de conversión de sacarosa. En la figura 13, se muestra la comparación del perfil de polímero de SacB y las mutantes en las tres condiciones de reacción evaluadas. En la figura 13 A, podemos observar que el perfil bimodal se mantiene en condición estándar de reacción para todas las mutantes (0.1 μM), con cambios notorios en el perfil de levan A (Figura 13 A, 19.5 min de tiempo de retención). Las cinéticas de reacción para cada mutante con 0.1 μM de proteína se presentan en el Anexo F, en el cual se puede apreciar la acumulación gradual de los polímeros de levan B (7.2 kDa) y levan A (2300 kDa).

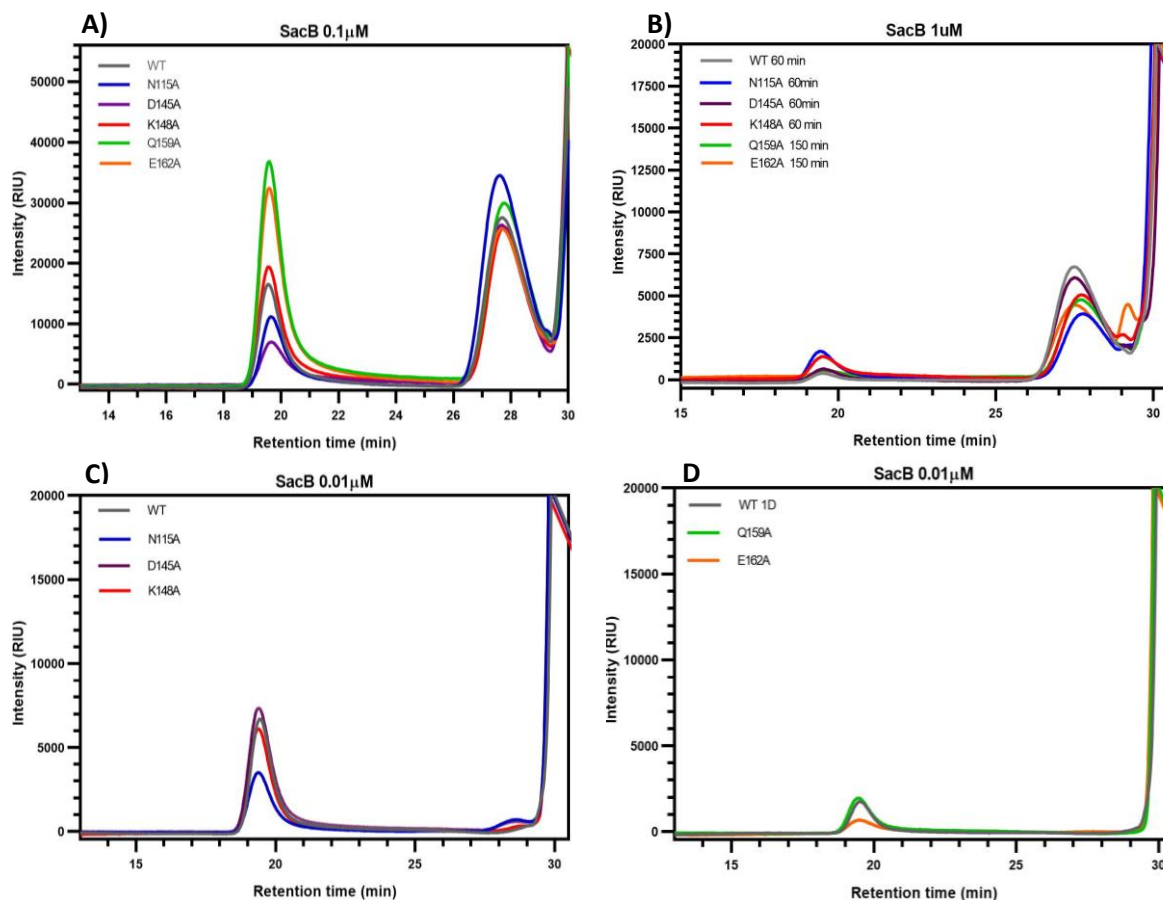


Figura 13. Perfil de polímero de SacB y mutantes obtenidos por GPC. A) Conversión de sacarosa mayor del 80%, 0.1 μM de enzima, SacB WT y mutantes N115A, D145A y K148A 9 horas de reacción. Mutantes Q159A y E162A 36 y 72 horas respectivamente. B) Conversión de sacarosa mayor del 80%, 1 μM de enzima, SacB WT y mutantes N115A, D145A y K148A 60 minutos de reacción. Mutantes Q159A y E162A 120 y 150 minutos respectivamente. C) Conversión de sacarosa mayor del 50%, 0.01 μM de enzima, SacB WT y mutantes 7 días de reacción. D) Conversión de sacarosa cercana al 35%, 0.01 μM de enzima, SacB WT 1 día de reacción y 7 días para las mutantes Q159A y E162A.

Por otro lado, en condiciones con baja concentración de proteína ($0.01\mu\text{M}$), se observó una disminución en la síntesis de levan A por la mutante N115A acompañado de un incremento en la síntesis de levan B (Figura 13 C). La disminución en la síntesis de levan A, también fue observado en la mutante E162A (Figura 13 D). Resulta interesante observar que, a condiciones de alta concentración de proteína ($1\mu\text{M}$) donde el OBS1 rige el mecanismo no procesivo (Raga-Carbajal *et al.*, 2021), las mutantes N115A y K148A presentan un cambio en la síntesis de polímero que originó un perfil bimodal más definido que la enzima silvestre (figura 13 B).

Con el propósito de determinar con mayor exactitud los cambios originados en el perfil de polímero en cada concentración de reacción evaluada, se cuantificó la concentración de levan B y levan A, a través de una curva estándar de cada polímero (Figura 14). A partir de las concentraciones de polímero se determinó el factor de selectividad de producto de cada mutante, definido como la concentración de levan A (g/L) sobre la concentración de levan B (g/L) (Tabla 3). A continuación, se detalla el efecto de la concentración de levan A, levan B y el factor de selectividad sobre las mutantes del OBS2 en cada concentración de proteína evaluada ($0.01\mu\text{M}$, $0.1\mu\text{M}$ y $1\mu\text{M}$).

Como se ha reportado previamente, se observa que en condición estándar ($0.1\mu\text{M}$) SacB WT favorece la síntesis de levan B sobre levan A (Tabla 3) (Raga-Carbajal *et al.*, 2016). En esta condición las mutantes N115A y D145A presentaron una significativa disminución cercana a la mitad del factor de selectividad de producto, indicando una tendencia reducir la síntesis de levan A (concentración de levan A de 4.21 ± 0.15 g/L para D145A y 6.41 ± 0.47 g/L para N115A) sobre levan B en contraste con la enzima silvestre (9.74 ± 0.30 g/L de levan A para SacB WT) (Tabla 3, figura 14 A). El efecto contrario fue observado en las mutantes E162A y Q159A en las cuales los factores de selectividad de producto casi duplican su valor, incrementando la síntesis de levan A en un 97% por la mutante Q159A y 70% en la mutante E162A con respecto a la enzima silvestre (Tabla 3, figura 14 A). No se observaron cambios en la la producción de levan B con $0.1\mu\text{M}$ de enzima, con excepción de la mutante N115A que aumentó en un $19\%\pm 3$ con respecto a la WT (Figura 14, A barras negras).

Por otro lado, los datos experimentales obtenidos sobre la evaluación de las mutantes bajo condiciones de reacción con bajas concentraciones de enzima ($0.01\mu\text{M}$) y comparadas en el 50% de conversión de sacarosa, revela una disminución significativa del factor de selectividad de producto en la mutante N115A debido tanto a la disminución significativa de un 50% en la síntesis de levan A, como a la presencia de levan B (1.6 ± 0.34 g/L) (Tabla 3, figura 14 B). La acumulación de levan B en la mutante N115A sucede después de 5 días de reacción. Sin embargo, la síntesis de levan A es más lenta desde los primeros días de reacción originando una pendiente de producción más reducida que la enzima silvestre (Anexo G, figura 37).

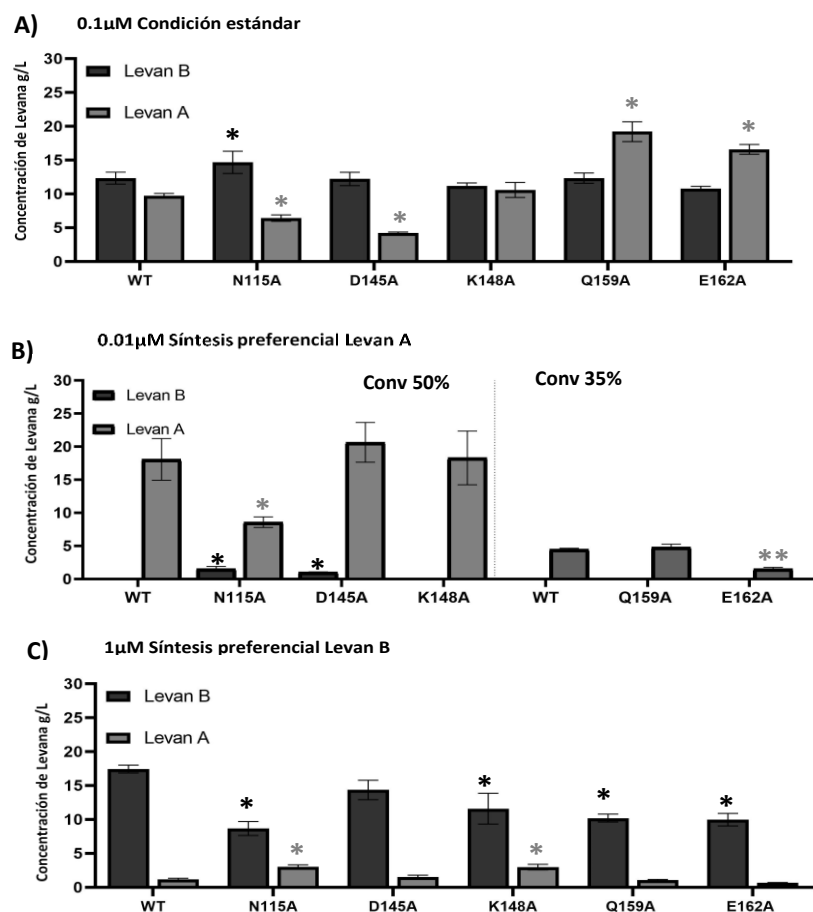


Figura 14. Comparativa de la producción de levana de las mutantes del OBS2 bajo las 3 condiciones de reacción. A) Conversión del 80% con 0.1 μM de enzima B) Conversión del 50% ó 35% con 0.01 μM enzima y C) Conversión del 80% con 1 μM de enzima. Condiciones de reacción 100 g/L sacarosa, 37°C y pH 6.
* Significativamente diferente de la enzima de tipo silvestre según la prueba t de Student (P <0.05).

Tabla 3. Producción de polímeros de levana de SacB WT y mutantes del OBS2. Los factores de selectividad de producto relativo (levan A/levan B) se muestran como la media ± DE. Condiciones de reacción 100 g/L sacarosa, 37°C y pH6.

Enzima	Factor de selectividad de producto		
	0.1 μM	0.01 μM	1 μM
WT ^A		63.2±1.79	
WT ^{BC}	0.8±0.07	254.8±31.4	0.1±0.01
N115A	0.4±0.08*	5.4±1.77*	0.3±0.01*
D145A	0.3±0.02*	19.7±2.47*	0.1±0.01
K148A	0.9±0.10	278.1±28.5	0.3±0.01*
Q159A	1.6±0.14*	67.8±6.46	0.1±0.00
E162A	1.5±0.06*	21.5±2.42**	0.1±0.01

^A Conversión del 35% y ^{B, C} conversión del 80% con 0.1 μM y 1 μM o 50% con 0.01 μM de enzima.

* Significativamente diferente de la enzima de tipo silvestre con conversión del 80% (0.1 μM y 1 μM) ó 50% (0.01 μM) en el factor de selectividad de producto según la prueba t de Student (P <0.05).

** Significativamente diferente de la enzima de tipo silvestre con conversión del 35% (0.01 μM) en el factor de selectividad de producto según la prueba t de Student (P <0.05).

Aunque la mutante D145A presenta una disminución del factor de selectividad de producto, este fue originado por la síntesis de levan B al séptimo día de reacción (Tabla 3, figura 14 B, barra negra). En la conversión de sacarosa del 35% y 0.01 μM , la mutante E162A mostró una diferencia significativa en la síntesis de levan A originando una disminución en el factor de selectividad de producto de más de la mitad del valor (Figura 14 B). La curva de progreso de la mutante Q159A con 0.01 μM de enzima, sugiere que el efecto de esta mutación es cinético, debido a que la concentración de levan A al día 7 es equiparable a la obtenida por la enzima silvestre al mismo porcentaje de conversión (Anexo G, figura 37).

En la condición de reacción con 1 μM , todas las mutantes con excepción de la mutante D145A, originaron una variación significativa de concentración en la síntesis de levan B (Figura 14 C). El incremento significativo de 3 veces en el factor de selectividad de producto de las mutantes N115A y K148A indica que, a diferencia de la enzima silvestre estas mutantes sintetizaron más polímero de levan A mostrando un perfil bimodal en mayor proporción que SacB WT (Figura 14 C y Tabla 3). Por otro lado, aun cuando las mutantes E162A y Q159A presentaron una disminución en la síntesis de levan B, estas mutantes mantienen un valor similar de factor de selectividad de producto debido a que, de manera general producen menos polímero en esta condición de reacción. El cambio en la producción de polímero y la ausencia de cambios relevantes en la actividad transferasa con 1 μM de enzima en las mutantes E162A y Q159A con respecto a la enzima silvestre, sugiere que existe un cambio en la polimerización que limita la elongación. Esta limitación en la síntesis de polímero fue observada como una pendiente considerablemente más reducida para la síntesis de levan B en las curvas de progreso de las mutantes Q159A y E162A (Anexo G, figura 38 B).

Los resultados experimentales permiten concluir que, en condiciones estándar de reacción, el efecto del OBS2 sobre el mecanismo de polimerización está relacionado principalmente con el mecanismo procesivo de SacB, a través del cual se rige la producción de levan A. La disminución en la síntesis de levan A por la mutante N115, confirma su papel como parte del OBS2 sobre la procesividad de la enzima, limitando la concentración de polímero de alto peso molecular a través de la disminución en la k_{cat} observada previamente. Contrariamente a lo esperado, este estudio encontró que la mutación por alanina en los residuos Q159 y E162 modifican el mecanismo de polimerización favoreciendo la producción de levan A, cuyo resultado es consistente con el aumento en la transferencia observado en las mutantes. Sin embargo, son más lentas en comparación con la enzima WT. Este último aspecto se aprecia con mayor claridad en la figura 15, en donde se observa que la mutante Q159A sintetiza 8.7 ± 0.22 g/L de levan A a las 12 horas de reacción mientras que, la enzima SacB requiere 7 horas para producir la misma cantidad de polímero. La mutante E162A es aún más lenta que Q159A, ya que requiere 24 horas para producir 7.74 ± 1.30 g/L de levan A (figura 15, D).

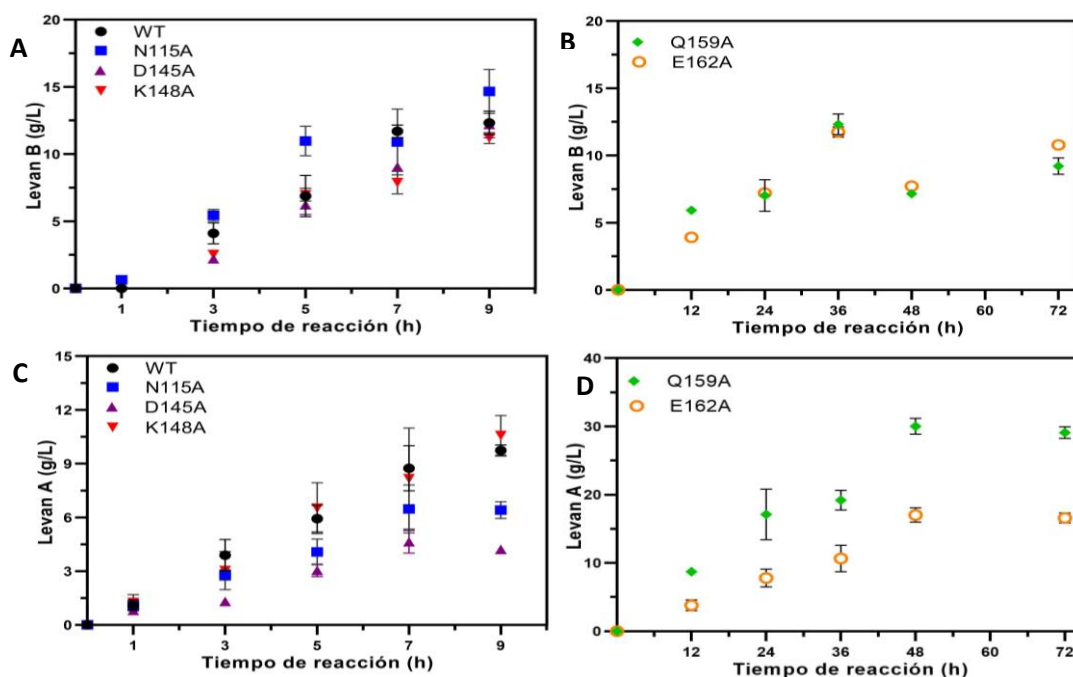


Figura 15. Efecto de las mutaciones en las curvas de progreso de las reacciones enzimáticas evaluadas con 0.1 μM de enzima. Las gráficas A y B representan la curva de progreso de producción de polímero de bajo peso molecular (levan B), mientras que las gráficas C y D representan la producción de polímero de alto peso molecular (levan A); ambos grupos realizados con 100 g/L de sacarosa, 37 °C, pH 6 y 0.1 μM de enzima.

La evaluación en condiciones de baja concentración de enzima (0.01 μM) permitió centrar la participación del OBS2 en el mecanismo procesivo en dos residuos esenciales. Los cambios principales en la evaluación han sido la disminución significativa de la mutante N115A y E162A en la síntesis de levan A. En el caso de la mutante N115A esta disminución se correlaciona con la reducción en la actividad transferasa observada en el apartado anterior, principalmente hacia la síntesis de polímero de alto peso molecular originando la acumulación de polímero de bajo peso molecular.

Estudios previos resaltan la importancia de las interacciones proteína-proteína sobre el perfil de polímero observado en SacB en altas concentraciones de proteína (Porrás-Domínguez *et al.*, 2015; Raga-Carbajal *et al.*, 2016). El estudio en condiciones alta concentración de proteína (1 μM) ha indicado que, el aumento en la actividad transferasa reportado anteriormente por las mutantes N115A y K148A influyó en la variación del perfil sintetizando polímero de alto peso molecular cuando la enzima silvestre no favorece este mecanismo. Por otro lado, en las mutantes Q159A y E162A se originó un cambio en la polimerización llevando a una menor síntesis de polímero en contraste con la enzima silvestre (Figura 14 C).

8.4.2. Caracterización del perfil de fructooligosacáridos de las mutantes.

Para completar el análisis de productos sintetizados por las mutantes del OBS2, en la figura 16 se presentan los perfiles de producción de oligosacáridos de las 5 mutantes en las 3 condiciones de reacción estudiadas. El perfil de FOS en condiciones estándar de reacción determinado por HPAEC-PAD, no muestra diferencia en la delimitación de tamaño de los compuestos sintetizados por las mutantes en comparación con la enzima SacB WT. Este resultado confirma que bajo las condiciones de 0.1 μM de enzima, el efecto de las mutaciones sobre el mecanismo no procesivo no es relevante.

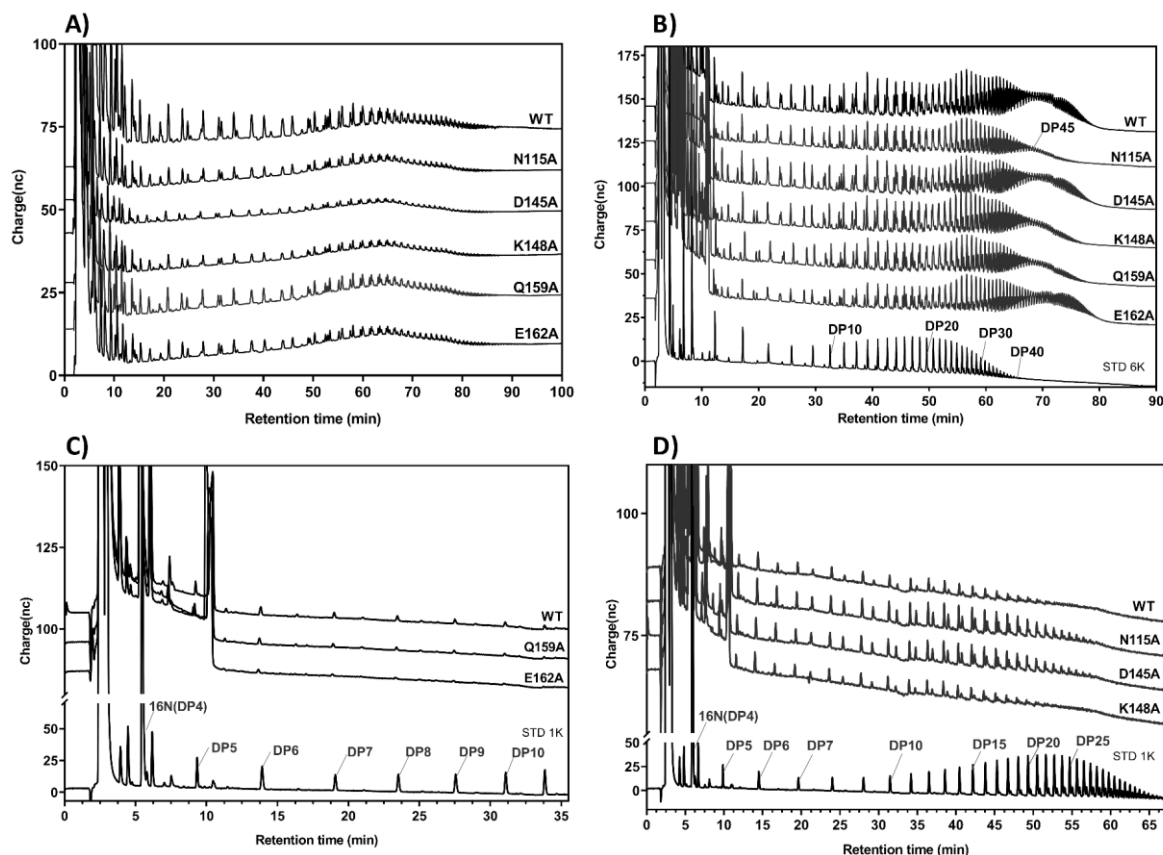


Figura 16. Perfil de oligosacáridos sintetizados medidos por HPAEC-PAD. A) Conversión de sacarosa mayor del 80%, 0.1 μM de enzima, SacB WT y mutantes N115A, D145A y K148A 9 horas de reacción. Mutantes Q159A y E162A 36 y 72 horas respectivamente. B) Conversión de sacarosa mayor del 80%, 1 μM de enzima, SacB WT y mutantes N115A, D145A y K148A 60 minutos de reacción. Mutantes Q159A y E162A 120 y 150 minutos, respectivamente. C) Conversión de sacarosa cercana al 35%, 0.01 μM de enzima, SacB WT 1 día de reacción y 7 días para las mutantes Q159A y E162A D) Conversión de sacarosa mayor del 50%, 0.01 μM de enzima, SacB WT y mutantes 7 días de reacción. Reacciones con 100 g/L de sacarosa, 37 $^{\circ}\text{C}$, pH 6.

Estudios previos han reportado que, SacB WT sintetiza FOS de levana de peso molecular intermedio (hasta GP 40) en la reacción de alta concentración enzimática (Raga-Carbajal *et al.*, 2016). De acuerdo el aumento de levana A observado en concentraciones de enzima 1 μM para las variantes

N115A y K148, estas formaron menos oligosacáridos con GP mayor a 45 (figura 16 B). Una implicación de esto es la posibilidad de que estos oligosacáridos se elonguen de manera más eficiente que la enzima de tipo silvestre.

Previamente se ha reportado que, en condiciones de baja concentración de enzima, la síntesis de levan A se lleva a cabo a través de un mecanismo procesivo donde se producen pocos FOS con GP cercano a 20 (Raga-Carbajal *et al.*, 2016). En condiciones de 0.01 μM , la presencia de polímero de bajo peso molecular detectada por GPC por las mutantes N115A y D145A fue corroborada por el perfil de FOS, donde se detectaron productos con GP hasta de 27 en contraste con la enzima silvestre que sintetizó hasta GP 20 (figura 16 D). Este resultado indicaría que se realizó una elongación mayor en FOS en contraste con SacB WT. De manera análoga se comparó el perfil de FOS por HPAEC-PAD de las mutantes Q159A y E162A contra la enzima silvestre evaluada a 35% de conversión. Una dificultad que se origina en esta conversión es la visualización adecuada de los productos por la síntesis de sólo unos pocos oligosacáridos y las grandes señales de sacarosa residual, glucosa y fructosa. La diferencia más relevante de esta evaluación es el cambio de concentración de FOS en la mutante E162A, en la cual se aprecia una menor intensidad de señal de FOS desde el GP 6 hasta un GP 10, en contraste con la enzima silvestre y la mutante Q159A que tiene un perfil similar hasta el GP 11 (Figura 16 C).

Es interesante observar que, comparando los perfiles de las mutantes, los efectos en la producción de levan A en las mutantes del OBS2 fueron mayores que los observados en levan B. Además, el perfil de FOS confirma que la disminución de polímero de alto peso molecular está ligada con la presencia de mayor cantidad de oligosacáridos en condiciones donde se favorece el mecanismo procesivo (0.01 μM de enzima, mutante N115A). Adicionalmente, se observó que una disminución de FOS se presenta cuando existe mayor síntesis de levan A en condiciones de alta concentración enzimática por una elongación más eficiente que la enzima silvestre (1 μM de enzima, mutantes N115A y K148A).

Para evaluar el impacto de la mutación en el residuo N115A, que fue el residuo que varió más en las tres condiciones de reacción en comparación con la enzima silvestre, al final de la etapa experimental de este proyecto, se realizaron estudios preliminares sobre el efecto de la activación en la velocidad inicial por un aceptor de levana con GP promedio de 16 (concentraciones de 0 a 20 mM). Desafortunadamente no se encontraron diferencias significativas con la enzima silvestre. Sin embargo, la metodología empleada para el análisis del cambio de afinidad de este aceptor tiene una serie de limitaciones, y es que no se ha podido reportar que un aceptor tipo levana no inherente a la reacción en SacB sea elongado hasta el polímero de alto peso molecular. Además, existe una inhibición dirigida por la misma concentración de levana que limita el rango de estudio.

8.4.3. Análisis de la mutación de los residuos Q159A y E162A con 1 U/mL

La evidencia sobre el perfil de producción de polímero de SacB, sugiere que éste no se debe a la actividad enzimática sino a la concentración de proteína de SacB, evidenciado al obtener perfiles de distribución de polímero similares a concentraciones de SacB equivalentes y con variación de actividad de hasta un orden de magnitud (Raga-Carbajal *et al.*, 2016). Aun cuando las diferencias en la actividad enzimática de las mutantes E162A y Q159A con respecto a SacB WT es menor a un orden de magnitud, se decidió analizar la cinética de producción con reacciones con 1 U/mL de enzima para estas dos mutantes, a fin de verificar si el efecto del aumento en la concentración de polímero de alto peso molecular en un 70% y 97% mayor que la enzima silvestre se mantendría en esta condición.

Para la determinación del perfil de producto de cada mutante, las reacciones en condiciones de 1 U/mL fueron monitoreadas por GPC para cada tiempo de muestreo. De manera análoga a los ensayos anteriores las cinéticas de las reacciones en el transcurso del tiempo para cada mutante se presentan en el Anexo H, en el cual se puede apreciar la acumulación gradual de los polímeros levan B (7.2 kDa) y levan A (2300 kDa) de las mutantes Q159A y E162A.

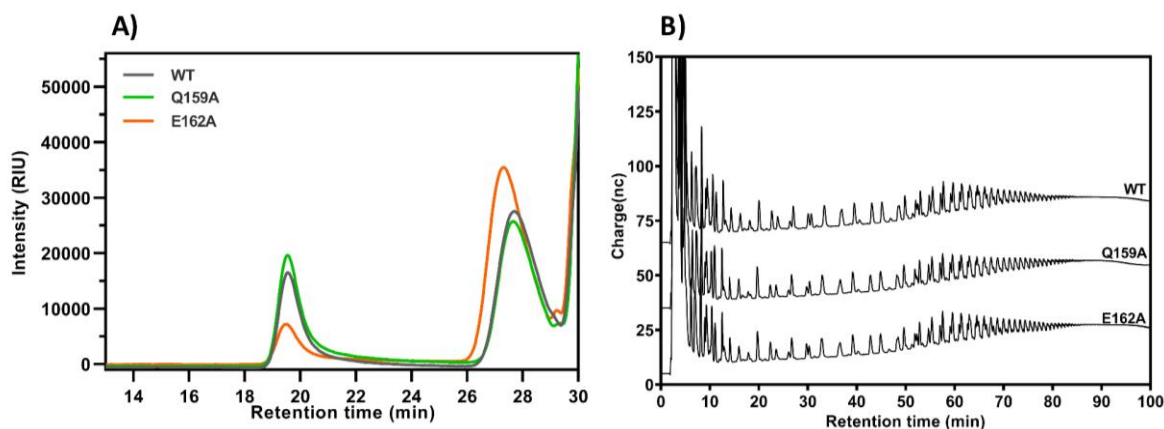


Figura 17. Perfil de productos de SacB y mutantes Q159A y E162A con conversión mayor del 80% y 1 U/mL de enzima. A) Perfil de polímero (levan B y levan A) medido por GPC B) Perfil de oligosacáridos sintetizados medidos por HPAEC-PAD. Condiciones de reacción: 100 g/L sacarosa 37 °C pH 6 y 1 U/mL. SacB WT 9 horas de reacción, Q159A y E162A 24 horas de reacción.

A partir de estos datos, se puede observar que la mutante Q159A presenta un perfil similar a la enzima silvestre tanto en producción de polímero (levan B y levan A) (Figura 17 A) como en el perfil de oligosacáridos (Figura 17 B). Al observar los valores de concentración de polímero de la mutante E162A en la tabla 4, se aprecia una disminución significativa del factor de selectividad de producto debido al aumento de un 22% y disminución del 55% del polímero de levan B y levan A, pero sin un cambio relevante en el perfil de FOS (figura 17).

Comparando los resultados de producción bajo esta condición de reacción de la enzima silvestre y la mutante E162A, se puede resaltar que aunque existe un cambio en la velocidad de la producción, al final de la reacción la mutante E162A no logró equiparar el nivel de producción de levan A como la mutante Q159A, sugiriendo que el efecto de la mutación sobre la polimerización en estas enzimas es diferente. Debido a que se observó que la mutante Q159A demora 15 horas más de reacción para equiparar el perfil de la enzima silvestre, esto sugiere que puede existir un cambio en la estabilidad debido a la mutación. En contraste un perfil diferente en la mutante E162 y la enzima silvestre aun en condiciones con las mismas unidades enzimáticas indica que, existe una participación en la modulación del perfil bimodal de SacB por el residuo E162.

Tabla 4. Comparativa de producción de polímeros de levana de SacB WT y mutantes Q159A y E162A con 1 U/mL. Los datos hacen referencia a una conversión de sacarosa mayor del 80%. Los factores de selectividad de producto relativo (levan A/levan B) se muestran como la media \pm DE. Condiciones de reacción 100 g/L sacarosa, 37 °C y pH 6. SacB WT 9 horas de reacción, Q159A y E162A 24 horas de reacción.

Enzima	Levan B		Levan A		Factor de selectividad de producto (A/B)
	Actividad transferasa (%)	Concentración g/L	Actividad transferasa (%)	Concentración g/L	
WT	27.9 \pm 1	12.32 \pm 0.88	22.09 \pm 1	9.74 \pm 0.30	0.79 \pm 0.07
Q159A	25.4 \pm 1	10.64 \pm 0.32	20.6 \pm 1	8.99 \pm 0.80	0.84 \pm 0.05
E162A	37.8 \pm 0.4	14.59 \pm 0.57*	10.2 \pm 0.4	3.94 \pm 0.23*	0.27 \pm 0.01*

* Significativamente diferente de la enzima de tipo silvestre con conversión mayor del 80% en la concentración de polímero (levan B ó levan A) ó factor de selectividad de producto según la prueba t de Student (P <0.05).

8.5. Estabilidad al almacenamiento de las mutantes Q159A y E162A

Entre otras fuerzas electroestáticas, la hidrofobicidad de una proteína es la principal fuerza impulsora del plegamiento y el aumento de la interacción de los residuos con las cadenas laterales hidrofóbicas dentro de la misma, las cuáles pueden alterar el entorno fisicoquímico y variar la estabilidad de la proteína (Xu *et al.*, 2019). Para evidenciar que los efectos cinéticos de las mutantes Q159A y E162A podrían relacionarse a una variación de la estabilidad, se realizó un ensayo de estabilidad al almacenamiento midiendo la actividad residual de estas dos mutantes en buffer de fosfatos 50 mM pH 6 adicionado con CaCl₂ 1 mM almacenadas a 37 °C. A partir de estos datos se determinó la vida media de la enzima.

En la tabla 7, se observa que la enzima silvestre tiene una vida media de 2 horas evaluadas a 37 °C, valor aproximado a lo reportado (72 min) en la literatura en la medición de actividad residual a 40 °C (Olvera *et al.*, 2012). El resultado más interesante que emerge de los datos es que la mutante E162A presentó un incremento en la vida media de 16 veces con respecto a la enzima silvestre. Por

otra parte, la mutante Q159A presentó una disminución significativa de aproximadamente el 50% del valor de vida media en comparación con la enzima silvestre.

Para evaluar el efecto de la mutación del residuo Q159 sobre la estructura de la enzima silvestre, se consideró una estrategia basada en las predicciones del cambio de estabilidad, utilizando los servidores AUTO-MUTE y CUPSAT, así como el algoritmo FoldX en YASARA software (Masso & Vaisman, 2010; Parthiban *et al.*, 2006; Schymkowitz *et al.*, 2005). Para el análisis con FoldX, la estructura de la proteína silvestre (PDB 1OYG) se minimizó utilizando el comando "RepairPDB". Posteriormente, se construyó el modelo con la mutación y la correspondiente energía libre de Gibbs de desplegamiento fue calculada con respecto a la enzima silvestre obteniendo el valor de $\Delta\Delta G$ (kcal mol⁻¹) ($\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{mutante}} - \Delta G_{\text{WT}}$). El análisis de AUTO-MUTE, CUPSAT y FoldX ($\Delta\Delta G_{\text{Q159A}} = 1.02$ kcal mol⁻¹) corroboran una desestabilización producto de la mutación por alanina en el residuo Q159. Analizando la estructura de SacB, la mutación del residuo Q159A afectaría una interacción por puente de hidrógeno con la cadena lateral del residuo Y179, como se observa en figura 18 A, sin afectar enlaces por puente de hidrógeno del sitio catalítico.

Tabla 5. Estabilidad (vida media) de SacB WT y mutantes

Enzima	Vida media (Horas)
SacB WT	2±0.1
SacB Q159A	1±0.1
SacB E162A	32±2

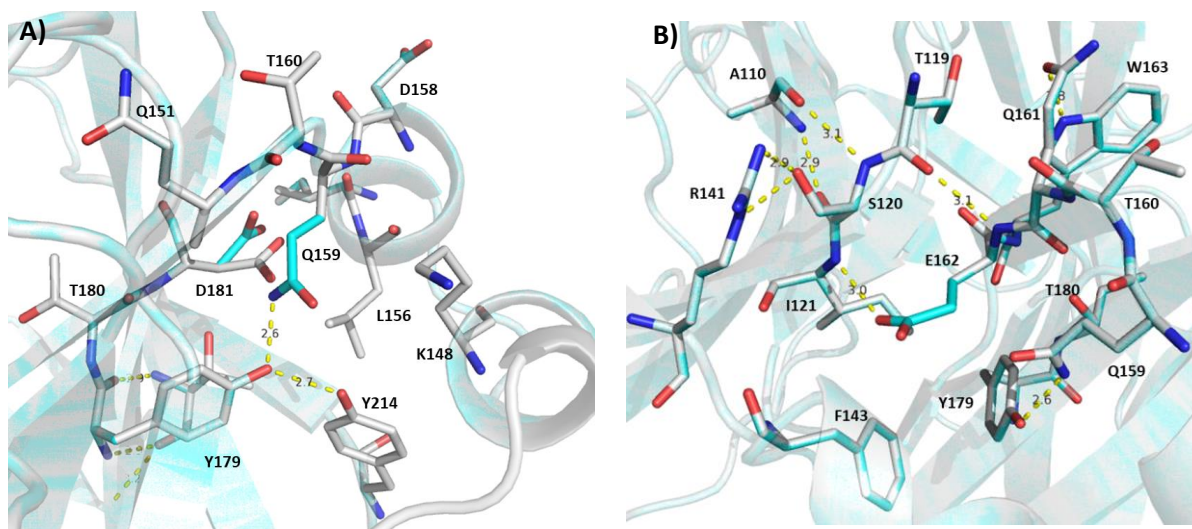


Figura 18. Interacciones de los residuos Q159 y E162. La estructura de la enzima silvestre se muestra en cian y la estructura de la mutante en gris. A) mutante Q159A, B) mutante E162A.

De acuerdo a los servidores AUTO-MUTE y CUPSAT se predice el posible incremento en la estabilidad de la mutación por alanina del residuo E162A, sin embargo como la variación en el valor del $\Delta\Delta G$ es muy baja, el algoritmo de FoldX no reconoce un cambio en la estabilidad pues el valor se encuentra dentro del margen de error ($\Delta\Delta G_{E162A} = 0.02 \text{ kcal mol}^{-1}$) (Masso & Vaisman, 2010; Parthiban *et al.*, 2006; Schymkowitz *et al.*, 2005). Con base en la estructura obtenida de la mutante SacB-E162A, se estaría afectando una interacción por puente de hidrógeno con la cadena principal del residuo I121, aunque de manera análoga a la mutante Q159A no parece afectar residuos del sitio catalítico (figura 18 B)

Las diferencias encontradas en la variación de la estabilidad de las mutantes Q159A y E162A parecen concordar con la hipótesis planteada en el apartado anterior, en el cual se apreció que la mutante Q159A parecía verse afectada en la capacidad de producción de polímero que se restablecía cuando se utilizaba las mismas unidades enzimáticas que la enzima silvestre y en donde la pérdida de actividad puede relacionarse con afectación del plegamiento y estabilidad de la enzima (Xu *et al.*, 2019). Por el contrario, la mutación en el residuo E162A tiene un comportamiento diferente que no depende de una pérdida de estabilidad y cuya afectación radica principalmente en la disminución del polímero de alto peso molecular, modulación similar a la observada en la mutante N115A en condiciones estándar de reacción.

8.6. Dinámica molecular de SacB WT en complejo con oligosacáridos.

Para evaluar el efecto del OBS2 sobre la modulación de la elongación de polímero en SacB, se decidió optar por un análisis de dinámica molecular para determinar si existía un cambio de interacciones de la cadena de levana en crecimiento con los residuos mutados del OBS2. Este estudio ha sido realizado en colaboración con la Dra. Verónica A. Jiménez de la Universidad Andrés Bello en Chile.

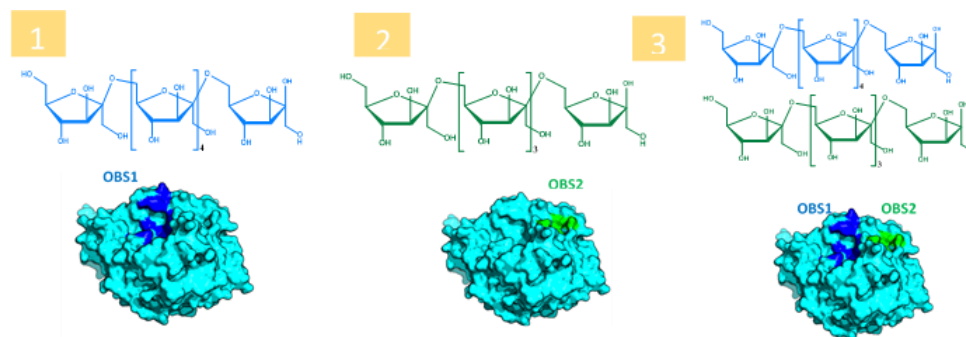


Figura 19. Dinámicas moleculares realizadas en el OBS1 y OBS2 de SacB WT

Los resultados preliminares de la dinámica molecular de 50 ns de la estructura de SacB inactiva (SacB D86A/E342A PBD 6VHQ) en complejo con el hexasacárido en el sitio OBS1 y un pentasacárido en el sitio OBS2, identificó que la cadena de levana se mantenía estable durante la trayectoria de manera individual en el sitio OBS1, OBS2 y simultáneo OBS1/OBS2 (figura 19, del 1 al 3). Lo que sugiere que estos sitios no son artefactos y la cadena de levana permanece unida a estos sitios de manera energéticamente favorable.

Estos resultados dieron pauta a la evaluación de simulaciones de DM de 300 ns en la enzima silvestre (enzima activa) de SacB en complejo con diversos tamaños de oligosacáridos tipo levana de GP 6, 12, 18, 24 y 30. En el análisis de las simulaciones se identificó que, el oligosacárido que se une en SacB WT, lo hace en dos segmentos que mantienen contactos intermoleculares distintivos con la proteína. Un primer segmento denominado como segmento de oligosacárido aceptor (no reductor) que emerge del sitio catalítico y un segundo segmento, el segmento de oligosacárido terminal (reductor) que sobresale de la cavidad catalítica y se une a un sitio lateral en la superficie de la enzima. Los segmentos de oligosacáridos aceptores se componen de los primeros seis residuos fructosilo y se involucran constantemente en contactos intermoleculares de alta frecuencia con residuos de proteínas que pertenecen a los subsitios -1, +1, +2, +3 y +4 del sitio OBS1 como se ha descrito previamente (Raga-Carbajal *et al.*, 2021). Los segmentos de oligosacáridos terminales contienen un número variable de monómeros a partir del séptimo residuo fructosilo y se involucran progresivamente en contactos intermoleculares estables con residuos que pertenecen al sitio OBS2. La evidencia obtenida

de estos estudios sugiere que, el segmento de oligosacárido aceptor (oligosacárido de GP 6) no consigue interactuar con el OBS2 pero, a partir de un oligosacárido con GP 12 se tiene una unión efectiva y se dirige, por si mismo, hacia el sitio OBS2 en donde la interacción va guiada por el canal establecido entre el residuo N115 y K185. Además, los segmentos de oligosacáridos terminales de las cadenas más grandes se pliegan, para formar agregados estables alrededor del OBS2. El análisis RMSD indicó una reducción de movilidad en el segmento aceptor a medida que la cadena del oligosacárido crece (Jiménez Verónica, por publicar) (Figura 20). Estos resultados indican que el OBS2 tiene una participación funcional durante la elongación del polímero y que depende de interacciones efectivas en el OBS2, con un impacto indirecto en el OBS1.

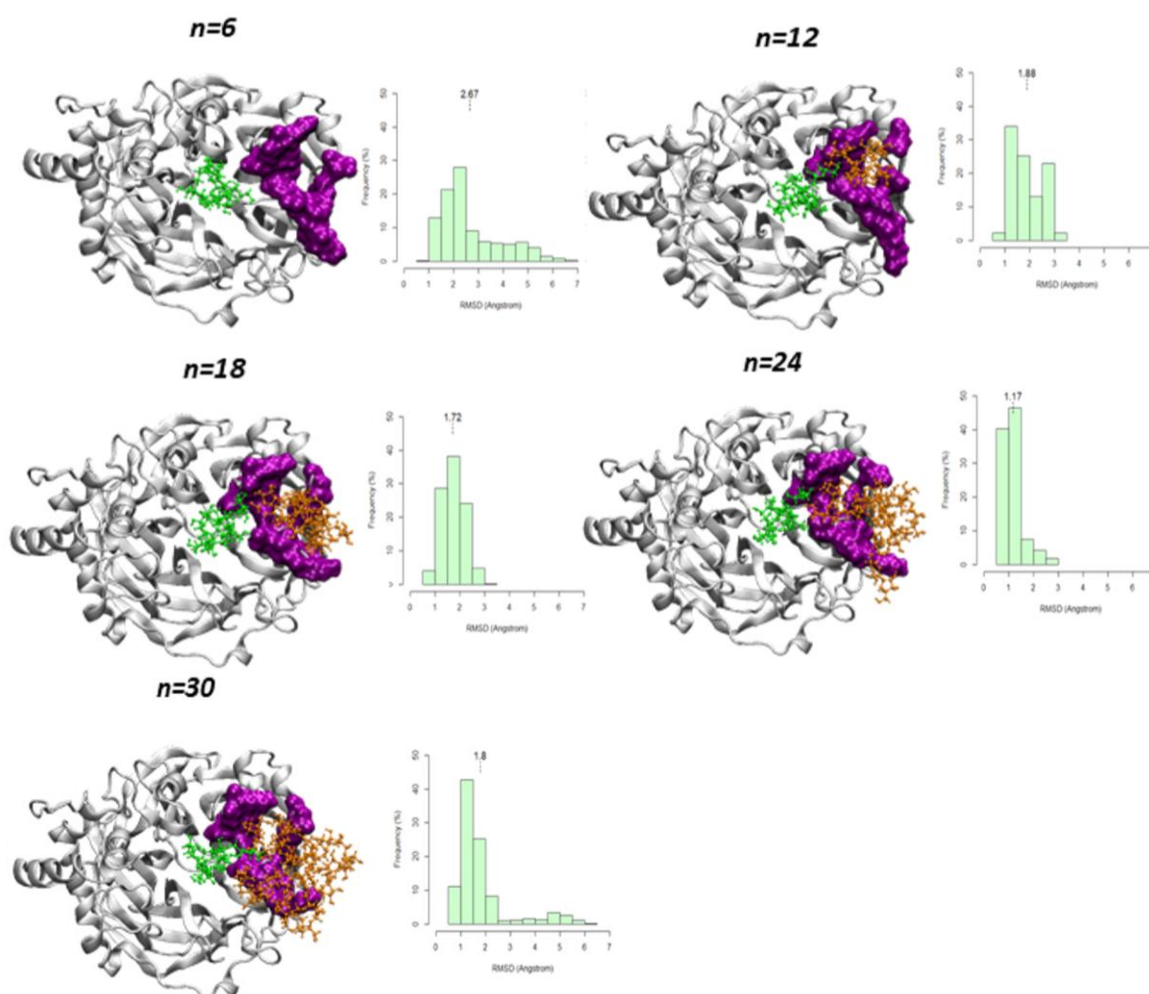


Figura 20. Interacción de la cadena de levana y RMSD de oligosacáridos de GP 6 a GP 30 en SacB WT.

En cada fructooligosacárido, el segmento aceptor y segmento terminal se representan como residuos fructosilo de color verde y naranja respectivamente. Los residuos del OBS2 se resaltan en morado (Jiménez Verónica, por publicar)

9. DISCUSIÓN

9.1. Modulación de los parámetros cinéticos por las mutantes del OBS2

Como ya se mencionó en la revisión de la literatura científica en la introducción, los OBS pueden estar implicados en la procesividad, especificidad y/o actividad de la enzima (Sven Cuyvers *et al.*, 2012). La primera pregunta que este estudio buscó contestar es si el segundo sitio de unión a oligosacárido identificado a través de la estructura cristalográfica de SacB en complejo con levanohexaosa resultaría en un sitio funcional para la enzima.

La determinación de las constantes cinéticas de los 5 residuos que conforman este OBS2, ha demostrado que únicamente, la mutación de los residuos Q159A y E162A originan un cambio en la K_m , así como una disminución de la k_{cat} y la consecuente disminución de la eficiencia catalítica. Las mutantes Q159A y E162A tienen interacción con la fructosa número 2 a través del grupo hidroxilo del C-1, lo que podría sugerir que esta interacción es importante para originar un vínculo con el aceptor o cadena de levana en crecimiento (Figura 21). La afectación en la actividad de una enzima por mutaciones puntuales relacionadas a un segundo sitio de unión a carbohidratos ha sido reportada antes en la xilanasa de *Aspergillus niger*, en donde se determinó el papel de cuatro residuos en contacto con un xilo-oligosacárido (S. Cuyvers *et al.*, 2011). En este estudio la mutante E31A que tiene el mayor número de interacciones por puente de hidrógeno con el sustrato, presentó una actividad específica menor a la enzima silvestre reportando una actividad relativa del $51 \pm 8\%$. Esto sugiere que aun cuando los residuos Q159A y E162A están lejos del sitio activo de la enzima, pueden influenciar la catálisis debido a una diferencia en la afinidad con el sustrato.

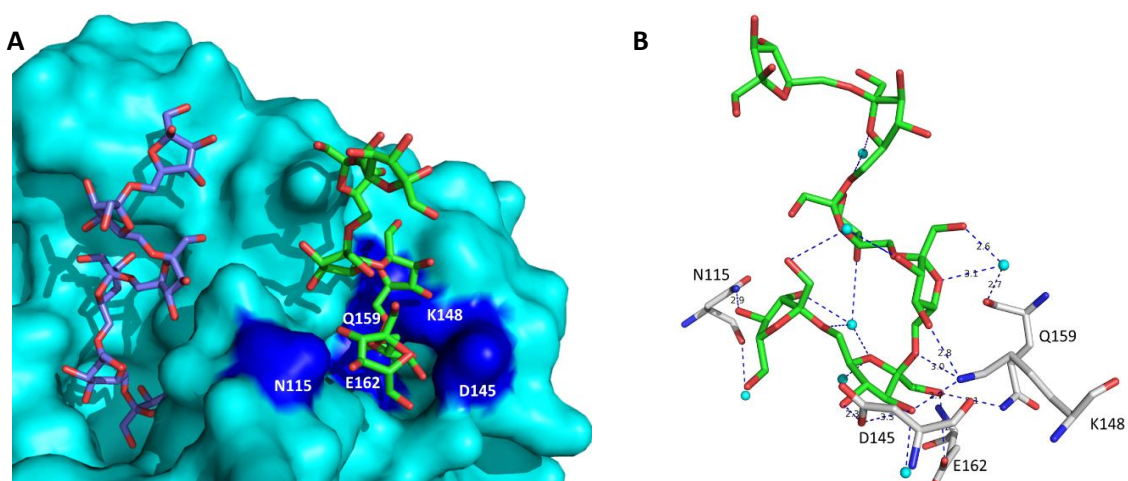


Figura 21. Residuos mutados del OBS2. A) Localización superficial. B) Interacciones de los residuos con el hexasacárido. Los puentes de hidrógeno se señalan como líneas punteadas y las moléculas de agua como esferas de color cian (Raga-Carbajal *et al.*, 2021).

Los resultados observados en la variación del valor de la K_m en este trabajo son similares a los encontrados en estudios previos donde un residuo análogo al E162A de SacB, el E117 en *Zymomonas mobilis*, el cual fue evaluado a través de una mutación por glutamina. En este trabajo la mutante E117Q presentó una k_{cat} similar a la de la enzima silvestre, pero exhibió un aumento de 4 veces en el valor de K_m y un aumento del 16% en la actividad de transfructosilación (Yanase *et al.*, 2002). El incremento en la K_m por este residuo concuerda con nuestros resultados observados para la mutante E162A, sin embargo, en este estudio también se observó una disminución en la k_{cat} de la mutante. Con base en la información observada en *Z. mobilis* y la mutante E162A de SacB se podría concluir que el residuo E162 tiene influencia sobre la afinidad por sacarosa, aumentando el valor de K_m de la enzima.

Dada la similitud estructural de las levansacarasa, cuestionamos si el papel del OBS2 sobre la catálisis podría generalizarse a otras fructosiltransferasas especialmente aquellas que cuenten con dominios adicionales que pudieran compensar la ausencia de estos sitios adicionales. El multialineamiento de algunas levansacarasa confirmó que, con excepción del residuo N115A, los residuos del OBS2 se encuentran presentes en levansacarasa del género *Bacillus*, así como en las provenientes de microorganismos gram negativos y enzimas con características multidominio (figura 22, Anexo I). Asimismo, en un análisis de conservación de residuos de la familia GH68 (Anexo J), se identificaron los motivos altamente conservados en referencia a SacB. Meng y Fütterer en el 2003, definieron que los motivos VWD, EWSG, RDP, DEIER y TYS, se encontraban altamente conservados en la familia 68 de las enzimas glicosil hidrolasas. Además, identificaron que los motivos EWSG y RDP también están presentes en las enzimas de la familia GH32. Este último aspecto, es de especial interés debido a que el motivo EWSG en SacB contiene el residuo E162, el cual como ya lo vimos anteriormente, esta involucrado en la actividad de la enzima. Al encontrarse el residuo E162 en un motivo altamente conservado en las levansacarasa, no es de extrañarse que éste pudiera tener un rol funcional importante en la catálisis, sin embargo, este estudio se encuentra limitado por falta de información experimental sobre residuos homólogos del OBS2 en otras levansacarasa.

Por lo cual decidimos ampliar la zona de comparación de residuos homólogos de la enzima con otras enzimas glicosilhidrolasas, en donde observamos que, el residuo E162 se encuentra muy cercano a una región denominada como "caja de sacarosa" (figura 23) identificada a partir de un dominio conformado por 20 aminoácidos (WSGSATVNSDGSIQLYYTKN en *S. salivarius*) de la fructosiltransferasa de *Streptococcus salivarius* y cuya secuencia se encuentra conservada en enzimas que transfieren fructosa a partir de sacarosa incluidas aquellas con actividad invertasa (*S. mutans* ScrB y *B. subtilis* SacA), fructosiltransferasa (*S. mutans* ftf) y la levansacarasa de SacB (Rathsam *et al.*, 1993; Sato & Kuramitsu, 1988; Song & Jacques, 1999).

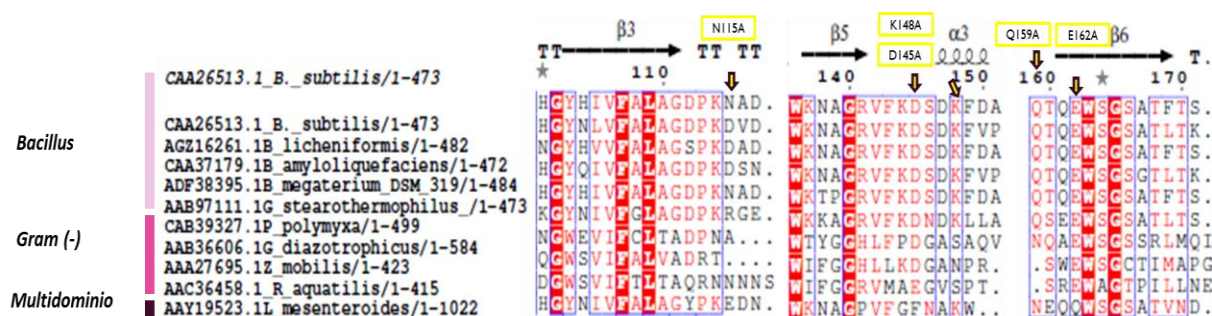


Figura 22. Secciones del multilineamiento de secuencias de levansacarosas que contienen los residuos equivalentes pertenecientes al OBS2. Los residuos mutados del OBS2 se señalan con flechas amarillas. Las hélices α y las láminas β están representados por bobinas y flechas respectivamente. Los residuos conservados se resaltan en cuadros rojos. Los alineamientos se realizaron utilizando el programa ClustalW y la figura fue generada utilizando ESPrict 2.2

En la levansacarasa de SacB, el residuo S164 perteneciente a la caja de sacarosa forma parte del subsitio -1 estableciendo contactos con el nucleófilo D86 y con el grupo 4-OH del residuo fructosil donante (sacarosa) a través de enlaces de hidrógeno. Su mutación por alanina origina una enzima con una k_{cat} y K_m disminuida, menos hidrolítica que la LS WT, y susceptible a la activación del producto, un efecto que hace que la enzima sea más eficiente para la transfructosilación con una mejor síntesis de polímero de peso molecular medio (17.2 kDa) y alto, y un cambio en la especificidad de la reacción (k_{cat}^H / k_{cat}^T de 0.5 contra 2.1 con y sin aceptor respectivamente) cuando se evalúa con un aceptor de levana de 7.6 kDa. Además, la mutación origina una mejor afinidad por la glucosa incrementando el rendimiento de blastooligosacáridos (GP de 2 a 10) (Ortiz-Soto *et al.*, 2008, 2020).

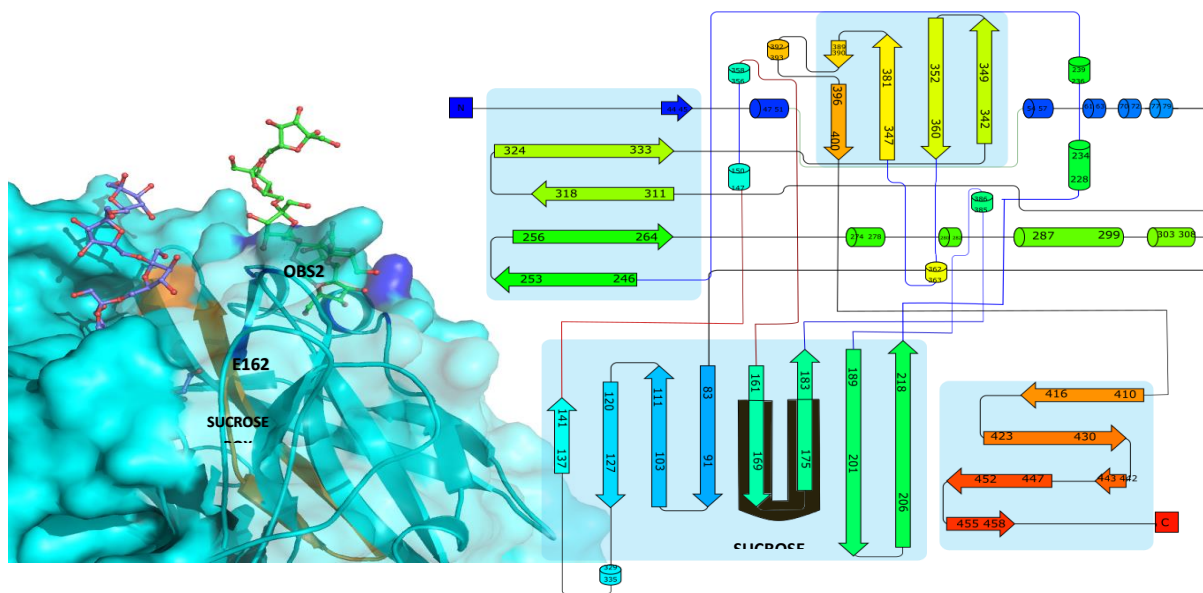


Figura 23. Representación de la estructura cristalográfica y mapa de la estructura secundaria de SacB (PDB 1OYG). La sección del motivo conservado denominado como “caja de sacarosa” se remarca en naranja. Los motivos estructurales fueron determinados utilizando el servidor Pro Origami (Stivala *et al.*, 2011).

En enzimas de la familia GH32, los residuos presentes en esta región también han sido objeto de estudio, en donde se ha propuesto que tienen un papel importante en la unión, inhibición por sustrato y determinación del reconocimiento de aceptor,o en la estabilidad de la enzima (Lammens *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2007; Song & Jacques, 1999).

La información anterior sugiere que, la aproximación del residuo E162 en la caja de sacarosa podría originar cambios en estabilidad y una susceptibilidad a la activación por producto (levana). Esta susceptibilidad de activación por la levana pudo originar una mayor actividad transferasa y el aumento en la síntesis de levan A observado en condiciones estándar de reacción.

9.2. Análisis de la función de los residuos del OBS2 sobre el mecanismo de elongación de la LS SacB WT

Aunque las mutantes del OBS2 tuvieron un comportamiento variado en las tres condiciones de reacción, estas diferencias pueden explicarse en parte por la distancia en la que se ubican los residuos, su interacción oportuna con la cadena de levana en crecimiento y la influencia en la estabilidad de la enzima por parte del residuo. Este último aspecto se evidenció para la mutante Q159A en la cual, la discrepancia obtenida entre el perfil de productos y el de la enzima silvestre podría explicarse por la disminución en la vida media de la enzima y una afectación en la estabilidad de la mutante. El cambio de estabilidad podría originar un cambio en la actividad específica, y un efecto que simularía una menor cantidad de “enzima activa” y como consecuencia una mayor concentración de levan A, aun utilizando la misma concentración de proteína que la enzima silvestre. Esta hipótesis se sustenta en el hecho de que los resultados de la evaluación de la síntesis de levana con las mismas unidades enzimáticas que la enzima silvestre equiparaban el perfil y concentración de polímero. Sin embargo, se destaca que, aun cuando se obtiene el mismo perfil existe una variación en el tiempo en donde la mutante Q159A requiere más del doble de tiempo para equiparar la producción de la enzima silvestre, criterio relacionado con el aumento del doble en el valor de K_m presentado en esta mutante y que podría implicar una coordinación deficiente de la sacarosa reduciendo la polimerización al comienzo del proceso de elongación (Raga-Carbajal *et al.*, 2021).

Un hallazgo importante en este trabajo fue que al menos dos mutaciones en ciertas zonas del sitio OBS2 originaron cambios constantes en el perfil de producción de polímero de la LS SacB. La mutante E162A fue una de las que presentó variación en las 3 condiciones de reacción analizadas. Sorprendentemente, la mutante E162A incrementó la vida media de la enzima en 16 veces, por lo cual, el cambio en las constantes cinéticas y el perfil de polímero de la mutante E162A no se debió a la disminución de la estabilidad.

Estudios previos realizados en la levansacarasa de SacB han reportado un incremento similar en la estabilidad originada por el cambio de una serina por una alanina (S164A) en el motivo β -hairpin que comparte con la mutante E162A, el motivo denominado como “caja de sacarosa” mencionada en los apartados anteriores. En este estudio, el aumento en 12 veces de la vida media evaluada a 40°C se atribuye a una disminución en la desestabilización originada por residuos voluminosos que se localizan en las cavidades de las proteínas y que se mejora a medida que se sustituye por residuos más hidrófobos como leucina ó alanina, como es el caso de la mutante S162A o la mutante E162A evaluada en este trabajo (Figura 24) (Ortiz-Soto *et al.*, 2008).

En este contexto la hidrofobicidad de la proteína podría haberse incrementado en gran medida y ayudado a un plegamiento más estable a través de una mayor estabilidad estructural entre dos β -hairpins, como previamente se ha reportado en motivos similares de otras levansacarosas (Xu *et al.*, 2019). Además, la mutación origina un cambio en la carga y tamaño del residuo que pudo contribuir a una mayor estabilidad. A diferencia del residuo E162, la mutación del residuo Q159 en SacB tendría una afectación diferente en la enzima debido a que se localiza en un loop que une el β -hairpin con el inicio de una hélice alfa, lo cual pudo influir en la variación de la estabilidad por estas dos mutantes (Figura 24).

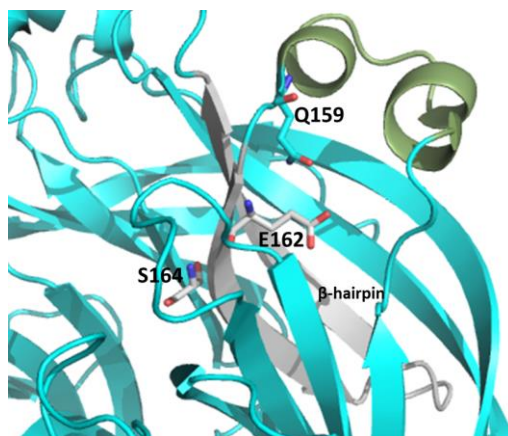


Figura 24. Modelo en *cartoon* de SacB WT. El β -hairpin formado por los residuos del Q161-S182 se representa con gris mientras que era la conexión con las hélices α en verde.

Considerando en conjunto los resultados en la reducción de la polimerización por la mutante E162A a bajas y altas concentraciones de enzima, estos indican que existe un efecto por el residuo E162 en el mecanismo de elongación de la levansacarasa de SacB. Un hallazgo inesperado fue que esta mutante incrementó significativamente la producción de levan A en condiciones estándar de reacción, pero a mayores tiempos de reacción. Esta diferencia puede explicarse en parte por el efecto en la especificidad de reacción en estas condiciones, en donde se favoreció la transferencia en contraste con la enzima silvestre.

Este resultado es consistente con el que se encontró en *Z. mobilis* donde la mutante E117Q incrementó la síntesis de polímero de alto peso molecular (Yanase *et al.*, 2002). Sin embargo, hasta el momento no hay explicación para justificar el impacto en este residuo aspártico y el incremento de la mutante E117Q en la producción de polímero en la levansacarasa de *Z. mobilis*. Interesantemente, la mutante E117Q *Z. mobilis* también demostró una disminución en la especificidad de sustrato hacia rafinosa y estaquiosa obteniendo una actividad relativa de 74% y 94% respectivamente, aun cuando el residuo se encuentra lejos del sitio catalítico, sugiriendo que podría estar implicado en un reconocimiento distinto del aceptor (Yanase *et al.*, 2002). Los resultados de la cinética de producción observados en las mutantes Q159A y E162A, identifican una fase de retardo en la producción de polímero en estas mutantes que podría estar relacionado con un cambio en la afinidad a ciertos aceptores. Este efecto puede ser originado por el cambio de interacciones del OBS2 con el aceptor, y en el cual, la acumulación de FOS con GP crítico se presentaría entre las 36 y 48 horas en condiciones estándar de reacción donde se aprecia un incremento mayor de levan A que se mantiene hasta las 72 horas en conjunto con la disminución de levan B, sugiriendo que este polímero o los productos de su hidrólisis funcionaron como aceptores eficientes para la síntesis de levan A (Amos *et al.*, 2018). Recientemente, se planteó un modelo de dos fases para la biosíntesis no procesiva de los polisacáridos de homogalacturonano por el complejo GAUT1:GAUT7 donde se propone que los aceptores se elonguen a través de un mecanismo distributivo que depende de las diferencias en la eficiencia catalítica y la preferencia del aceptor en función de la longitud de la cadena. Bajo este modelo, se aprecia la acumulación de aceptores de cadena corta ineficientes en una fase lenta y el alargamiento rápido cuando el aceptor alcanza un GP crítico en donde la actividad transferasa es máxima. Bajo este contexto, se podría sugerir que los efectos potenciales de la mutación del residuo E162 en el OBS2 podrían estar más relacionados a un reconocimiento óptimo del aceptor a elongar.

Por otra parte, los resultados obtenidos de la evaluación del residuo N115 soportan la hipótesis de la influencia del OBS2 sobre el mecanismo de elongación y principalmente sobre el mecanismo procesivo. Este efecto fue observado por la disminución de la síntesis del polímero de alto peso molecular y la consecuente presencia de productos de menor tamaño cuando se evaluó con baja concentración de enzima. La disminución de polímero de alto peso molecular por la mutación en el residuo N115 incluso pudo ser observado en condiciones estándar de reacción, es posible que estos resultados se deban a que el residuo N115 se encuentra al inicio de un canal que conecta el sitio OBS1 con el sitio OBS2 y por consiguiente sea uno de los residuos determinantes para modular la elongación de la cadena de levana en crecimiento (Figura 25). Atendiendo a la bibliografía existente, se sabe que el residuo D117 que forma parte de este canal y del subsitio +3 del OBS1, puede estar implicado en un reconocimiento adecuado de las moléculas aceptoras de mayor tamaño a la sacarosa, debido a que su mutación por alanina afecta la velocidad catalítica y la procesividad de la enzima

originando un polímero de bajo peso molecular con tamaño menor que la enzima silvestre (3.3 kDa) (Raga-Carbajal *et al.*, 2021).

Sin embargo, resulta peculiar que siendo el residuo N115 importante en la modulación del mecanismo de SacB, no se encuentre conservado en las levansacarosas de la GH68. Resultados de estudios anteriores sobre un análisis de las interacciones enzima activas a carbohidrato de la familia 60 de las glicosiltransferasas han indicado que, el ochenta por ciento de los residuos que frecuentemente interactúan con los azúcares en el sitio de unión de estas enzimas son aminoácidos polares y cargados, justamente entre los más frecuentes se encuentran el ácido glutámico (14%), asparagina (11%), glutamina (8%). Es interesante que los residuos que mostraron un papel funcional identificados del OBS2 de la LS SacB son de estos tres tipo de residuos (Charoenwongpaiboon *et al.*, 2019).

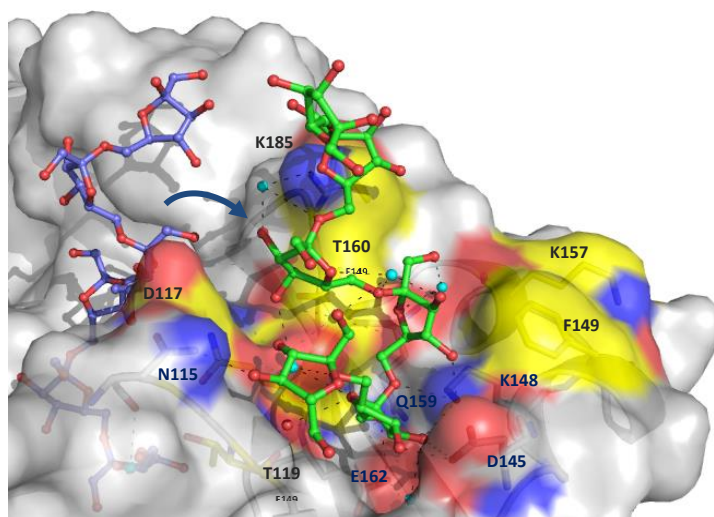


Figura 25. Interacciones enzima-ligando presentes en el canal hacia el OBS2. Los residuos mutados por alanina se muestran en azul, los residuos propuestos para futuros análisis en base a la imagen obtenida de Ligplot+ se muestran en amarillo.

Comparando las estructuras cristalográficas disponibles de las levansacarosas se puede observar una tendencia sobre los productos sintetizados y la presencia de los sitios OBS1, OBS2 y del canal en estas enzimas. La LS de la bacteria gram positiva *Bacillus megaterium* sintetiza polímero de peso molecular intermedio (1.6 kDa) (Ortiz-Soto *et al.*, 2018). En el análisis realizado por (Raga-Carbajal *et al.*, 2021) se encontró que esta enzima tiene una topología capaz de unir la molécula de levanhexaosa a través de los mismos subsitios de unión de SacB del OBS1. Además, en esta enzima podemos observar la presencia del canal que permitiría la elongación y existencia del OBS2 en una zona análoga estudiada en el presente trabajo (Figura 26, A).

En contraste, un mecanismo distributivo (no procesivo) es observado en las LS de bacterias gram negativas como *Erwinia amylovora*, *Erwinia tasmaniensis* y *Gluconacetobacter diazotrophicus*; las dos primeras producen FOS con un GP 22, mientras que *G. diazotrophicus* sintetiza productos hasta GP 4 (Martínez-Fleites *et al.*, 2005; Polsinelli *et al.*, 2019). En estas enzimas, la estructura impide la existencia del OBS1 por una protuberancia (*G. diazotrophicus*) o un valle (*Erwinia*) en subsitios superiores al +3 del OBS1, además la topología en estas enzimas impide la existencia del OBS2 en una zona análoga a SacB (*E. amylovora* y *E. tasmaniensis*) ó se observa el canal bloqueado (*G. diazotrophicus*) (Raga-Carbajal *et al.*, 2021) (Figura 26, B). Esto sugiere que la existencia de ambos subsitios (OBS1 y OBS2) y la presencia del canal podría influir en la interacción de una cadena aceptora en las levansacarosas gram positivas de manera que exista una catálisis eficiente hacia la síntesis de productos de mayor peso molecular.

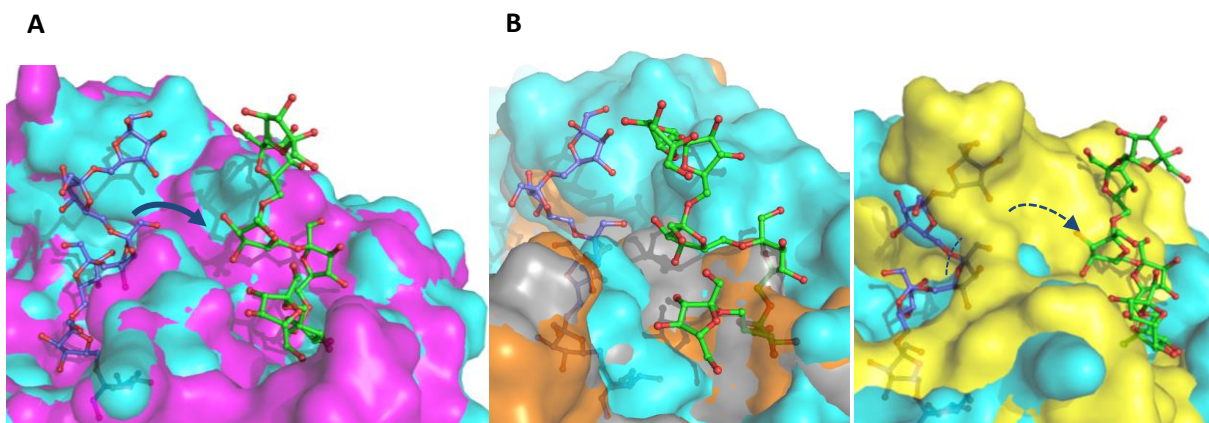


Figura 26. Estructuras cristalográficas superpuestas de levansacarosas GH 68. LS SacB (PDB 6VHQ) en cian. A) Levansacarasa de *Bacillus megaterium* (PDB 3OM2) en magenta B) Levansacarosas de LsC *Erwinia amylovora* (PDB 4D47) en naranja, LsC *Erwinia tasmaniensis* (PDB 6RV5) en gris y LdsA *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PDB 1W18) en amarillo.

9.3. Evaluación del OBS2 por dinámica molecular

Los datos preliminares obtenidos de la dinámica molecular parecen apoyar la hipótesis de que debe existir un GP crítico que permita la elongación hacia el polímero de alto peso molecular, y que las interacciones con el OBS2 dependerá del tamaño de la cadena de levana tal como se ha reportado previamente en la Xilanasa de *Bacillus circulans* (*BcX*) de donde se requería que sustratos insolubles se unieran cooperativamente en ambos sitios (sitio activo y segundo sitio de unión) para mejorar significativamente la actividad catalítica de *BcX* hacia el xilano polimérico a través de una mejor unión al sustrato (Ludwiczek *et al.*, 2007).

Además, el anclaje de la levana alrededor del OBS2 y la consecuente reducción de la movilidad podría resultar en un mejor posicionamiento del segmento aceptor para lograr la posterior transferencia del residuo fructosilo proveniente de la sacarosa durante la catálisis. De esta manera, la unión efectiva de la levana con el OBS2 activaría el mecanismo procesivo de manera análoga a como se propone la funcionalidad de algunos sitios de unión a glucano (Figura 27), de los cuales se conocen que pueden actuar como mediadores del cambio entre el mecanismo de elongación procesivo y no procesivo en la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F (Moulis *et al.*, 2006).

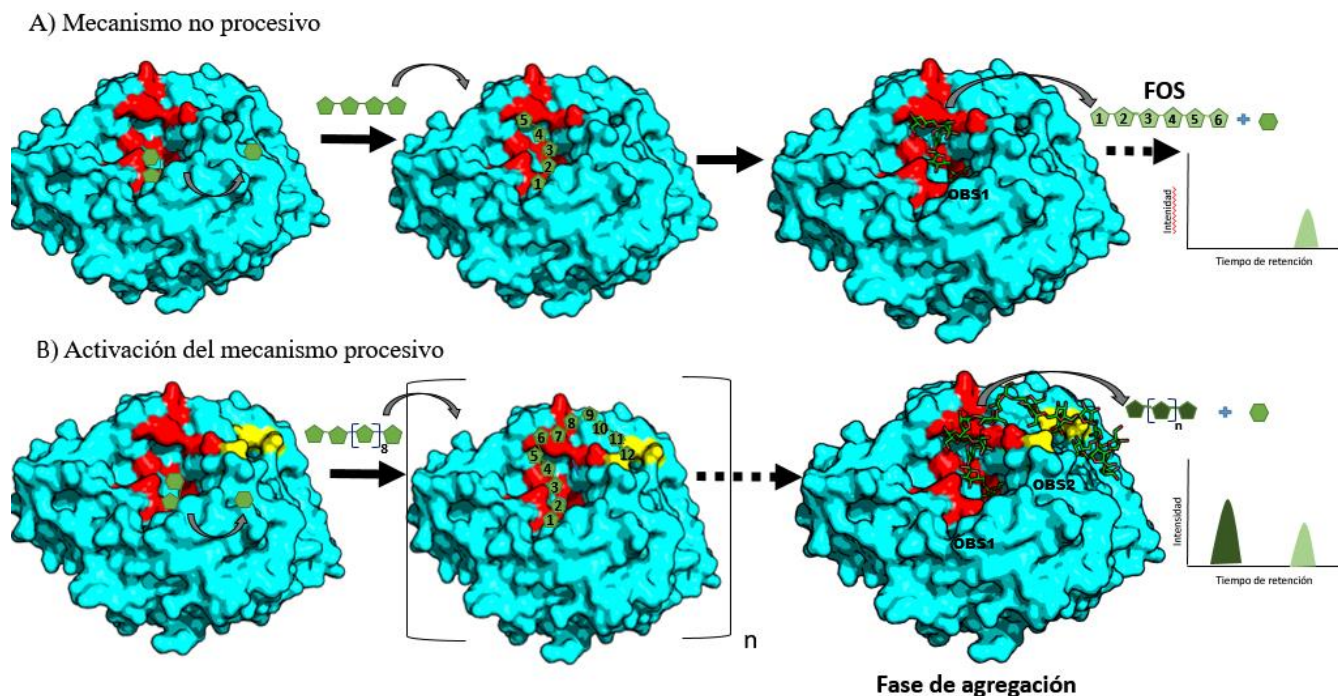


Figura 27. Representación esquemática del modelo propuesto para el mecanismo bimodal en SacB. A) mecanismo no procesivo: la elongación no procesiva en SacB está determinada por la unión de los residuos fructosilo del aceptor (numerados del 2 al 5 en la imagen central) a lo largo de los subsitios del OBS1. Los aceptores de cadena corta GP<12 se elongan de manera ineficaz y no pueden extenderse hacia el canal para llenar los subsitios del OBS2, por lo cual únicamente se presenta el inicio de nuevas cadenas de fructooligosacáridos y la elongación de aceptores de cadena corta hacia polímero de bajo peso molecular. B) fase de activación del mecanismo procesivo: la elongación de aceptores de levana con longitudes de cadena más largas que el GP crítico, estimado en GP12, permite dirigir la cadena de levana hacia el sitio OBS2 activando la síntesis de polímero de alto peso molecular. Después de varias transferencias de residuos de fructosilo, la levana se ancla alrededor del OBS2, manteniendo una alta concentración de aceptores eficientes cerca del sitio catalítico y favoreciendo la actividad transferasa a través de mejores interacciones en los subsitios del OBS1

Estos resultados preliminares pueden ser relevantes para una futura exploración experimental de afinidad de aceptores en los residuos del canal y del OBS2

Tras revisar la evidencia científica disponible hasta la fecha, no se han encontrado datos sobre el proceso que rige el mecanismo procesivo de SacB. Este problema no es inmediatamente obvio por qué la modulación del perfil de polímero debido a la concentración enzimática complica la

dilucidación de un mecanismo detallado ya que, se propone que podría existir un efecto de robo de aceptores en reacciones de alta concentración de proteína, en donde las moléculas de enzima pueden dificultar el alargamiento procesivo, robando el aceptor de la enzima y liberándolo en la reacción, el cual puede ser anclado nuevamente al sitio catalítico para una nueva transferencia por un mecanismo no procesivo originando la síntesis de polímero de hasta 7.2 kDa (Raga-Carbajal *et al.*, 2016).

La generalización de la investigación publicada acerca de los segundos sitios de unión a oligosacáridos se enfoca a su participación en la afinidad de sustratos o a una regulación alostérica en enzimas multidominio. Recientemente, se ha publicado una considerable cantidad de evidencia sobre la participación de los OBS sobre el mecanismo de polimerización de carbohidratos. Estos estudios se basan en la identificación de sitios de unión a oligosacáridos en glucansacarasa de la familia GH70. En la alternansacarasa (ASR) de *Leuconostoc citreum* NRRL B-13 el hallazgo de un sitio de unión a oligosacáridos en la superficie del dominio A (OBS-A1), distante del sitio catalítico permitió dilucidar parte del proceso por el cual se sintetiza el polímero de alto peso molecular. La mutación por alanina de dos residuos el sitio OBS-A1 (Gln-700 y Tyr-717), disminuyó el rendimiento de polímero de alternana de alto peso molecular en un tercio, sin afectar significativamente la estabilidad de la enzima o su especificidad. De esta manera, el sitio OBS-A1 parece ser exclusivo de la alternansancarasa debido a su especificidad para unir estructuras tipo alternanas y actúa como mediador entre el sitio catalítico y los sitios de unión de carbohidratos del dominio V originando la elongación de cadenas alternanas (Molina *et al.*, 2020).

La relevancia de los OBS en modulación de síntesis de polímero de alto peso molecular está claramente apoyada por los resultados actuales. Sin embargo, se requiere profundizar en las interacciones que se generan por residuos aledaños al canal en SacB, así como si existe un efecto que origina un cambio en la afinidad de la cadena de levana con el residuo N115 y E162.

10. CONCLUSIÓN

El presente estudio demostró que el OBS2 en la levansacarasa de SacB, es un elemento estructural funcionalmente relevante de la enzima. Los efectos más importantes fueron observados tras la sustitución de los residuos E162 y Q159 por Ala y que implican que el OBS2 es de importancia para un reconocimiento óptimo del sustrato en las primeras etapas de la catálisis, coincidiendo con hallazgos similares reportados por otros autores en LS. Sin embargo, el resultado en el residuo de glutamina debe ser interpretado con cautela debido al cambio en la estabilidad de la enzima.

El OBS2 no tuvo gran impacto en la especificidad de reacción en la mayoría de los residuos. Sin embargo, el aumento en la transferencia por los residuos E162 y Q159 favoreció significativamente la síntesis de levan A en condiciones estándar de reacción. Un efecto similar fue observado en los residuos N115 y K148 en altas concentraciones de enzima.

Los cambios en el factor de selectividad del producto de las mutantes del OBS2 reflejaron un cambio principalmente hacia la síntesis de levan A. El residuo N115, especialmente, pareció desempeñar un papel relevante en la funcionalidad del OBS2 sobre la procesividad de la enzima debido a que presentó una disminución del polímero de alto peso molecular en condiciones estándar de reacción y bajas concentraciones de enzima.

Un análisis preliminar de la dinámica molecular de SacB WT/oligosacáridos sugiere que existe una relación entre el GP y la interacción de la cadena en crecimiento con el OBS2 por lo cual, el efecto observado experimentalmente, en las mutaciones de residuos de este sitio pueden deberse a variaciones con el reconocimiento de un aceptor durante la elongación del polímero.

La catálisis en SacB podría realizarse a través de un proceso que incluye un mecanismo no procesivo seguido de la activación del mecanismo procesivo mediado por la interacción con el OBS2. Proponemos que la enzima realiza un primer mecanismo no procesivo, regido por los subsitios del sitio OBS1 en donde se producen principalmente oligosacáridos y polímero de bajo peso molecular, hasta que el crecimiento de la cadena después de varios ciclos de transfructosilación genera una diferencia en la preferencia del aceptor en función de la longitud de la cadena, que origina una concentración significativa de un GP crítico que permite a la cadena en crecimiento guiarse de manera efectiva hacia el sitio OBS2 a través de un canal determinado por los residuos K185 y N115. Esta interacción permite el anclaje de la levana alrededor del sitio OBS2, originando una reducción en la movilidad y un mejor posicionamiento del segmento aceptor en el sitio OBS1. Además, el anclaje en el OBS2 mantendría muy cerca de la enzima la cadena a elongar favoreciendo la actividad transferasa y guiaría la actividad hacia síntesis de polímero de alto peso molecular de manera procesiva hasta que se alcance un tamaño crítico que provoque su liberación al medio de reacción.

11. PERSPECTIVAS

El estudio actual sólo ha examinado los residuos identificados con interacción directa con el hexasacárido observado por cristalografía. Sin embargo, debido a la relevancia reportada por estudios recientes sobre la topología, la funcionalidad del sitio OBS1 y complementado con lo descubierto en los ensayos experimentales e *in silico* en este trabajo, se pueden considerar como punto de partida para investigación adicional sobre la vinculación de estos dos sitios y la participación de residuos adicionales en la catálisis. Se recomienda que estudios futuros aborden las interacciones de los residuos que forman parte de la entrada del canal que une el sitio OBS1 con el sitio OBS2. Después, profundizar sobre el efecto del GP crítico por medio de dinámica molecular, asimismo, evaluar el cambio de afinidad por parte de aceptores de diversos tamaños sobre las mutantes N115A y E162A del sitio OBS2.

12. ANEXOS

- A. Oligonucleótidos totalmente sobrelapados. Secuencia 5'->3'
- B. Metodología de la simulación por dinámica molecular
- C. Secuenciación de DNA de SacB WT y las mutantes
- D. Purificación de SacB y mutantes
- E. Relación hidrólisis / transferencia.
- F. Cinética de reacción 0.1 μ M SacB y mutantes
- G. Curvas de progreso de reacción con 0.01 μ M y 1 μ M de enzima.
- H. Cinética de reacción de mutantes Q159A y E162A con 1 U/mL
- I. Multialineamiento de levansacarosas
- J. Motivo conservados de la familia GH68

A. Oligonucleótidos totalmente sobrelapados. Secuencia 5'->3'

Oligonucleótido	Secuencia de DNA
N115A Fw	TTA GCC GGA GAT CCT AAA GCG GCG GAT GAC ACA TCG ATT
N115A Rv	AAT CGA TGT GTC ATC CGC CGC TTT AGG ATC TCC GGC TAA
K148A Fw	C TTT AAA GAC AGC GAC GCG TTC GAT GCA AAT GAT TC
K148A Rv	GA ATC ATT TGC ATC GAA CGC GTC GCT GTC TTT AAA G
D145A Fw	CT GGC CGC GTC TTT AAA GCG AGC GAC AAA TTC GAT GC
D145A Rv	GC ATC GAA TTT GTC GCT CGC TTT AAA GAC GCG GCC AG
Q159A Fw	GAT TCT ATC CTA AAA GAC GCG ACA CAA GAA TGG TCA GGT
Q159A Rv	ACC TGA CCA TTC TTG TGT CGC GTC TTT TAG GAT AGA ATC

B. Metodología de la simulación por dinámica molecular (DM).

A continuación, se detalla el procedimiento seguido en colaboración con la Dra. Verónica A. Jiménez de la Universidad Andrés Bello en Chile. Las coordenadas iniciales de proteínas y oligosacáridos se recuperaron del modelo cristalográfico SacB(D86A/E342A)-kestolevanohexaosa (PDB 6VHQ). La secuencia de la proteína se modificó para recuperar la estructura de la forma activa (SacB WT) de la enzima, mediante la mutación de los residuos A86D y A342E utilizando el software Chimera. Los estados de protonación de todos los residuos ionizables en cada modelo se establecieron a pH 6.5 utilizando el servidor web H⁺⁺(Anandakrishnan *et al.*, 2012; Gordon *et al.*, 2005). El archivo PDB

que contiene las coordenadas de oligosacáridos se editó manualmente para mantener la coherencia con el campo de fuerza GLYCAM_06j-1 (Kirschner *et al.*, 2008). Los residuos se reordenaron de modo que el primer residuo de D-fructosa se encuentre fuera de la cavidad catalítica y la sexta unidad esté en la región más interna del sitio catalítico. Los nombres de los residuos (6CU, 0CU) se eligieron para explicar correctamente la formación de enlaces glicosídicos β -2,6 dentro de la cadena de oligosacáridos. El primer residuo se unió con grupo hidroxilo terminal en C2 (ROH). Este oligosacárido de tipo levana de GP 6 se utilizó como estructura original para construir secuencias de oligosacáridos con un número creciente de unidades de D-fructosa (GP 12, 18, 24 y 30) y enlaces glicosídicos β -2,6 utilizando el software LEAP (versión AMBER 16). Las cadenas de oligosacáridos con 12, 18, 24 y 30 unidades se minimizaron (5000 pasos de descenso más pronunciados seguidos de 5000 pasos de minimización de gradiente conjugado) en una caja de agua con restricciones posicionales (constante de fuerza de $10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$) aplicadas a los átomos correspondientes a la secuencia principal de seis miembros. Las coordenadas de oligosacáridos minimizados se alinearon luego de modo que sus secuencias parentales comunes (seis unidades de D-fructosa) se superpusieran a la conformación unida del oligosacárido que se encuentra en el modelo cristalográfico. Estas coordenadas alineadas se utilizaron para construir la topología y los archivos de coordenadas para la serie de complejos de proteína-oligosacárido con la proteína silvestre usando el software LEAP y los campos de fuerza ff14SB y GLYCAM_06j -1 para la estructura de las proteínas y los oligosacáridos, respectivamente. Los sistemas se neutralizaron agregando el número adecuado de contraiones, en este caso Cl⁻ para lograr la neutralidad eléctrica y se solvataron en una caja de agua TIP3P cúbica extendida a 10 \AA de los átomos externos del sistema.

Las simulaciones de DM se llevaron a cabo utilizando el programa pmemd.CUDA bajo la implementación de GPU del software AMBER 16. El protocolo de simulación DM consistió en: (a) 1500 pasos de minimización del descenso más pronunciado seguidos de 3500 pasos de minimización del gradiente conjugado para la relajación de las moléculas de agua, (b) 1500 pasos de minimización del descenso más pronunciado seguidos de 3500 pasos de minimización del gradiente conjugado para la minimización de oligosacáridos con restricciones posicionales aplicadas a la proteína, (b) 1500 ps de descenso más pronunciado y 6500 pasos de minimización de gradiente conjugado para todo el sistema, (c) 500 ps de calentamiento NVT progresivo de 0 a 300 K (d) 500 ps de equilibrio NVT a 300 K con restricciones aplicadas a átomos pesados, (e) 20 ns de equilibrio de NPT a 300 K, y (f) 300 ns de dinámica de producción de NPT sin restricciones a 300 K y 1 bar de los que se recopilaron los datos de producción. El análisis de trayectoria se llevó a cabo utilizando el software CPPTRAJ y VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

C. Secuenciación de DNA de SacB WT y las mutantes.

SacB WT

wggggattgtgagcggataacaattcccctctagaaataatthttggttaactttaagaa
 X G I V S G - Q F P S R N N F V - L - E
 ggagatatacatatgaaagaaacgaacccaaagccatataaggaaacatacggcatttcc
 G D I H M K E T N Q K P Y K E T Y G I S
 catattacacgccatgatatgctgcaaatccctgaacagcaaaaaaatgaaaaatatcaa
 H I T R H D M L Q I P E Q Q K N E K Y Q
 gttcctgaattcgattcgccacaattaaaaatatctcttctgcaaaaggcctggacggt
 V P E F D S S T I K N I S S A K G L D V
 tgggacagctggccattacaaaacgctgacggcactgtcgaaactatcacggctaccac
 W D S W P L Q N A D G T V A N Y H G Y H
 atcgtctttgcattagccggagatcctaaa^{aat}g^{cg}gatgacacatcgatttacatggtc
 I V F A L A G D P K ^N A D D T S I Y M F
 tatcaaaaagtccggcaaaacttctattgacagctggaaaaacgctggccgctctttaa
 Y Q K V G E T S I D S W K N A G R V F K
^{gac}agcga^{aaa}attcgatgcaaatgattctatcctaaaagac^{caa}acaca^{gaa}tggtca
^D S D ^K F D A N D S I L K D ^Q T Q ^E W S
 ggttcagccacatttacatctgacggaaaaatccgtttattctacactgatttctccggt
 G S A T F T S D G K I R L F Y T D F S G
 aaacattacggcaaacaaactgacaactgcacaagttaacgtatcagcatcagacagc
 K H Y G K Q T L T T A Q V N V S A S D S
 tctttgaacatcaacggtgtagaggattataaatcaatctttgacggtgacggaaaaacg
 S L N I N G V E D Y K S I F D G D G K T
 tatcaaatgtacagcagttcatcgatgaaggcaactacagctcaggcgacaaccatagc
 Y Q N V Q Q F I D E G N Y S S G D N H T
 ctgagagatcctcactacgtagaagataaaggccacaaataacttagtatttgaagcaaac
 L R D P H Y V E D K G H K Y L V F E A N
 actggaactgaagatggctaccaaggcgaagaatctttatttaacaaagcatactatggc
 T G T E D G Y Q G E E S L F N K A Y Y G
 aaaagcacatcattctccgctcaagaaagtcaaaaacttctgcaaaagcgataaaaaacgc
 K S T S F F R Q E S Q K L L Q S D K K R
 acggctgagttagcaaacggcgtctcgggtatgattgagctaaacgatgattacacgctg
 T A E L A N G A L G M I E L N D D Y T L
 aaaaaagtgatgaaaccgctgattgcatcctaacacagtaacagatgaaattgaacgcg
 K K V M K P L I A S N T V T D E I E R A
 aacgtctttaaataacggcaaatggtacctgttactgactcccgcggatcaaaaatg
 N V F K M N G K W Y L F T D S R G S K M
 acgattgacggcattacgtctaacgatatttacatgcttggttatgtttctaattcttta
 T I D G I T S N D I Y M L G Y V S N S L
 actggccatacaagccgctgaacaaaactggccttgtgttaaaaatggatcttgcct
 T G P Y K P L N K T G L V L K M D L D P
 aacgatgtaacctttacttactcacacttgcgtgtacctcaagcgaaggaacaatgtc
 N D V T F T Y S H F A V P Q A K G N N V
 gtgattacaagctatatgacaaacagaggattctacgcagacaaacaatcaacgtttgcg
 V I T S Y M T N R G F Y A D K Q S T F A
 ccaagcttctgctgaacatcaaaggcaaaaacatctgttgtcaaagacagcatcctt
 P S F L L N I K G K K T S V V K D S I L
 gaacaaggacaattaacagtttaacaaaacggatccgaattcgagctccgctcgacaagctt
 E Q G Q L T V N K T D P N S S S V D K L
 gcgccgactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcccga
 A A A L E H H H H H H - D P A A N K A R
 aagatgtcstcga
 K M X S

SacB N115A

gcggtcattccctctagaataatTTTTgtttaactttaagaaggagatatacatatgaaagaa
 G H S L - N N F V - L - E G D I H M K E
 mcgaacaaaagccatataaggaaacatacggcatttcccattacacgcatgatg
 X N Q K P Y K E T Y G I S H I T R H D M
 ctgcaaatccctgaacagcaaaaaatgaaaaatatcaagttcctgaattcgattcgctcc
 L Q I P E Q Q K N E K Y Q V P E F D S S
 acaattaaaaatatcttcttgcaaaaggcctggacgtttgggacagctggccattacaa
 T I K N I S S A K G L D V W D S W P L Q
 aacgctgacggcactgtcgaaaactatcacggctaccacatcgtctttgcattagccgga
 N A D G T V A N Y H G Y H I V F A L A G
 gatcctaaagcggcgatgacacatcgatttacatgttctatcaaaaagtcggcgaaact
 D P K A A D D T S I Y M F Y Q K V G E T
 tctattgacagctggaaaaacgctggcgcgtctttaagacagcgcaaatcgcgatgca
 S I D S W K N A G R V F K D S D K F D A
 aatgattctatcctaaaagaccaaacacaagaatggcaggttcagccacatttacatct
 N D S I L K D Q T Q E W S G S A T F T S
 gacggaaaaatccgtttattctactgatttctccgtaaacattacggcaaaaaaca
 D G K I R L F Y T D F S G K H Y G K Q T
 ctgacaactgcacaagttaacgtatcagcatcagacagctctttgaacatcaacggtgta
 L T T A Q V N V S A S D S S L N I N G V
 gaggattataaatcaatctttgacggtgacggaaaaacgtatcaaatgtacagcagttc
 E D Y K S I F D G D G K T Y Q N V Q Q F
 atcgatgaaggcaactacagctcacgcgacaaccatacgtgagagatcctcactacgta
 I D E G N Y S S R D N H T L R D P H Y V
 gaagataaaggccacaataacttagtatttgaagcaaacactggaactgagatggctacca
 E D K G H N T - Y L K Q T L E L R W L P
 aggcgaagaatcttttatttaacaaagcatactatggcaagcacatcattcttcgtcaga
 R R R I F Y L T K H T M A S T S F F V R
 agtcaaaacttctgcaagcgataaaaaacgccacgctgagtttagcaacgcgcctcytcgga
 S Q N F C K R - K R H A E L A T R L X G
 atgatgagctaaacgatgataaccgctgaaaaagtgatgatcgctgatgcatctaaccag
 M M S - T M I T A E K V M I A D A S N Q
 taccgatgaagtggaaacgcgcaacgtcttatgacgcgatgacctgttactgaatc
 Y R - S G T R E R L M T R - P V H - I

SacB D145A

gmagttacatctagaataatTTTTgtttaactTTAagaaggagatatacatatgaaagaacg
 S Y I - N N F V - L - E G D I H M K E T
 aacccaaaagccwtataaggaacatacggcatttcccatattacacgccatgatatgctg
 N Q K X Y K E T Y G I S H I T R H D M L
 caaatccctgaacagcaaaaaaatgaaaaatatcaagttcctgaattcgattcgccaca
 Q I P E Q Q K N E K Y Q V P E F D S S T
 attaaaaatatctcttctgcaaaaggcctggacgtttgggacagctggccattacaaaac
 I K N I S S A K G L D V W D S W P L Q N
 gctgacggcactgtcgcaaaactatcacggctaccacatcgtctttgcattagccggagat
 A D G T V A N Y H G Y H I V F A L A G D
 cctaaaaatgCGGgatgacacatcgattacatgTtctatcaaaaagtcggcgaaacttct
 P K N A D D T S I Y M F Y Q K V G E T S
 attgacagctggaaaaacgctggccgctctttaaagcgagcgacaaattcgatgcaaat
 I D S W K N A G R V F K A S D K F D A N
 gattctatcctaaaagaccaaacacaagaatggtcaggttcagccacatttacatctgac
 D S I L K D Q T Q E W S G S A T F T S D
 ggaaaaatccgTttattctacactgatttctccggtaaacattacggcaacaaacactg
 G K I R L F Y T D F S G K H Y G K Q T L
 acaactgcacaagttaacgtatcagcatcagacagctctttgaacatcaacgggtgtagag
 T T A Q V N V S A S D S S L N I N G V E
 gattataaatcaatctttgacgggtgacggaaaaacgtatcaaatgtacagcagttcatc
 D Y K S I F D G D G K T Y Q N V Q Q F I
 gatgaaggcaactacagctcaggcgacaaccatacgtgagagatcctcactacgtagaa
 D E G N Y S S G D N H T L R D P H Y V E
 gataaaggccacaaatacttagtatttgaagcaaacactggaactgaagatggctaccaa
 D K G H K Y L V F E A N T G T E D G Y Q
 ggCGaagaatctttatTTAcaaaagcatactatggcaaaagcacatcattcttccgtcaa
 G E E S L F N K A Y Y G K S T S F F R Q
 gaaagtcaaaaacttctgcaaaagcgataaaaaacgcacggctgagttagcaaacggcgct
 E S Q K L L Q S D K K R T A E L A N G A
 ctCGgtatgattgagctaaacgatgattacacgctgaaaaagtgatgaaaccgctgatt
 L G M I E L N D D Y T L K K V M K P L I
 gcatctaacacagtaacagatgaaattgaacgcgcgaacgtctttaaataaacggcaaa
 A S N T V T D E I E R A N V F K M N G K
 tggTactgttactgactcccCGgatcaaaaatgacgattgacggcattacgtctaac
 W Y L F T D S R G S K M T I D G I T S N
 gatatttacatgcttggttatgTttctaatctttaaactggccatacaagccgctgaa
 D I Y M L G Y V S N S L T G P Y K P L N
 aaaactggccttTgttAAAAatggatcttgatcctaacgatgtaacctttacttactca
 K T G L V L K M D L D P N D V T F T Y S
 cacttCGctgtacctcaagCGaaaggaacaatgtcgtgattacaagctatatgacaaac
 H F A V P Q A K G N N V V I T S Y M T N
 agaggattctacgcagacaaacaatcaacgtttgCGccaagcttctcgtgaaacatcaa
 R G F Y A D K Q S T F A P S F L L N I K
 ggcaagaaaacatctgtTgtcaaaagacagcatccttgaacaaggacaattaacagttaac
 G K K T S V V K D S I L E Q G Q L T V N
 aaactTgCGccgactcgagcaccaccaccactgagatccggtgctaacaaa
 K L A A A L E H H H H H H - D P A A N K
 gccCGaaatgac
 A R N D

SacB K148A

gggwcattccgtctagataatthttgthtaactthtaagaaggagatatacatatgaaagaa
 G X F R L D N F V - L - E G D I H M K E
 acgaacaaaagccatataaggaacatacggcatttcccatattacacgcatgatatg
 T N Q K P Y K E T Y G I S H I T R H D M
 ctgcaaatccctgaacagcaaaaaaatgaaaaatatcaagttcctgaattcgattcgctcc
 L Q I P E Q Q K N E K Y Q V P E F D S S
 acaattaaaaatatcttcttgcaaaaaggcctggacgtttgggacagctggccattacaa
 T I K N I S S A K G L D V W D S W P L Q
 aacgctgacggcactgtcgaaaactatcacggctaccacatcgtctttgcattagccgga
 N A D G T V A N Y H G Y H I V F A L A G
 gatcctaaaaatgcggtgacacatcgatttacatgttctatcaaaaagtcggcgaaact
 D P K N A D D T S I Y M F Y Q K V G E T
 tctattgacagctggaaaaacgctggcgcgtctthtaagacagcgcgcaattcgatgca
 S I D S W K N A G R V F K D S D A F D A
 aatgattctatcctaaaagaccaaacacamgaatggcaggttcagccacatttacatct
 N D S I L K D Q T X E W S G S A T F T S
 gacggaaaaatccgthttattctacactgatttctccgtaaacattacggcaaaaca
 D G K I R L F Y T D F S G K H Y G K Q T
 ctgacaactgcacaagttaacgtatcagcatcagacagctctthtaaacatcaacggtgta
 L T T A Q V N V S A S D S S L N I N G V
 gaggattataaatcaatctttgacggtgacggaaaaacgtatcaaatgtacagcagttc
 E D Y K S I F D G D G K T Y Q N V Q Q F
 atcgatgaaggcaactacagctcagggcacaaccatacgtgagagatcctcactacgta
 I D E G N Y S S G D N H T L R D P H Y V
 gaagataaaggccacaaatacttagtatttgaagcaaacactggaactgaagatggctac
 E D K G H K Y L V F E A N T G T E D G Y
 caaggcgaagaatctthtttaacaaagcatactatggcaaaagcacatcattcttccgt
 Q G E E S L F N K A Y Y G K S T S F F R
 caagaaagtcaaaaacttctgcaaaagcgataaaaaacgcacggctgagttagcaaacggc
 Q E S Q K L L Q S D K K R T A E L A N G
 gctctcggatgattgagctaaacgatgattacacgctgaaaaaagtgatgaaccgctga
 A L G M I E L N D D Y T L K K V M N R -
 ttgcatctaacacagtaacagatgaaattgaacgcgcgaacgtctthtaaatgaacggca
 L H L T Q - Q M K L N A R T S L K - T A
 aatggtaacctgttcmctgactcccggatcaaaaatgacgattgacgcattacstctaa
 N G T C X L T P A D Q K - R L T H Y X -
 cgatatttacatgctgatatgtttctaattctttacctgcccatacagcgtgacaaaacc
 R Y L H A D M F L I L Y L P I Q R - Q T
 tgacccttgtgttaaaatkgaatccttggattccctwacsg
 - P L C - N X N P W I P X X

SacB Q159A

ggwaattacctctagaataatTTTTgtttaactTTAagaaggagatatacatatgaaagaa
 X N Y L - N N F V - L - E G D I H M K E
 acgaaccaaagccatataaggaacatacggcatttcccatattacagccatgatatg
 T N Q K P Y K E T Y G I S H I T R H D M
 ctgcaaatccctgaacagcaaaaaatgaaaaatatcaagttcctgaattcgattcgtcc
 L Q I P E Q Q K N E K Y Q V P E F D S S
 acaattaaaaatatctctctgcaaaaggcctggacgtttgggacagctggccattacaa
 T I K N I S S A K G L D V W D S W P L Q
 aacgctgacggcactgtcgaaaactatcacggctaccacatcgtctttgcattagccgga
 N A D G T V A N Y H G Y H I V F A L A G
 gatcctaaaaatgcggatgacacatcgatttacatgttctatcaaaaagtcggcgaaact
 D P K N A D D T S I Y M F Y Q K V G E T
 tctattgacagctgaaaaacgctggccgctctttaagacagcgacaaaattcgatgca
 S I D S W K N A G R V F K D S D K F D A
 aatgattctatcctaaaagacggcaacacaagaatggcaggttcagccacatttacatct
 N D S I L K D A T Q E W S G S A T F T S
 gacggaaaaatccgtttattctactgatttctccgtaaacattacggcaacaaaca
 D G K I R L F Y T D F S G K H Y G K Q T
 ctgacaactgcacaagttaacgtatcagcatcagacagctctttgacatcaacggtgta
 L T T A Q V N V S A S D S S L N I N G V
 gaggattataaatcaatctttgacggtgacggaaaaacgtatcaaatgtacagcagttc
 E D Y K S I F D G D G K T Y Q N V Q Q F
 atcgatgaaggcaactacagctcaggcgacaaccatacgtgagagatcctcactacgta
 I D E G N Y S S G D N H T L R D P H Y V
 gaagataaaggccacaaatacttagtatttgaagcaaacactggaactgaagatggctac
 E D K G H K Y L V F E A N T G T E D G Y
 caaggcgaagaatctttatttaacaaagcatactatggcaaaagcacatcattcttccgt
 Q G E E S L F N K A Y Y G K S T S F F R
 caagaaagtcaaaaacttctgcaaaagcgataaaaaacgcacggctgagttagcaaacggc
 Q E S Q K L L Q S D K K R T A E L A N G
 gctctcggatgattgagctaaacgatgattacagctgaaaaaagtgatgaaaccgctg
 A L G M I E L N D D Y T L K K V M K P L
 attgcatctaacacagtaacagatgaaattgaacgcgcaacgtctttaaataaccgg
 I A S N T V T D E I E R A N V F K M N R
 caaatggtacctgttcmctgactcccggatcaaaaatgacgattgacggcattacgtc
 Q M V P V X - L P R I K N D D - R H Y V
 tacgatatttacatgcttgcctatggttctaactcctttacctgggtcccataccwcagccc
 Y D I Y M L A M V L T P L P G P I X Q P
 gccttgaaccaata
 A L E P I

SacB E162A

cgwtgrwmattcccctctagaataatTTTgtTTaactTTaagaaggagatatacatatgaaa
 X X I P L - N N F V - L - E G D I H M K
 gaaacgaacccaaaagccatataaggaacatacggcatttcccatattacacgccatgat
 E T N Q K P Y K E T Y G I S H I T R H D
 atgctgcaaattccctgaacagcaaaaaatgaaaaatatcaagttcctgaattcgattcg
 M L Q I P E Q Q K N E K Y Q V P E F D S
 tccacaattaaaaatatctcttctgcaaaaggcctggacgTTTgggacagctggccatta
 S T I K N I S S A K G L D V W D S W P L
 caaaacgctgacggcactgtctgcaaaactatcacggctaccacatcgtctTTgcattagcc
 Q N A D G T V A N Y H G Y H I V F A L A
 ggagatcctaataatgccgatgacacatcgatttacatgTTctatcaaaaagtcggcgaa
 G D P K N A D D T S I Y M F Y Q K V G E
 acttctattgacagctggaaaaacgctggccgctctTTaagacagcgacaaattcgat
 T S I D S W K N A G R V F K D S D K F D
 gcaaatgattctatcctaataagaccaaacacaagcattgggtcaggttcagccacattaca
 A N D S I L K D Q T Q A W S G S A T F T
 tctgacggaaaaatccgTTtattctacactgatttctccggtaaacattacggcaaaaca
 S D G K I R L F Y T D F S G K H Y G K Q
 aactgacaactgcacaagTTaacgtatcagcatcagacagctctTTgaacatcaacggt
 T L T T A Q V N V S A S D S S L N I N G
 gtmgaggattataaatcaatctTTgacggtgacggaaaaacgtatcaaatgtacagcag
 X E D Y K S I F D G D G K T Y Q N V Q Q
 ttcacgatgaaggcaactacagctcagggcacaaccatacggctgagagatcctcactac
 F I D E G N Y S S G D N H T L R D P H Y
 gtagaagataaaggccacaaatacttagtattTTgaagcaaacactggaactgaagatggc
 V E D K G H K Y L V F E A N T G T E D G
 taccaaggcgaagaatctTTtatttaacaamgcatactatggcaaaagcacatcattcttc
 Y Q G E E S L F N X A Y Y G K S T S F F
 cgtcaagaaagtcaaaaacttctgcaaaagcgataaaaaacgcacggctgagTTtagcaaac
 R Q E S Q K L L Q S D K K R T A E L A N
 ggcgctctcgggtatgatgagctaaacgatgattacacgctgaaaaaagtgatgaaccgc
 G A L G M I E L N D D Y T L K K V M N R
 tgattgcatctacacagtaacagatgaaattgacgcgcgaacgtctTTaatgaacggca
 - L H L H S N R - N - R A N V F K - T A
 atggtagctgTTcactgactcccgcggatcaaaaatgacgattgacgcattacgtctacg
 M V P V H - L P R I K N D D - R I T S T
 atattttmcattgctggctatgTTtctattcttaactggccatacagcgtgaacaacct
 I F X M L A M F L F L T G P Y S A E Q P
 ggctgtgTTaaaatggaatycttggaatcctaacgaatg
 G C V K M E X L E S - R M

D. Purificación de SacB y mutantes

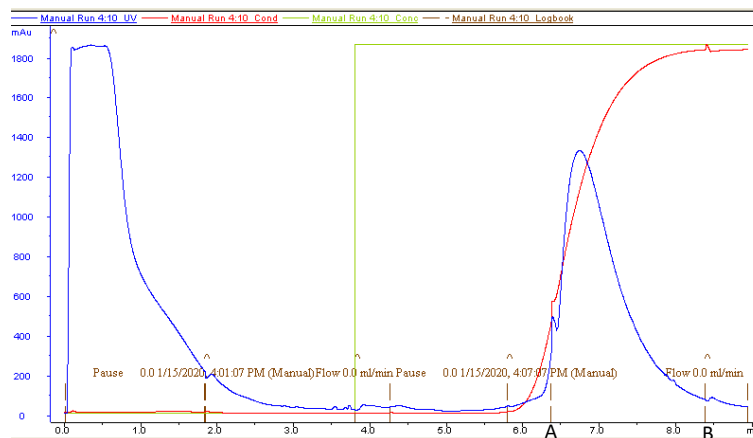


Figura 28. Cromatograma de purificación de SacB K148A. A modo de ejemplo se presenta el cromatograma de purificación de la mutante K148A. Las fracciones que se colectan para concentrar la proteína van del punto A al B

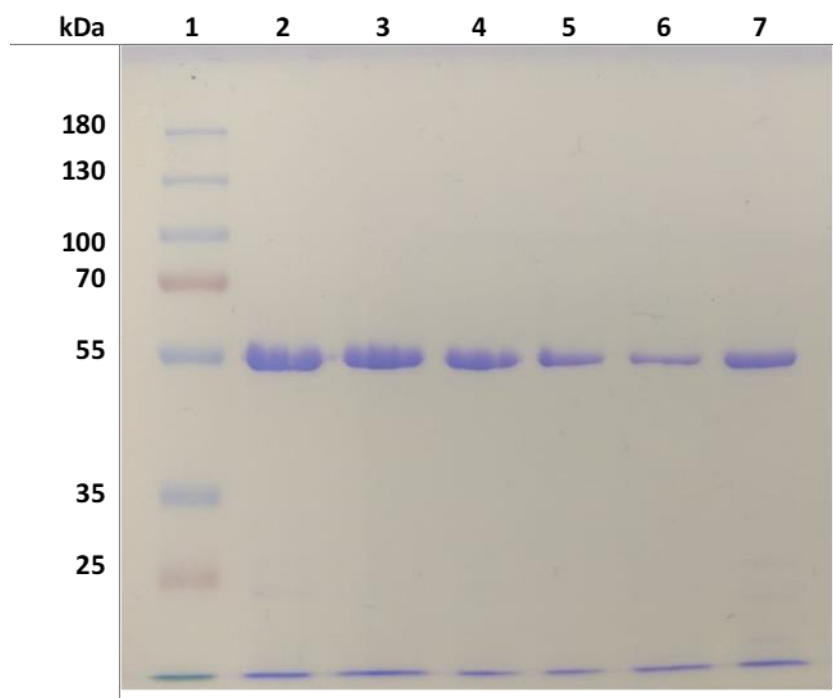


Figura 29. Gel de electroforesis SDS-PAGE. Carriles: 1) Marcador Page Ruler, 2) SacB WT, 3) SacB N115A, 4) SacB D145A, 5) SacB K148a, 6) SacB Q159A, 7) SacB E162A

E. Relación hidrólisis / transferencia.

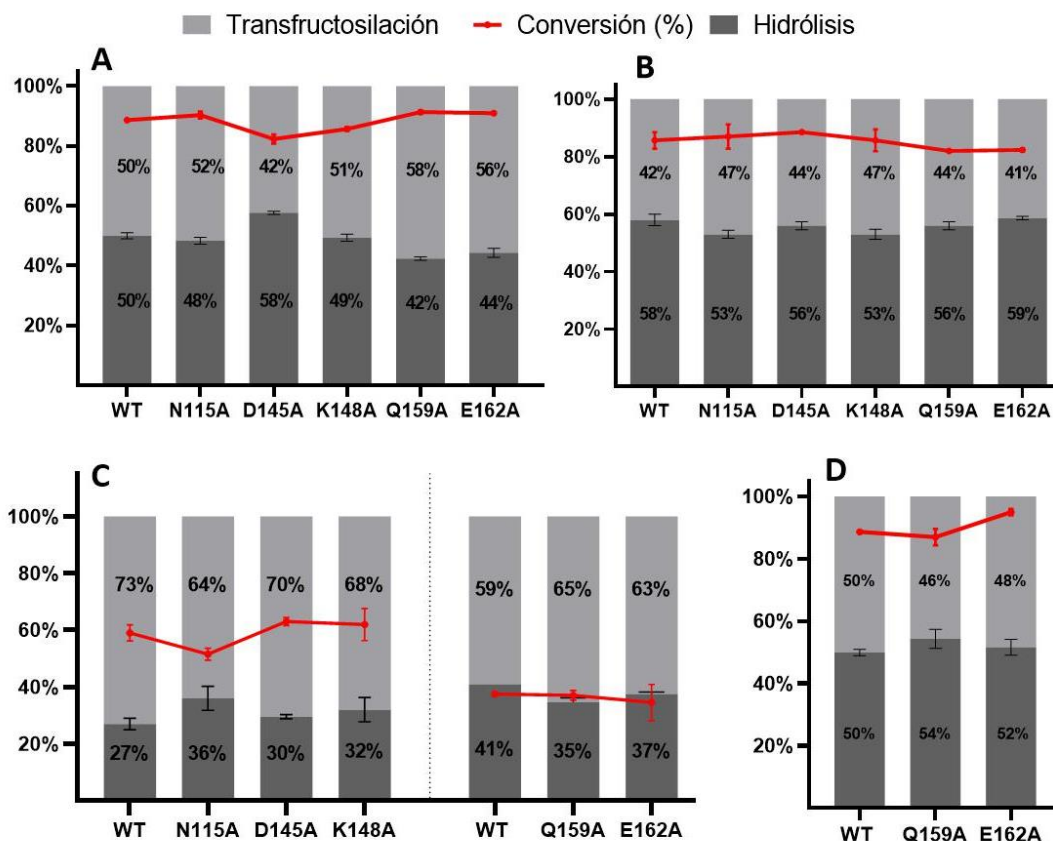


Figura 30. Relación hidrólisis/transferencia de la enzima SacB WT y diversas mutantes del OBS2 . A) 0.1 μM de enzima SacB WT y mutantes N115A, D145A y K148A 9 horas de reacción. Mutantes Q159A y E162A 36 y 72 horas respectivamente. B) 1 μM de enzima, SacB WT y mutantes N115A, D145A y K148A 60 minutos de reacción. Mutantes Q159A y E162A 120 y 150 minutos respectivamente. C) 0.01 μM de enzima, lado derecho SacB WT y mutantes 7 días de reacción, lado izquierdo 0.01 μM de enzima, SacB WT 1 día de reacción y 7 días para las mutantes Q159A y E162A. D) Reacciones con 1U/mL 24 horas de reacción para Q159A y E162A. 9 horas de reacción para SacB WT

F. Cinética de reacción 0.1 μM SacB y mutantes

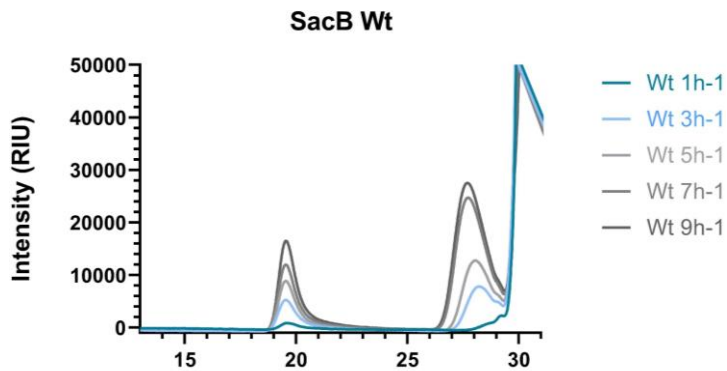


Figura 31. Cinética de reacción 0.1 μM de SacB WT

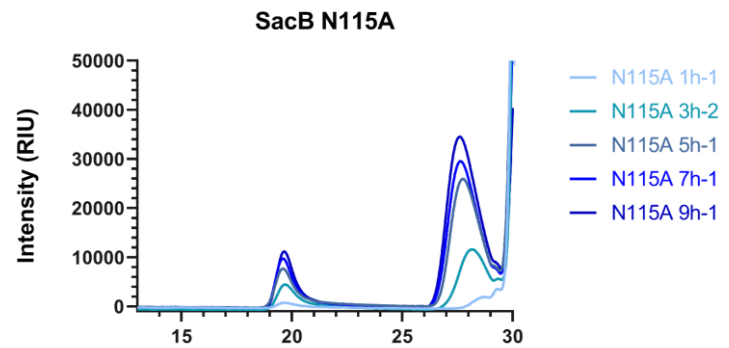


Figura 32. Cinética de reacción 0.1 μM de SacB N115A

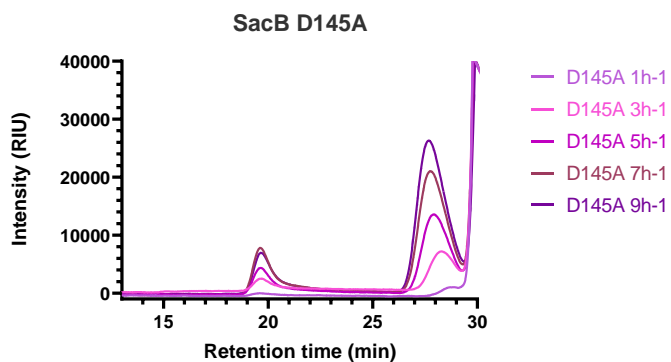


Figura 33. Cinética de reacción 0.1 μM de SacB D145A

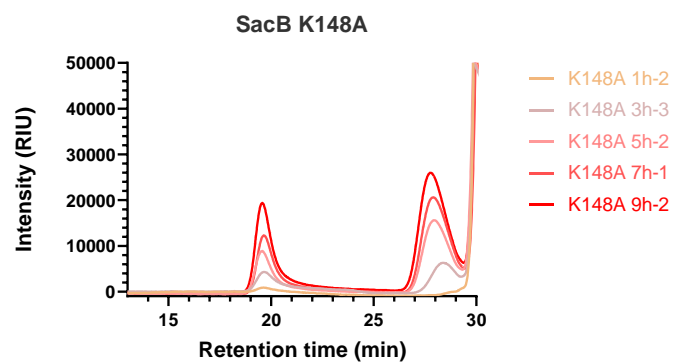


Figura 34. Cinética de reacción 0.1 μM de SacB K148A

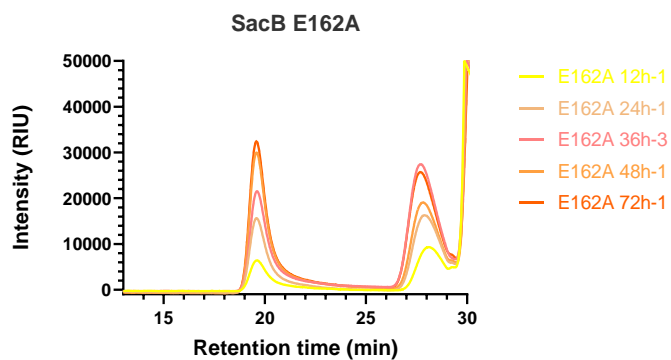


Figura 35. Cinética de reacción 0.1 μM de SacB E162A

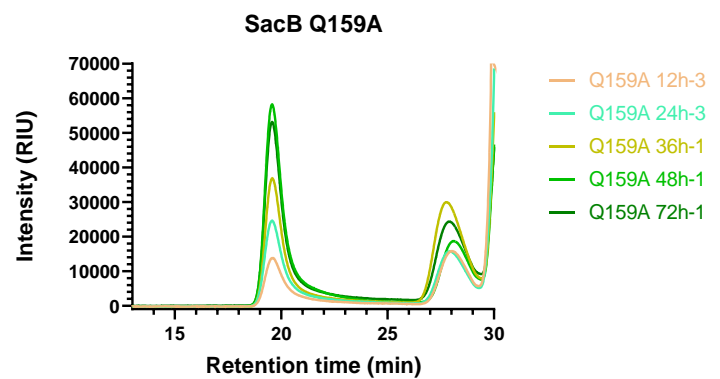


Figura 36. Cinética de reacción 0.1 μM de SacB Q159A

G. Curvas de progreso de reacción con 0.01 μM y 1 μM de enzima.

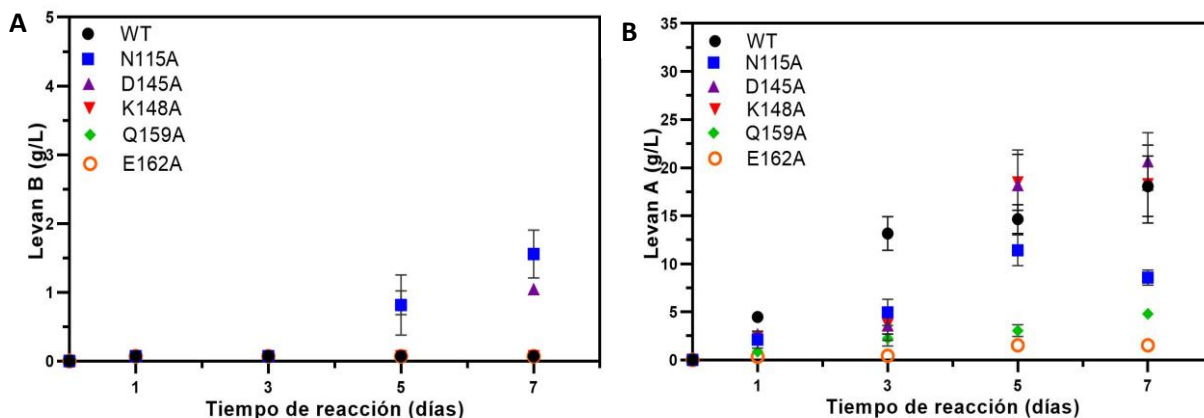


Figura 37. Efecto de las mutaciones en las curvas de progreso de las reacciones enzimáticas evaluadas con 0.01 μM de enzima. Las gráficas A y B representan la curva de progreso de producción de polímero de bajo peso molecular (levan B) y alto peso molecular, respectivamente. Condiciones de reacción con 100 g/L de sacarosa, 37 °C, pH 6 y 0.01 μM de enzima.

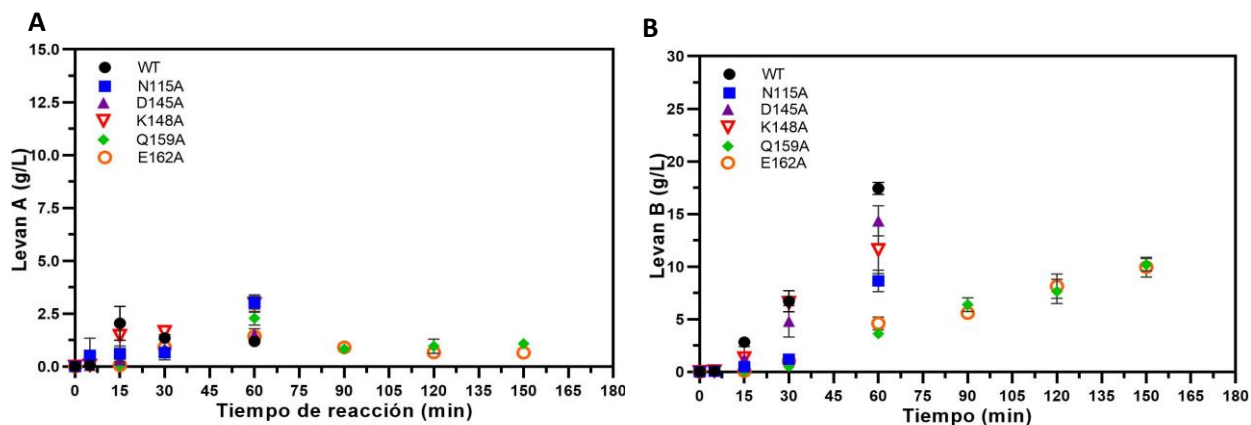


Figura 38. Efecto de las mutaciones en las curvas de progreso de las reacciones enzimáticas evaluadas con 1 μM de enzima. Las gráficas A y B representan la curva de progreso de producción de polímero de alto peso molecular (levan A) y producción de polímero de bajo molecular (levan B) respectivamente; ambos grupos realizados con 100 g/L de sacarosa, 37 °C, pH 6 y 1 μM de enzima.

H. Cinética de reacción de mutantes Q159A y E162A con 1 U/mL

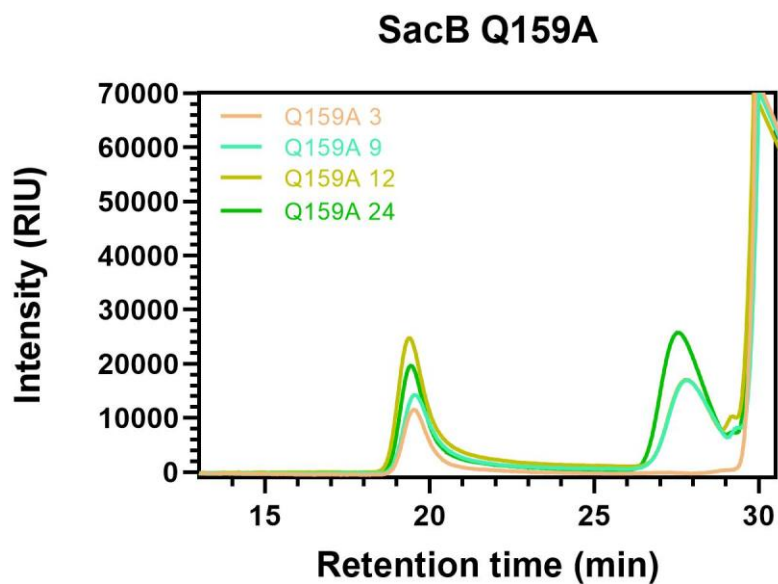


Figura 39. Cinética de producción de polímero de Q159A con 1 U/mL

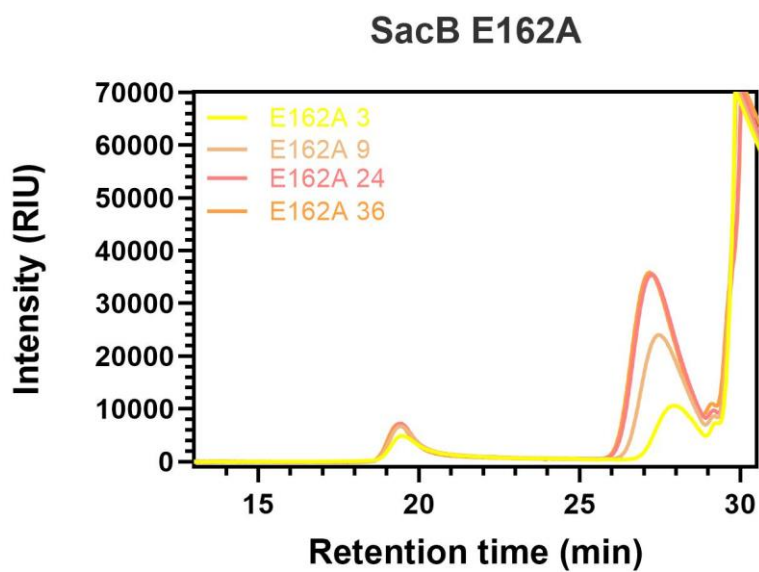


Figura 40. Cinética de producción de polímero de E162A con 1 U/mL.

I. Multialineamiento levansacarosas

CAA26513.1_B._subtilis/1-473

```
CAA26513.1_B._subtilis/1-473
AGZ16261.1B_licheniformis/1-482
CAA37179.1B_amyolliquefaciens/1-472
ADF38395.1B_megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G_stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P_polymyxa/1-499
AAB36606.1G_diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z_mobilis/1-423
AAC36458.1R_aquatilis/1-415
AA19523.1L_mesenteroides/1-1022
MRKKLYKAGKLVVAGAAVRLQSWAPNIVSADTTNSTTTADATTTSSATESISSSTESDDN
```

CAA26513.1_B._subtilis/1-473

```
CAA26513.1_B._subtilis/1-473
AGZ16261.1B_licheniformis/1-482
CAA37179.1B_amyolliquefaciens/1-472
ADF38395.1B_megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G_stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P_polymyxa/1-499
AAB36606.1G_diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z_mobilis/1-423
AAC36458.1R_aquatilis/1-415
AA19523.1L_mesenteroides/1-1022
KVDTSNTDAVTVTNSDDSNNSAETSNSDAKVTSNNTAQKDEA
```

CAA26513.1_B._subtilis/1-473

```
CAA26513.1_B._subtilis/1-473
AGZ16261.1B_licheniformis/1-482
CAA37179.1B_amyolliquefaciens/1-472
ADF38395.1B_megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G_stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P_polymyxa/1-499
AAB36606.1G_diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z_mobilis/1-423
AAC36458.1R_aquatilis/1-415
AA19523.1L_mesenteroides/1-1022
VAETKRTAVNTSESESGSNNEQLAETATDNKVDASSQKQSTPSVEK...LDDSVSK
```

CAA26513.1_B._subtilis/1-473

```
CAA26513.1_B._subtilis/1-473
AGZ16261.1B_licheniformis/1-482
CAA37179.1B_amyolliquefaciens/1-472
ADF38395.1B_megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G_stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P_polymyxa/1-499
AAB36606.1G_diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z_mobilis/1-423
AAC36458.1R_aquatilis/1-415
AA19523.1L_mesenteroides/1-1022
DLNSKTTVVTKNADGTSTNMLYANLKDVAADNI...ASLNPDTSVDFYFNADALTKN
```

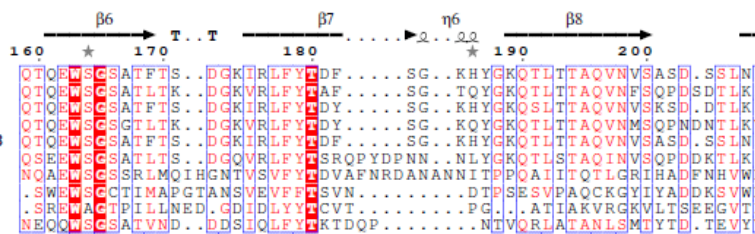
CAA26513.1_B._subtilis/1-473

```
CAA26513.1_B._subtilis/1-473
AGZ16261.1B_licheniformis/1-482
CAA37179.1B_amyolliquefaciens/1-472
ADF38395.1B_megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G_stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P_polymyxa/1-499
AAB36606.1G_diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z_mobilis/1-423
AAC36458.1R_aquatilis/1-415
AA19523.1L_mesenteroides/1-1022
LPAAMTTADAQTGQIQDLVWDSWALQDAKGTAVANYHGYNLVFAAGYPKEDN...EDN
```

CAA26513.1_B._subtilis/1-473

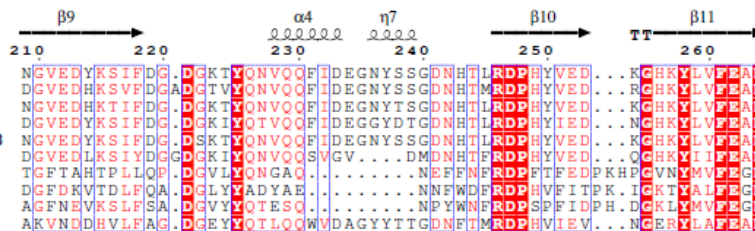
```
CAA26513.1_B._subtilis/1-473
AGZ16261.1B_licheniformis/1-482
CAA37179.1B_amyolliquefaciens/1-472
ADF38395.1B_megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G_stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P_polymyxa/1-499
AAB36606.1G_diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z_mobilis/1-423
AAC36458.1R_aquatilis/1-415
AA19523.1L_mesenteroides/1-1022
DQHYMLYTKYCDTA...LNNKKNAGPVFGFNKAW
```

CAA26513.1 *B. subtilis*/1-473



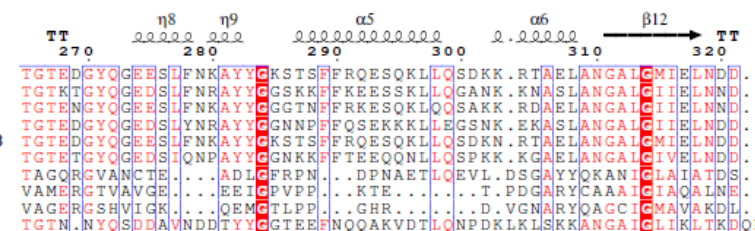
CAA26513.1 *B. subtilis*/1-473
 AG216261.1B *licheniformis*/1-482
 CAA37179.1B *amyloliquefaciens*/1-472
 ADF38395.1B *megaterium* DSM 319/1-484
 AAB97111.1G *stearothermophilus* /1-473
 CAB39327.1P *polymyxa*/1-499
 AAB36606.1G *diazotrophicus*/1-584
 AAA27695.1Z *mobilis*/1-423
 AAC36458.1R *aquatilis*/1-415
 AAY19523.1L *mesenteroides*/1-1022

CAA26513.1 *B. subtilis*/1-473



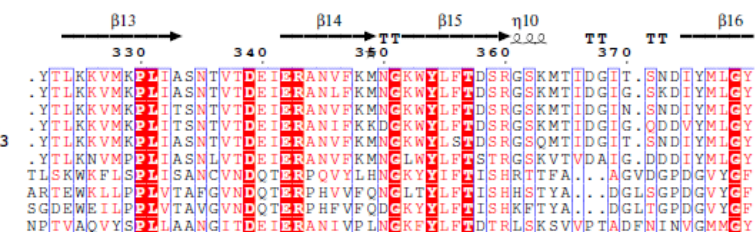
CAA26513.1 *B. subtilis*/1-473
 AG216261.1B *licheniformis*/1-482
 CAA37179.1B *amyloliquefaciens*/1-472
 ADF38395.1B *megaterium* DSM 319/1-484
 AAB97111.1G *stearothermophilus* /1-473
 CAB39327.1P *polymyxa*/1-499
 AAB36606.1G *diazotrophicus*/1-584
 AAA27695.1Z *mobilis*/1-423
 AAC36458.1R *aquatilis*/1-415
 AAY19523.1L *mesenteroides*/1-1022

CAA26513.1 *B. subtilis*/1-473



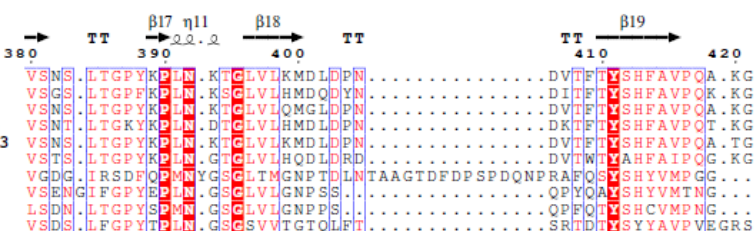
CAA26513.1 *B. subtilis*/1-473
 AG216261.1B *licheniformis*/1-482
 CAA37179.1B *amyloliquefaciens*/1-472
 ADF38395.1B *megaterium* DSM 319/1-484
 AAB97111.1G *stearothermophilus* /1-473
 CAB39327.1P *polymyxa*/1-499
 AAB36606.1G *diazotrophicus*/1-584
 AAA27695.1Z *mobilis*/1-423
 AAC36458.1R *aquatilis*/1-415
 AAY19523.1L *mesenteroides*/1-1022

CAA26513.1 *B. subtilis*/1-473



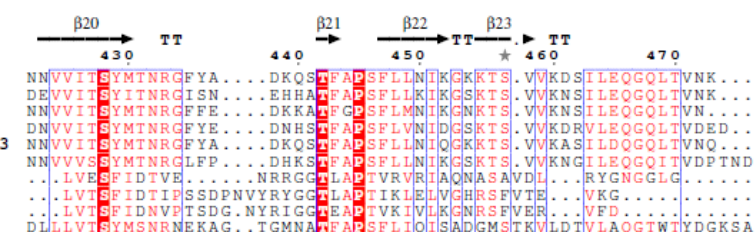
CAA26513.1 *B. subtilis*/1-473
 AG216261.1B *licheniformis*/1-482
 CAA37179.1B *amyloliquefaciens*/1-472
 ADF38395.1B *megaterium* DSM 319/1-484
 AAB97111.1G *stearothermophilus* /1-473
 CAB39327.1P *polymyxa*/1-499
 AAB36606.1G *diazotrophicus*/1-584
 AAA27695.1Z *mobilis*/1-423
 AAC36458.1R *aquatilis*/1-415
 AAY19523.1L *mesenteroides*/1-1022

CAA26513.1 *B. subtilis*/1-473



CAA26513.1 *B. subtilis*/1-473
 AG216261.1B *licheniformis*/1-482
 CAA37179.1B *amyloliquefaciens*/1-472
 ADF38395.1B *megaterium* DSM 319/1-484
 AAB97111.1G *stearothermophilus* /1-473
 CAB39327.1P *polymyxa*/1-499
 AAB36606.1G *diazotrophicus*/1-584
 AAA27695.1Z *mobilis*/1-423
 AAC36458.1R *aquatilis*/1-415
 AAY19523.1L *mesenteroides*/1-1022

CAA26513.1 *B. subtilis*/1-473



CAA26513.1 *B. subtilis*/1-473
 AG216261.1B *licheniformis*/1-482
 CAA37179.1B *amyloliquefaciens*/1-472
 ADF38395.1B *megaterium* DSM 319/1-484
 AAB97111.1G *stearothermophilus* /1-473
 CAB39327.1P *polymyxa*/1-499
 AAB36606.1G *diazotrophicus*/1-584
 AAA27695.1Z *mobilis*/1-423
 AAC36458.1R *aquatilis*/1-415
 AAY19523.1L *mesenteroides*/1-1022

CAA26513.1.B._subtilis/1-473

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473
AG216261.1B.licheniformis/1-482
CAA37179.1B.amyloliquefaciens/1-472
ADF38395.1B.megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G.stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P.polymyxa/1-499
AAB36606.1G.diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z.mobiliis/1-423
AAC36458.1.R.aquatilis/1-415
AA19523.1L.mesenteroides/1-1022
.....
KKESPNEYGKK.....TSGLAAQA.....STNNAQVLAQVR
.....GYGDIPANRADVNIAGFIQDLFGQP.....
.....YGYIPPQIEWLAE.....D.....E.....SSNSAAALSLLN
.....YGYIPPMKNIILN.....
SVEEL..YGNKATSELTDMKIGWVDNKFYVDNELANGVYDYINTSYLLFKNGVRLSGVQ

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473
AG216261.1B.licheniformis/1-482
CAA37179.1B.amyloliquefaciens/1-472
ADF38395.1B.megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G.stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P.polymyxa/1-499
AAB36606.1G.diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z.mobiliis/1-423
AAC36458.1.R.aquatilis/1-415
AA19523.1L.mesenteroides/1-1022
.....
QFLNQ.....
R.....
TYANSYYPDPVYTKRVDNEIHQDNTGKKRYFGNDGRVRKQGFVAVNGVAYNFGNDKTYE

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473
AG216261.1B.licheniformis/1-482
CAA37179.1B.amyloliquefaciens/1-472
ADF38395.1B.megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G.stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P.polymyxa/1-499
AAB36606.1G.diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z.mobiliis/1-423
AAC36458.1.R.aquatilis/1-415
AA19523.1L.mesenteroides/1-1022
.....
RGFASGYLQDVTDDNNQWYWFESGKYYTGFRYYMGTYFFETGQRQESKWTAWGMKYYVQ

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473
AG216261.1B.licheniformis/1-482
CAA37179.1B.amyloliquefaciens/1-472
ADF38395.1B.megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G.stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P.polymyxa/1-499
AAB36606.1G.diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z.mobiliis/1-423
AAC36458.1.R.aquatilis/1-415
AA19523.1L.mesenteroides/1-1022
.....
TDGRAVQGVQIIDQAYDFGTNGTFLKGTASGYLYSPSLSTANGGYNWFENKPYTGFR

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473
AG216261.1B.licheniformis/1-482
CAA37179.1B.amyloliquefaciens/1-472
ADF38395.1B.megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G.stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P.polymyxa/1-499
AAB36606.1G.diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z.mobiliis/1-423
AAC36458.1.R.aquatilis/1-415
AA19523.1L.mesenteroides/1-1022
.....
YFEGTYWFVNGVRQONAGWREAWGKYYTDAAGRALQGIQIIDQAYDFGTNGTYNLKSA

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473
AG216261.1B.licheniformis/1-482
CAA37179.1B.amyloliquefaciens/1-472
ADF38395.1B.megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G.stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P.polymyxa/1-499
AAB36606.1G.diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z.mobiliis/1-423
AAC36458.1.R.aquatilis/1-415
AA19523.1L.mesenteroides/1-1022
.....
ASGYLYSPSYSKANGGYNWFENKPYTGFRYYMGTYWFVNGVRQONAGWREAWGKYYTQ

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473

```

CAA26513.1.B._subtilis/1-473
AG216261.1B.licheniformis/1-482
CAA37179.1B.amyloliquefaciens/1-472
ADF38395.1B.megaterium_DSM_319/1-484
AAB97111.1G.stearothermophilus_/1-473
CAB39327.1P.polymyxa/1-499
AAB36606.1G.diazotrophicus/1-584
AAA27695.1Z.mobiliis/1-423
AAC36458.1.R.aquatilis/1-415
AA19523.1L.mesenteroides/1-1022
.....
ANGRALQGIQKIDGQQYNFNGDGTYYLR

```

J. Motivo conservados de la familia GH68

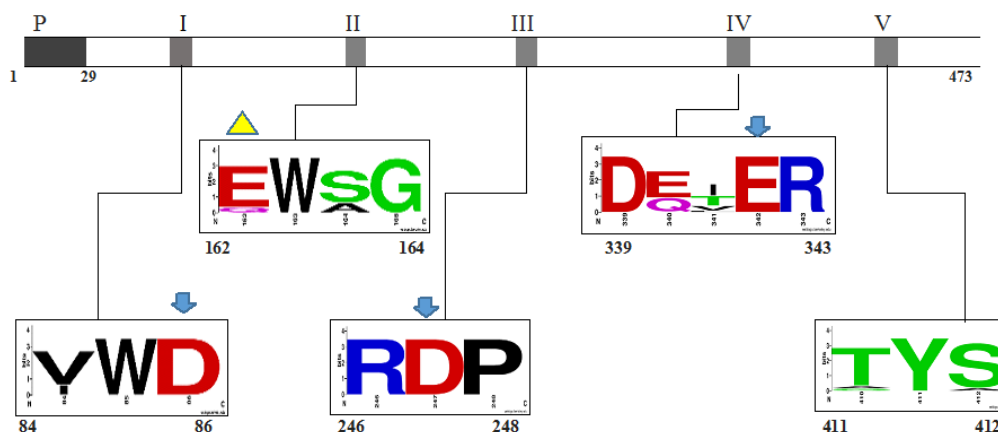


Figura 41. Representación esquemática de los motivos conservados de la familia GH68. La secuencia de aminoácidos de *Bacillus subtilis* SacB (CAA26513.1) se usó como plantilla. Las alineaciones (sequencelogo, <http://weblogo.berkeley.edu/>) se muestran como regiones cortas de la familia GH68. Los residuos de la tríada catalítica (D86, E342 y D247, numeración SacB), se muestran con flechas azules. El residuo mutado del OBS2 se señala con triángulo amarillo. Las siguientes 15 secuencias de aminoácidos se usaron para la alineación: *B. subtilis* SacB (CAA26513.1); *B. licheniformis* (AGZ16261.1); *B. amyloliquefaciens* (CAA37179.1); *B. megaterium* (ADF38395.1); *G. stearothermophilus* (AAB97111.1); *P. polymyxa* (CAB39327.1); *G. diazotrophicus* (AAB36606.1); *Z. mobilis* (AAA27695.1); *L. mesenteroides* (AAY19523.1); *R. aquatilis* (AAC36458.1); *Brenneria sp* (EHD23269.1); *S. mutans* (AAA88584.1); *S. salivarius* (AAA71925.1); *L. reuteri* (AAO14618.1); *E. amylovora* (CAA52972.1); *P. savastanoi* (AAK49951.1).

13. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Fattah, A. M., Gamal-Eldeen, A. M., Helmy, W. A., & Esawy, M. A. (2012). Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. *Carbohydrate Polymers*, *89*(2), 314-322. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.041>
- Albenne, C., Skov, L. K., Tran, V., Gajhede, M., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., & André-Leroux, G. (2007). Towards the molecular understanding of glycogen elongation by amylosucrase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *66*(1), 118-126. <https://doi.org/10.1002/prot.21083>
- Amos, R. A., Pattathil, S., Yang, J.-Y., Atmodjo, M. A., Urbanowicz, B. R., Moremen, K. W., & Mohnen, D. (2018). A two-phase model for the non-processive biosynthesis of homogalacturonan polysaccharides by the GAUT1:GAUT7 complex. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(49), 19047-19063. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004463>
- Banguela, A., & Hernández, L. (2006). Fructans: From natural sources to transgenic plants. *Fructanos: producción natural y plantas transgénicas.*, *23*(3), 202-210.
- Bersaneti, G. T., Pan, N. C., Baldo, C., & Celligoi, M. A. P. C. (2018). Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by Levansucrase from *Bacillus subtilis* natto with Potential Application in the Food Industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *184*(3), 838-851. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2587-0>
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, *37*(Database issue), D233-D238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
- Charoenwongpaiboon, T., Sitthiyotha, T., Na Ayutthaya, P. P., Wangpaiboon, K., Chunsriviro, S., Hengsakul Prousoontorn, M., & Pichyangkura, R. (2019). Modulation of fructooligosaccharide chain length and insight into the product binding motif of *Lactobacillus reuteri* 121 inulosucrase. *Carbohydrate Polymers*, *209*, 111-121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.078>
- Chuankhayan, P., Hsieh, C.-Y., Huang, Y.-C., Hsieh, Y.-Y., Guan, H.-H., Hsieh, Y.-C., Tien, Y.-C., Chen, C.-D., Chiang, C.-M., & Chen, C.-J. (2010). Crystal structures of *Aspergillus japonicus* fructosyltransferase complex with donor/acceptor substrates reveal complete subsites in the active site for catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(30), 23251-23264. Scopus. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.113027>
- Cockburn, D., & Svensson, B. (2013). Surface binding sites in carbohydrate active enzymes: An emerging picture of structural and functional diversity. En *Carbohydrate Chemistry* (pp. 204-221). <https://doi.org/10.1039/9781849737173-00204>
- Costa, R. R., Neto, A. I., Calgeris, I., Correia, C. R., Pinho, A. C. M., Fonseca, J., Öner, E. T., & Mano, J. F. (2013). Adhesive nanostructured multilayer films using a bacterial exopolysaccharide for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, *1*(18), 2367-2374. <https://doi.org/10.1039/C3TB20137F>
- Cuyvers, S., Dornez, E., Rezaei, M. N., Pollet, A., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2011). Secondary substrate binding strongly affects activity and binding affinity of *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* GH11 xylanases. *FEBS Journal*, *278*(7), 1098-1111. Scopus. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08023.x>
- Cuyvers, Sven, Dornez, E., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2011). The secondary substrate binding site of the *Pseudoalteromonas haloplanktis* GH8 xylanase is relevant for activity on insoluble but not soluble substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *92*(3), 539-549. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3343-y>

- Cuyvers, Sven, Dornez, E., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2012). Occurrence and functional significance of secondary carbohydrate binding sites in glycoside hydrolases. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2), 93-107. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.561537>
- Dahech, I., Harrabi, B., Hamden, K., Feki, A., Mejdoub, H., Belghith, H., & Belghith, K. S. (2013). Antioxidant effect of nondigestible levan and its impact on cardiovascular disease and atherosclerosis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58, 281-286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.058>
- De Vos, D., Collins, T., Nerinckx, W., Savvides, S. N., Claeysens, M., Gerday, C., Feller, G., & Van Beeumen, J. (2006). Oligosaccharide Binding in Family 8 Glycosidases: Crystal Structures of Active-Site Mutants of the β -1,4-Xylanase pXyl from *Pseudoaltermonas haloplanktis* TAH3a in Complex with Substrate and Product. *Biochemistry*, 45(15), 4797-4807. <https://doi.org/10.1021/bi052193e>
- Fujii, K., Minagawa, H., Terada, Y., Takaha, T., Kuriki, T., Shimada, J., & Kaneko, H. (2007). Function of second glucan binding site including tyrosines 54 and 101 in *Thermus aquaticus* amyloamylase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(2), 167-173. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.167>
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Hill, A., Karboune, S., Narwani, T. J., & de Brevern, A. G. (2020). Investigating the Product Profiles and Structural Relationships of New Levansucrases with Conventional and Non-Conventional Substrates. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15). <https://doi.org/10.3390/ijms21155402>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33-38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Kirschner, K. N., Yongye, A. B., Tschampel, S. M., González-Outeiriño, J., Daniels, C. R., FOLEY, B. L., & WOODS, R. J. (2008). GLYCAM06: A Generalizable Biomolecular Force Field. Carbohydrates. *Journal of computational chemistry*, 29(4), 622-655. <https://doi.org/10.1002/jcc.20820>
- Koropatkin, N. M., & Smith, T. J. (2010). SusG: A Unique Cell-Membrane-Associated α -Amylase from a Prominent Human Gut Symbiont Targets Complex Starch Molecules. *Structure*, 18(2), 200-215. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.12.010>
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabijns, A., & Van den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: Functional implications. *Journal of Experimental Botany*, 60(3), 727-740. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern333>
- Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F., & Xiao, M. (2010). Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresource Technology*, 101(14), 5528-5533. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.151>
- Ludwiczek, M. L., Heller, M., Kantner, T., & McIntosh, L. P. (2007). A Secondary Xylan-binding Site Enhances the Catalytic Activity of a Single-domain Family 11 Glycoside Hydrolase. *Journal of Molecular Biology*, 373(2), 337-354. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.07.057>
- Martínez-Fleites, C., Ortíz-Lombardía, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E. J., Arrieta, J. G., Hernández, L., & Davies, G. J. (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochemical Journal*, 390(Pt 1), 19-27. <https://doi.org/10.1042/BJ20050324>
- Masso, M., & Vaisman, I. I. (2010). AUTO-MUTE: Web-based tools for predicting stability changes in proteins due to single amino acid replacements. *Protein Engineering, Design and Selection*, 23(8), 683-687. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq042>

- Méndez-Lorenzo, L., Porras-Domínguez, J. R., Raga-Carbajal, E., Olvera, C., Rodríguez-Alegría, M. E., Carrillo-Nava, E., Costas, M., & López Munguía, A. (2015). Intrinsic Levanase Activity of *Bacillus subtilis* 168 Levansucrase (SacB). *PLoS ONE*, *10*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143394>
- Meng, G., & Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural & Molecular Biology*, *10*(11), 935-941. <https://doi.org/10.1038/nsb974>
- Meng, G., & Fütterer, K. (2008). Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Structural Biology*, *8*, 16. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-8-16>
- Meng y Fütterer—2003—Structural framework of fructosyl transfer in *Baci.pdf*. (s. f.). Recuperado 1 de abril de 2019, de <https://www.nature.com/articles/nsb974.pdf>
- Molina, M., Moulis, C., Monties, N., Guieysse, D., Morel, S., Cioci, G., & Remaud-Simeon, M. (2020). A specific oligosaccharide-binding site in alternansucrase catalytic domain mediates alternan elongation. *Journal of Biological Chemistry*, *jbc.RA120.013028*. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013028>
- Moulis, C., Joucla, G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., & Remaud-Simeon, M. (2006). Understanding the Polymerization Mechanism of Glycoside-Hydrolase Family 70 Glucansucrases*. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(42), 31254-31267. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84038-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84038-3)
- Naumoff, D. G. (2001). β -Fructosidase superfamily: Homology with some α -L-arabinases and β -D-xylosidases. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *42*(1), 66-76. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20010101\)42:1<66::AID-PROT70>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20010101)42:1<66::AID-PROT70>3.0.CO;2-4)
- Nielsen, J. W., Kramhøft, B., Bozonnet, S., Abou Hachem, M., Stipp, S. L. S., Svensson, B., & Willemoës, M. (2012). Degradation of the starch components amylopectin and amylose by barley α -amylase 1: Role of surface binding site 2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *528*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.08.005>
- Olvera, C., Centeno-Leija, S., Ruiz-Leyva, P., & López-Munguía, A. (2012). Design of Chimeric Levansucrases with Improved Transglycosylation Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(6), 1820-1825. <https://doi.org/10.1128/AEM.07222-11>
- Ortiz-Soto, M. E., Ertl, J., Mut, J., Adelman, J., Le, T. A., Shan, J., Teßmar, J., Schlosser, A., Engels, B., & Seibel, J. (2018). Product-oriented chemical surface modification of a levansucrase (SacB) via an ene-type reaction. *Chemical Science*, *9*(24), 5312-5321. <https://doi.org/10.1039/C8SC01244J>
- Ortiz-Soto, M. E., Porras-Domínguez, J. R., Rodríguez-Alegría, M. E., Morales-Moreno, L. A., Díaz-Vilchis, A., Rudiño-Piñera, E., Beltrán-Hernández, N. E., Rivera, H. M., Seibel, J., & López Munguía, A. (2020). Implications of the mutation S164A on *Bacillus subtilis* levansucrase product specificity and insights into protein interactions acting upon levan synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *161*, 898-908. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.114>
- Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñera, E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering, Design and Selection*, *21*(10), 589-595. <https://doi.org/10.1093/protein/gzn036>
- Osorio, M. I., Zúñiga, M. A., Mendoza, F., Jaña, G. A., & Jiménez, V. A. (2019). Modulation of glucan-enzyme interactions by domain V in GTF-SI from *Streptococcus mutans*. *Proteins*, *87*(1), 74-80. <https://doi.org/10.1002/prot.25624>
- Ozimek, L. K., Kralj, S., van der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyze processive and non-processive

- transglycosylation reactions. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 4), 1187-1196. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28484-0>
- Parthiban, V., Gromiha, M. M., & Schomburg, D. (2006). CUPSAT: Prediction of protein stability upon point mutations. *Nucleic Acids Research*, 34(WEB. SERV. ISS.), W239-W242. Scopus. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl190>
- Polsinelli, I., Caliendo, R., Demitri, N., & Benini, S. (2020). The structure of sucrose-soaked levansucrase crystals from *Erwinia tasmaniensis* reveals a binding pocket for levanbiose. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). Scopus. <https://doi.org/10.3390/ijms21010083>
- Polsinelli, Ivan, Caliendo, R., Salomone-Stagni, M., Demitri, N., Rejzek, M., Field, R. A., & Benini, S. (2019). Comparison of the Levansucrase from the epiphyte *Erwinia tasmaniensis* vs its homologue from the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 496-501. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.074>
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Miranda-Molina, A., Rodríguez-Alegría, M. E., & Munguía, A. L. (2015). *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 132, 338-344. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.056>
- Raga Carbajal, E., & Olvera Carranza, C. (2019). *Estudios del mecanismo de elongación de levadas de SacB de Bacillus Subtilis*. Tesis de maestría, UNAM
- Raga-Carbajal, E., Carrillo-Nava, E., Costas, M., Porras-Dominguez, J., López-Munguía, A., & Olvera, C. (2016). Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Glycobiology*, 26(4), 377-385. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv112>
- Raga-Carbajal, E., Díaz-Vilchis, A., Rojas-Trejo, S. P., Rudiño-Piñera, E., & Olvera, C. (2021). The molecular basis of the nonprocessive elongation mechanism in levansucrases. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100178. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015853>
- Rathsam, C., Giffard, P. M., & Jacques, N. A. (1993). The cell-bound fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*: The carboxyl terminus specifies attachment in a *Streptococcus gordonii* model system. *Journal of Bacteriology*, 175(14), 4520-4527.
- Roy, K. L., Lammens, W., Verhaest, M., Coninck, B. D., Rabijs, A., Laere, A. V., & Ende, W. V. den. (2007). Unraveling the Difference between Invertases and Fructan Exohydrolases: A Single Amino Acid (Asp-239) Substitution Transforms Arabidopsis Cell Wall Invertase1 into a Fructan 1-Exohydrolase. *Plant Physiology*, 145(3), 616-625. <https://doi.org/10.1104/pp.107.105049>
- Sato, Y., & Kuramitsu, H. K. (1988). Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* scrB gene. *Infection and Immunity*, 56(8), 1956-1960.
- Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F., & Serrano, L. (2005). The FoldX web server: An online force field. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server issue), W382-W388. <https://doi.org/10.1093/nar/gki387>
- Seibel, J., Beine, R., Moraru, R., Behringer, C., & Buchholz, K. (2006). A new pathway for the synthesis of oligosaccharides by the use of non-Leloir glycosyltransferases. *Biocatalysis & Biotransformation*, 24(1/2), 157-165. <https://doi.org/10.1080/10242420500538274>
- Sezer, A. D., Kazak, H., Öner, E. T., & Akbuğa, J. (2011). Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: Optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 358-363. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.046>
- Skov, L. K., Mirza, O., Sprogøe, D., Dar, I., Remaud-Simeon, M., Albenne, C., Monsan, P., & Gajhede, M. (2002). Oligosaccharide and Sucrose Complexes of Amylosucrase STRUCTURAL IMPLICATIONS FOR THE POLYMERASE ACTIVITY. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47741-47747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207860200>

- Song, D. D., & Jacques, N. A. (1999). *Mutation of aspartic acid residues in the fructosyltransferase of Streptococcus salivarius ATCC 25975*. 6.
- Stivala, A., Wybrow, M., Wirth, A., Whisstock, J. C., & Stuckey, P. J. (2011). Automatic generation of protein structure cartoons with Pro-origami. *Bioinformatics*, 27(23), 3315-3316. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr575>
- Vijn, I., & Smeekens, S. (1999). Fructan: More Than a Reserve Carbohydrate? *Plant Physiology*, 120(2), 351-360. <https://doi.org/10.1104/pp.120.2.351>
- Xia, Y., Chu, W., Qi, Q., & Xun, L. (2015). New insights into the QuikChange™ process guide the use of Phusion DNA polymerase for site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Research*, 43(2), e12. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1189>
- Xu, W., Peng, J., Zhang, W., Zhang, T., Guang, C., & Mu, W. (2019). Enhancement of the *Brenneria* sp. Levansucrase thermostability by site-directed mutagenesis at Glu404 located at the “-TEAP-” residue motif. *Journal of Biotechnology*, 290, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.11.021>
- Yanase, H., Maeda, M., Hagiwara, E., Yagi, H., Taniguchi, K., & Okamoto, K. (2002). Identification of Functionally Important Amino Acid Residues in *Zymomonas mobilis* Levansucrase. *The Journal of Biochemistry*, 132(4), 565-572. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003258>
- Yang, Y., Zhao, X., Le, M. H. A., Zijlstra, R. T., & Gänzle, M. G. (2015). Reutericyclin producing *Lactobacillus reuteri* modulates development of fecal microbiota in weanling pigs. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00762>