



Instituto de Biotecnología  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Identificación de la zona mínima funcional de la región de transición  
responsable en la actividad transferasa y procesividad de la  
levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*

**TESIS**

Que para obtener el título de:

Bióloga

**PRESENTA:**

Maura Jennifer Martínez Morales

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dra. Clarita Olvera Carranza



Ciudad de México 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Polímeros Biocompatibles y Nanotecnología adscrito al Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Clarita Olvera Carranza.

El proyecto fue financiado por la Universidad Nacional Autónoma de México por el programa DGAPA-PAPIIT a través del proyecto IN216120 y de la beca No. 096421.

## Dedicatoria

A mi familia

A mi madre, por el ser el pilar más importante, por apoyarme en todo momento y motivarme a estudiar lo que más me apasiona. Gracias por guiarme, brindarme experiencia, felicidad y amor.

A mis hermanos por ser parte importante en mi vida, gracias por su paciencia, cariño y por compartir conmigo los buenos y malos momentos.

A Alid, por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles, por animarme día con día a cumplir juntos nuestras metas y sobre todo por su paciencia y amor incondicional. Gracias por permitirme formar un futuro a tu lado. Con todo mi amor para ti.

A Zaida y Abel por su comprensión, paciencia y apoyo, ya que sin ellos el camino habría sido más difícil.

## Agradecimientos

Con mucho cariño a la Dra. Clarita Olvera Carranza por todo su apoyo académico y personal, por sus enseñanzas, ideas y orientación para llevar a cabo este trabajo. Gracias por la confianza brindada durante este camino y por darme todo el apoyo y motivación para seguir cumpliendo mis metas.

A la Dra. Marcela Ayala Aceves y su grupo de trabajo, por todas sus aportaciones, ideas y apoyo brindado.

A la Biol. Rosa Román Miranda por su orientación, tiempo y ayuda técnica para lograr la purificación de proteínas.

Al Dr. Enrique Raga Carbajal por su ayuda en la identificación de FOS.

A mis compañeros del grupo polímeros biocompatibles, a Karla, Flor, Salvador, Gerardo, Raymundo, Enrique, Ingrid y Jorge por todos sus comentarios e ideas aportadas a este trabajo. Gracias por compartir los logros y frustraciones en el laboratorio y por los buenos momentos fuera de él.

A la Dra. María Isabel Soto Cruz y al Dr. Axel Christian Jardon Luviano por sus valiosas aportaciones y comentarios a este trabajo.

Al Dr. Octavio Reyes Hernández, a la Dra. Yolanda Córdova Galavíz y a la M. María Cristina Alvarado Domínguez, por ser parte de mi formación profesional, por todo el conocimiento brindado y por todas sus aportaciones, apoyo y motivación para llevar a cabo mi trabajo de tesis en el área de las enzimas.

Gracias infinitas a la asociación Olvera-Treviño por todo su apoyo, ya que sin él este trabajo no se hubiera completado.

# Índice

Dedicatoria.....	3
Agradecimientos .....	4
Índice .....	5
Índice de figuras .....	8
Índice de tablas .....	10
Abreviaturas.....	11
Resumen .....	13
Introducción.....	14
<b>1 Fructansacararas .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Arquitectura de las fructansacararas .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Estructura de las fructansacararas multidominio.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3 Mecanismo molecular.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Subsitios de unión a sustrato-aceptor de las FNs .....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Mecanismo de elongación .....</b>	<b>23</b>
<b>1.6 Levansacararas multidominio presentes en la naturaleza .....</b>	<b>24</b>
<b>1.7 Glucansacararas multidominio .....</b>	<b>27</b>
<b>1.8 Fructansacarasa LevS de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>1.9 Región de transición de LevS.....</b>	<b>30</b>
<b>2 Antecedentes .....</b>	<b>32</b>
<b>3 Planteamiento del problema .....</b>	<b>35</b>
<b>4 Justificación .....</b>	<b>35</b>
<b>5 Hipótesis.....</b>	<b>35</b>
<b>6 Objetivos .....</b>	<b>36</b>
<b>6.1 Objetivo general .....</b>	<b>36</b>
<b>6.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>36</b>
<b>7 Estrategia experimental.....</b>	<b>37</b>
<b>8 Materiales y métodos.....</b>	<b>38</b>
<b>8.1 Cepas y medios de cultivo utilizados.....</b>	<b>38</b>
<b>8.1.1 Cepas utilizadas.....</b>	<b>38</b>
<b>8.1.2 Preparación de células electrocompetentes.....</b>	<b>38</b>

8.2	Técnicas de análisis computacionales .....	40
8.2.1	Análisis <i>in silico</i> y predicción del plegamiento de la región de transición .....	40
8.2.2	Análisis y evaluación de los modelos obtenidos .....	40
8.2.3	Análisis de la posible interacción entre residuos de la región de transición .....	40
8.3	Construcción de las versiones truncadas .....	41
8.3.1	Diseño de oligonucleótidos .....	41
8.3.2	Amplificación de las versiones truncadas .....	41
8.3.3	Electroforesis de ácidos nucleicos .....	45
8.3.4	Producción y purificación de ADN plasmídico .....	45
8.3.5	Digestión enzimas de restricción .....	46
8.3.6	Análisis de la secuencia de construcciones .....	46
8.4	Expresión heteróloga de las versiones truncadas .....	47
8.4.1	Transformación en <i>E. coli</i> BL21 .....	47
8.4.2	Extracción de proteínas por lisis celular .....	47
8.5	Purificación versiones truncadas .....	48
8.5.1	Cuantificación de proteínas .....	49
8.5.2	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes .....	49
8.5.3	Tinción con Azul de Coomassie .....	50
8.5.4	Concentración de proteínas .....	50
8.5.5	Zimograma de las versiones truncadas puras .....	50
8.6	Caracterización enzimática .....	51
8.6.1	Ensayos actividad enzimática .....	51
8.6.2	Evaluación del pH óptimo de las versiones truncadas .....	52
8.6.3	Evaluación de la temperatura óptima de las versiones truncadas .....	52
8.7	Identificación y análisis de perfil de productos sintetizados por las versiones truncadas	53
8.7.1	Cromatografía en capa fina (TLC) .....	53
8.7.2	Análisis de polímero sintetizado .....	53
8.7.3	Análisis de FOS .....	53
8.8	Análisis de hidrólisis-transferencia .....	54
9	Resultados y discusión .....	55
9.1	Análisis <i>in silico</i> de la región de transición de la levansacarasa LevS de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	55

<b>9.2</b>	<b>Predicción del plegamiento de la región de transición de la levansacarasa LevS de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>9.3</b>	<b>Identificación de posibles módulos de unión a carbohidrato presentes en la región de transición de la levansacarasa LevS de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>9.4</b>	<b>Diseño de las versiones truncadas de la región de transición de la levansacarasa LevS.....</b>	<b>64</b>
<b>9.5</b>	<b>Construcción de las versiones truncadas.....</b>	<b>66</b>
<b>9.6</b>	<b>Expresión y purificación de las versiones truncadas .....</b>	<b>71</b>
<b>9.7</b>	<b>Estudio de la actividad de las versiones truncadas.....</b>	<b>74</b>
<b>9.8</b>	<b>Caracterización bioquímica de las versiones truncadas .....</b>	<b>74</b>
<b>9.9</b>	<b>Estabilidad de las versiones truncadas.....</b>	<b>77</b>
<b>9.10</b>	<b>Análisis cualitativo de las reacciones desarrolladas por las versiones truncadas .....</b>	<b>78</b>
<b>9.11</b>	<b>Análisis de la especificidad de las versiones truncadas hacia la reacción de hidrólisis y transferencia (H/T) .....</b>	<b>80</b>
<b>9.12</b>	<b>Producción de polímero de las versiones truncadas .....</b>	<b>83</b>
<b>9.13</b>	<b>Síntesis de FOS de las versiones truncadas .....</b>	<b>85</b>
<b>10</b>	<b>Especificidad de la reacción transferasa (productos de bajo y alto peso molecular).....</b>	<b>87</b>
<b>11</b>	<b>Conclusión .....</b>	<b>89</b>
<b>12</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>90</b>
<b>13</b>	<b>Referencias .....</b>	<b>91</b>



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Reacciones catalizadas por las fructansacararas (FNs). .....	15
<b>Figura 2.</b> Estructura química de las fructanas. ....	17
<b>Figura 3.</b> Arquitectura de fructansacararas bacterianas unidominio y multidominio. ....	18
<b>Figura 4.</b> Estructura cristalográfica de la inulosacarasa InuJ de <i>L. johnsonii</i> , donde se observa el plegamiento tipo $\beta$ –propela. ....	20
<b>Figura 5.</b> Mecanismo molecular de reacción de las fructansacararas. ....	21
<b>Figura 6.</b> Subsitios de unión a sustrato FNs. ....	23
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de elongación propuesto para las fructansacararas (FNs). ....	24
<b>Figura 8.</b> Arquitectura de las levansacararas multidominio reportadas .....	26
<b>Figura 9.</b> Arquitectura y estructura de la glucansacarasa GTF180- $\Delta$ N .....	28
<b>Figura 10.</b> Arquitectura de la levansacarasa multidominio LevS de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . ....	30
<b>Figura 11.</b> Análisis BLAST de la levansacarasa multidominio LevS de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> identificando los dominios de unión a glucano .....	31
<b>Figura 12.</b> Construcción de truncadas de la enzima multidominio LevS .....	32
<b>Figura 13.</b> Construcción de las enzimas truncadas y quimeras en el estudio del dominio C-terminal de enzimas multidominio .....	34
<b>Figura 14.</b> Vector pET - 22b(+)- $\Delta$ N85C utilizado como DNA molde en la amplificación por PCR. ....	42
<b>Figura 15.</b> Análisis in silico de los residuos presentes en la región de transición .....	56
<b>Figura 16.</b> Predicción estructura secundaria de la región de transición. ....	57
<b>Figura 17.</b> Modelos por homología de la región de transición obtenidos con distintos servidores. ....	59
<b>Figura 18.</b> Modelo de la región de transición realizado por I-tasser donde se observa un plegamiento tipo solenoide y sus estructuras secundarias. ....	62
<b>Figura 19.</b> Identificación de posibles CBMs .....	64
<b>Figura 20.</b> Posible estructura de la región de transición y arquitectura de las versiones truncadas construidas en este trabajo. ....	65
<b>Figura 21.</b> Construcción del plásmido que codifica para las versiones truncadas a partir del método tipo Quick-Change .....	67
<b>Figura 22.</b> Amplicon obtenido por la PCR de las construcciones que codifican para las versiones truncadas. ....	68
<b>Figura 23.</b> Vectores de las versiones truncadas. Sitios de restricción perdidos .....	69
<b>Figura 24.</b> Patrón de digestión de las versiones truncadas .....	70
<b>Figura 25.</b> Gel SDS-PAGE y Zimograma .....	72

<b>Figura 26.</b> Temperatura óptima de $\Delta$ N85C y versiones truncadas. Reacciones 1U/ml, 300rpm pH 6. Datos de $\Delta$ N85C determinados por Ramírez-Torres, 2019. ....	75
<b>Figura 27.</b> pH óptimo de $\Delta$ N85C y versiones truncadas. Reacciones 1U/ml, 300rpm 30°C. Datos de $\Delta$ N85C determinados por Ramírez-Torres, 2019. ....	76
<b>Figura 28.</b> Estabilidad de almacenamiento de $\Delta$ N85C y versiones truncadas. Reacciones 1U/ml, 30°C 300rpm. ....	78
<b>Figura 29.</b> Análisis cualitativo de las reacciones desarrolladas por las versiones truncadas. Reacciones 1U/ml, 30°C 300rpm .....	79
<b>Figura 30.</b> Consumo de sustrato a través del tiempo de las versiones truncadas.....	80
<b>Figura 31.</b> Relación H-T de las versiones truncadas.. ....	81
<b>Figura 32.</b> Relación H-T y consumo de sustrato de la enzima LevS N70 Cat.. ....	82
<b>Figura 33.</b> Producción de polímero de las versiones truncadas al 80% de conversión de sustrato.....	83
<b>Figura 34.</b> Cinética de reacción de la producción de polímero de las versiones truncadas	85
<b>Figura 35.</b> Análisis de FOS sintetizados por $\Delta$ N85C y versiones truncadas.....	86
<b>Figura 36.</b> Versiones truncadas de la región de transición de LevS	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Compendio de las propiedades bioquímicas y cinéticas, así como las especificidades de las levansacarosas multidominio hasta ahora reportadas .....	25
<b>Tabla 2.</b> Composición de medio YENB. ....	38
<b>Tabla 3.</b> Composición de medio LB.....	39
<b>Tabla 4.</b> Composición de medio SOC. ....	39
<b>Tabla 5.</b> Diseño de oligonucleótidos para la construcción de versiones truncadas. ....	41
<b>Tabla 6.</b> Concentraciones de reactivos utilizadas en la reacción PCR para la versión truncada LevS N70 Cat. ....	43
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de los ciclos en la reacción de PCR para la versión truncada LevS N70 Cat. ....	43
<b>Tabla 8.</b> Concentraciones de reactivos utilizadas en la reacción PCR para la versión truncada LevS N70 Tn77 Vent. ....	44
<b>Tabla 9.</b> Condiciones de los ciclos en la reacción de PCR para la versión truncada LevS N70 Tn77.....	45
<b>Tabla 10.</b> Análisis en PROCHECK de los modelos generados. Se muestran los servidores utilizados en el modelamiento por homología, seguido del análisis de Ramachandran, ángulo y longitud de enlace. ....	60
<b>Tabla 11.</b> Tablas de rendimiento de las enzimas purificadas.....	73
<b>Tabla 12.</b> Actividad enzimática de las versiones truncadas.....	74
<b>Tabla 13.</b> Análisis de actividad hidrolítica y polímeros sintetizados por $\Delta$ N85C y versiones truncadas.....	88

## Abreviaturas

<b>Å</b>	Ångstrom (longitud)
<b>Aa</b>	Aminoácidos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APM</b>	Alto peso molecular
<b>BPM</b>	Bajo peso molecular
<b>BSA</b>	Ácido bicinconínico
<b>CBM</b>	Módulo de unión a carbohidratos
<b>DNS</b>	Ácido-3,5-dinitrosalicílico
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
<b>FNs</b>	Fructansacarosas
<b>FOS</b>	Fructooligosacáridos
<b>Gly</b>	Glicina
<b>GNs</b>	Glucansacarosas
<b>GP</b>	Grado de polimerización
<b>HPAEC-PAD</b>	Cromatografía de intercambio aniónico con detector de pulso amperométrico.
<b>HPLC-SEC</b>	Cromatografía de exclusión molecular
<b>H-T</b>	Hidrólisis- transferencia
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>mA</b>	Miliamperios
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>PAPM</b>	Polímero de alto peso molecular
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pCBMs</b>	Posibles módulos de unión a carbohidratos
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas

<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PSVS</b>	Servidor de validación de estructuras proteicas
<b>RMN</b>	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>Tn</b>	Región de transición
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>UV</b>	Radiación ultravioleta
<b>WT</b>	Wild type (Silvestre)

## Resumen

La levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides* es una fructansacarasa multidominio perteneciente a la familia GH68 de las glicosilhidrolasas, la cual, sintetiza polímeros de fructosas denominados fructanas. Se ha propuesto que la región de transición de esta enzima participa en la actividad transferasa y en la síntesis de polímeros a partir de un mecanismo procesivo. Con el propósito de estudiar esta región y conocer si existe una región mínima suficiente, se diseñaron y caracterizaron versiones truncadas. Para lograr los objetivos de este trabajo se realizó un análisis *in silico* de dicha región, así como el diseño y construcción de versiones truncadas, además, se llevó a cabo la caracterización de estas, en la cual, se incluyó la determinación de pH, temperatura óptima y estabilidad. Por último, se analizó su actividad y perfil de productos.

A partir de los análisis *in silico*, se encontró que esta región presenta un posible plegamiento solenoide, en el cual, se identificaron 4 posibles bolsillos hidrofóbicos (pCBMs). Con base en estos hallazgos se construyeron versiones truncadas a las cuales se les removió gradualmente estos pCBMs. Con nuestro trabajo fue posible demostrar que la remoción de los pCBMs III y IV no afectó las propiedades enzimáticas de LevS, sin embargo, si fue posible revelar que los pCBMs I y II participan en la estabilidad, velocidad enzimática, actividad transferasa y síntesis de polímeros. Sorprendentemente, no se encontró que la región de transición participara en la procesividad de la enzima, pues aún en su ausencia, la enzima fue capaz de sintetizar productos de alto peso molecular. Estos resultados permitieron determinar que la región mínima funcional de la región de transición está compuesta por los primeros 77 aminoácidos en los que se incluyen los pCBMs I y II.

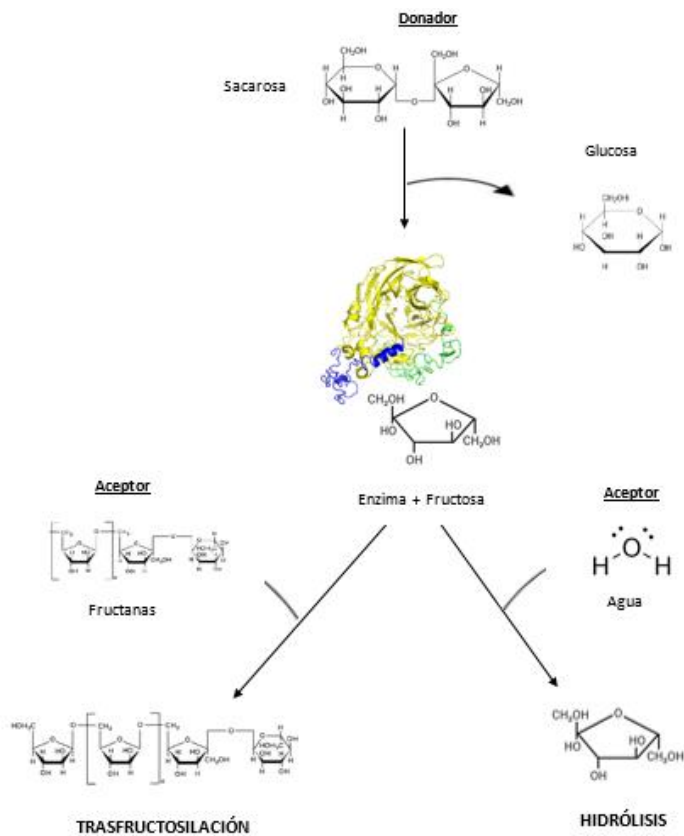
## Introducción

Las fructansacarosas (FNs) son enzimas que catalizan la transferencia de residuos fructosilos de una molécula de sacarosa, utilizada como sustrato, para llevar a cabo la síntesis de polímeros de fructosas denominados fructanas. Dependiendo de su grado de polimerización (GP) las fructanas se clasifican en: fructooligosacáridos (FOS) que presentan un GP menor a 10 unidades de fructosa y fructanas que presentan un GP mayor a 10. Asimismo, estos polímeros dependiendo del tipo de enlace glicosídico que une a las fructosas, pueden clasificarse en inulinas cuando el enlace es  $\beta$ -2,1 y levanas cuando su enlace es  $\beta$ -2,6. Las FNs pueden clasificarse de acuerdo con el tipo de fructanas que sintetizan, en levansacarosas que producen levanas y en inulosacarosas que son capaces de producir inulina. Además, dependiendo de su arquitectura las FNs pueden dividirse en enzimas unidominio y multidominio. Las enzimas multidominio presentan, además del dominio catalítico, dominios adicionales en las regiones N- y C- terminales. La función de dichos dominios ha sido estudiada a partir del diseño de versiones truncadas las cuales carecen de alguna de dichas regiones. Recientemente en la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides* se demostró que existe una región mínima suficiente dentro de la región N- terminal, la cual permite mantener funciones similares a las de la enzima silvestre. Es por lo que surge el interés de conocer si existen regiones mínimas en los demás dominios adicionales.

Trabajos en el grupo de investigación han demostrado que entre el dominio catalítico y dominio C-terminal de LevS existe una zona involucrada en la procesividad y actividad transferasa, la cual fue denominada región de transición. El presente trabajo busca determinar la zona mínima funcional de la región de transición de LevS a través del estudio de sus características estructurales, así como la construcción y caracterización de versiones truncadas en esta región. De modo que los resultados obtenidos contribuyan a la elucidación de los mecanismos moleculares a través de los cuales esta enzima realiza la síntesis de levana, un polímero con gran interés industrial.

# 1 Fructansacararas

Las fructansacararas (FNs) son enzimas capaces de sintetizar cadenas de fructosa conocidas como fructanas, para ello catalizan la transferencia de residuos fructosilos de una molécula donadora que generalmente es sacarosa, a moléculas aceptoras (Dedonder, 1966). En presencia de sacarosa, estas enzimas catalizan dos tipos de reacciones (Figura 1): 1) la reacción de transfructosilación, cuando la fructosa de la molécula donadora es transferida a una molécula de sacarosa iniciadora o a una cadena de fructanas en crecimiento y 2) la reacción de hidrólisis que ocurre cuando una molécula de agua actúa como aceptor del residuo fructosilo, liberando glucosa y fructosa al medio (Hestrin *et al.*, 1956; Bealing & Bacon, 1953). Estas reacciones se llevan a cabo sin necesidad de cofactores, ya que la energía requerida para la reacción es proporcionada por la hidrólisis del enlace glicosídico del sustrato (Chambert & Gonzy, 1976).



**Figura 1.** Reacciones catalizadas por las fructansacararas (FNs) (Modificado de Raga-Carbajal, 2019).

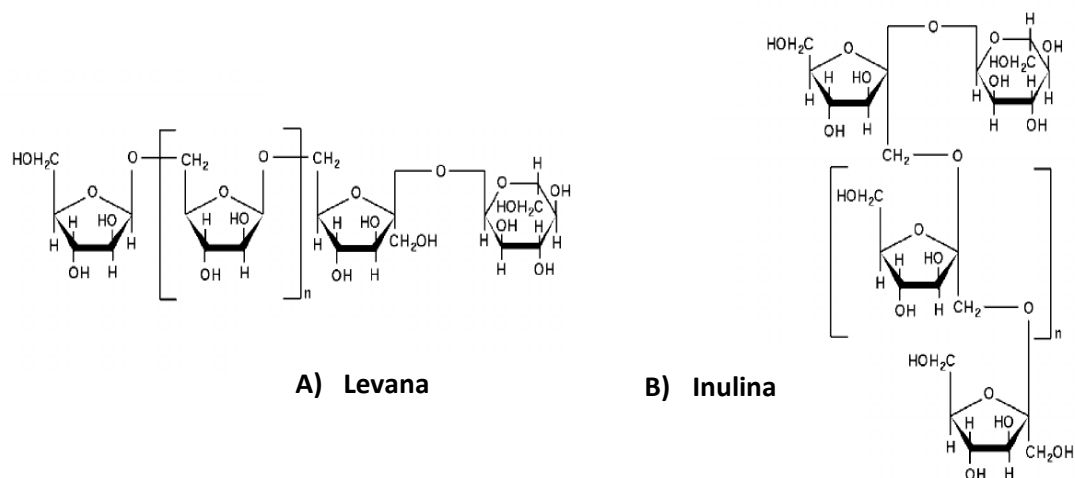


Las fructanas sintetizadas por las fructansacarosas, son polisacáridos de fructosa unidos por enlaces glicosídicos que presentan una molécula de sacarosa inicial, que pueden ser clasificadas con base en su tamaño, cuando presentan un grado de polimerización (GP) mayor a 10 unidades reciben el nombre de polisacáridos o fructana y si presentan un GP menor a 10 se denominan fructooligosacáridos o FOS (Niness, 1999; Velázquez-Hernández *et al.*, 2009). Además, se pueden clasificar de acuerdo al tipo de enlace glicosídico que une a las fructosas (Figura 2), si se encuentran unidas por enlaces  $\beta$  (2-6) en la cadena principal y con ramificaciones  $\beta$  (2-1) se les denomina levana, por lo cual, las enzimas que las sintetizan se conocen como levansacarosas, mientras que, cuando se encuentran unidas por enlaces  $\beta$  (2-1) en la cadena principal y con ramificaciones  $\beta$  (2-6) se denominan inulina, siendo las inulosacarosas las enzimas responsables de su síntesis (Dedonder, 1966; French, 1988, 1989; Vijn & Smeekens, 1999).

Las fructanas son producidas por plantas, hongos y bacterias, donde cumplen diferentes funciones de acuerdo con su naturaleza (Van Arkel *et al.*, 2013). Las fructanas de origen fúngico y vegetal actúan como reservorio energético e influyen en la protección contra desecación y salinidad, asimismo mejoran la tolerancia contra el frío (Sprenger *et al.*, 1995; Ritsema & Smeekens, 2003). Por otro lado, las fructanas de origen bacteriano se asocian con la adhesión y comunicación celular a partir de la formación de biopelículas, además participan en la protección contra la deshidratación, asimilación de nutrientes y en el caso de algunos microorganismos patógenos, actúan como una barrera que ayuda contra el reconocimiento del huésped (Olvera *et al.*, 2007; Velázquez-Hernández *et al.*, 2009).

Las fructanas poseen interesantes propiedades como emulsificantes, espesantes, antitumorales, inmunomoduladores, prebióticos, texturizantes y estabilizantes, por lo cual representan un gran interés en diferentes ramas de la industria (Fuchs, 1991; Tungland, 2003). Su actividad antitumoral promueve la apoptosis de células cancerígenas e inhibe su proliferación, por otro lado, su actividad inmunomoduladora favorece la actividad mitogénica y activación de macrófagos, incluida la fagocitosis (Xu *et al.*, 2016; Sarilmise & Oner, 2014; Chandrashekar *et al.*, 2011). Las fructanas se han empleado en la industria alimenticia como sustitutos de grasas y azúcares, así como aditivos en yogurts. Por otro

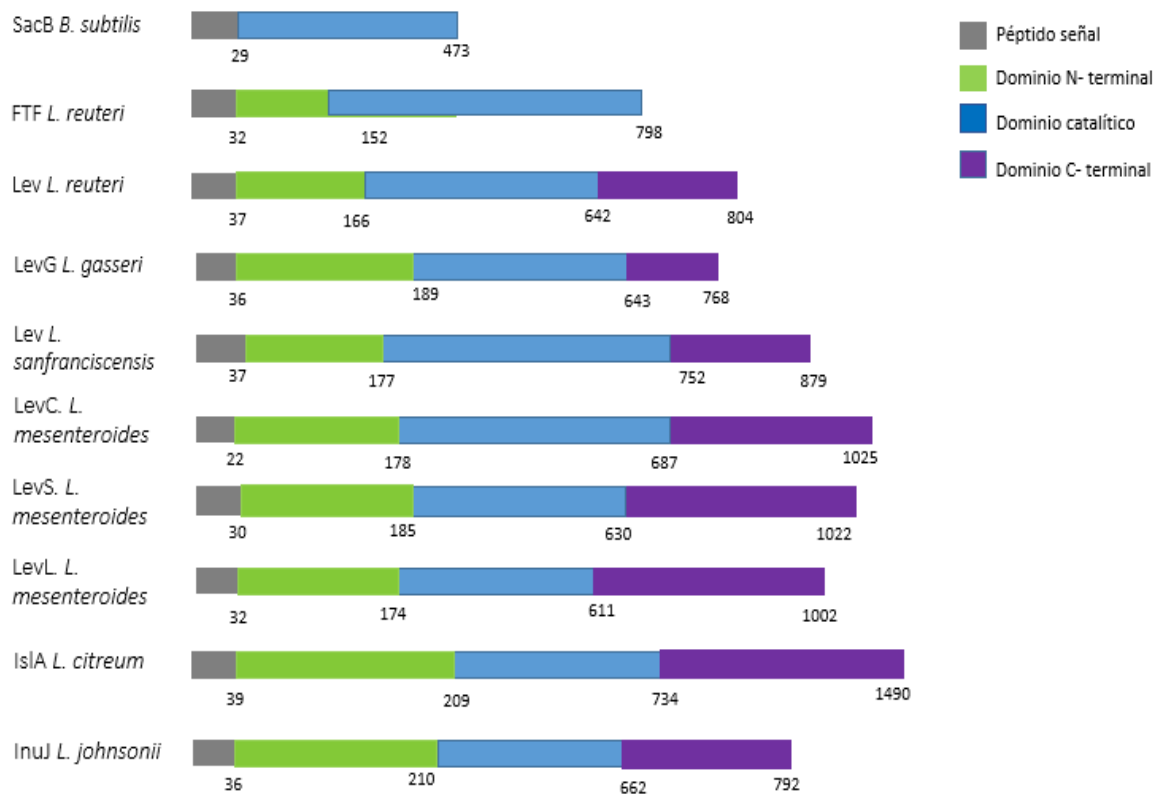
lado, en la industria farmacéutica y cosmética se han utilizado como agente encapsulador y nanoacarreadores de fragancias, sistema de liberación de fármacos, adyuvantes de vacunas y estabilizador de proteínas (Gibson & Roberfroid, 1995; Hidaka *et al.*, 1986, Jiménez-Sánchez *et al.*, 2019). Estos polímeros tienen un amplio potencial biotecnológico por lo que es de gran interés el estudio de las enzimas capaces de sintetizarlos, con el fin de desarrollar procesos controlados para su producción.



**Figura 2.** Estructura química de las fructanas: A) Levana con enlace  $\beta$  (2-6) y B) Inulina con enlace  $\beta$  (2-1) (Dušek, 2002).

### 1.1 Arquitectura de las fructansacarasas

Las fructansacarasas bacterianas de acuerdo con su arquitectura pueden clasificarse en dos grandes grupos: enzimas unidominio y multidominio (Figura 3). En general, las FNs provenientes de bacterias Gramnegativas presentan un único dominio y tienen un peso molecular que oscila entre 45 y 64 kDa (Olvera *et al.*, 2007). Por otro lado, la mayoría de las FNs provenientes de bacterias Grampositivas presentan una estructura multidominio, alcanzando pesos moleculares de 170 kDa, sin embargo, las FNs de los géneros *Bacillus* y *Streptococcus* son una excepción, pues a pesar de formar parte de las Gram positivas presentan un único dominio (Van Hijum *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 1990; Shiroza *et al.*, 1988).



**Figura 3.** Arquitectura de fructansacarosas bacterianas unidominio y multidominio (Modificado de Martínez-Bahena, 2019).

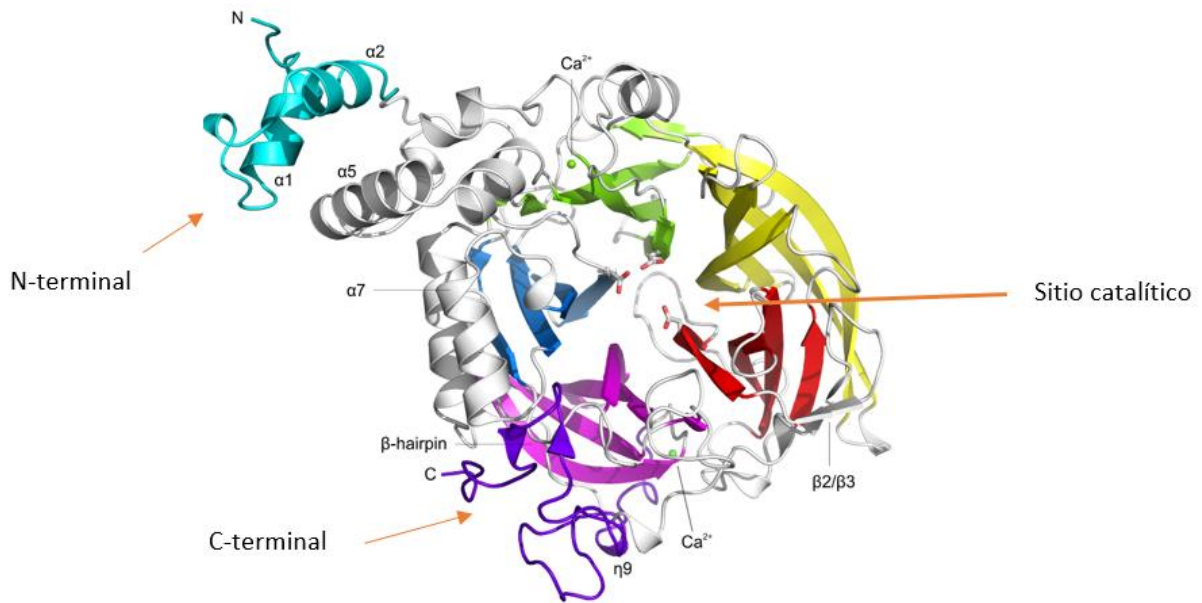
Las enzimas unidominio están constituidas únicamente por el dominio catalítico, mientras que las enzimas multidominio, además de éste cuentan con dominios adicionales en las regiones N- y C- terminal (Van Hijum *et al.*, 2006). Debido a que las FNs son enzimas extracelulares, estas cuentan con un péptido señal de aproximadamente 30 aminoácidos ubicado en su dominio N-terminal, el cual es responsable de que las enzimas puedan ser exportadas al exterior de la célula a partir de un sistema de secreción de dos pasos (Steinmetz, 1985). Seguido del péptido señal dentro del dominio N-terminal se encuentra la región variable cuya longitud y secuencia difiere entre las FNs (Van Hijum *et al.*, 2006). Recientemente, se ha demostrado que esta región está involucrada en la producción de polímero de alto peso molecular, es decir, en la procesividad de la enzima (Martínez-Bahena, 2019). Posterior al dominio N- terminal se encuentra el dominio catalítico, el cual

tiene una longitud cercana a los 500 aminoácidos y presenta tres residuos catalíticos altamente conservados en las FNs, dos residuos de ácido aspártico y un glutámico (Meng & Fütterer, 2003).

Por último, el dominio C-terminal tiene una longitud aproximada de 500 aminoácidos, dentro de los cuales se encuentra un motivo LPXTG que está involucrado en el anclaje a pared celular y presenta una región hidrofóbica con secuencias repetidas PXX, rica en glicina y prolina similar al de las proteínas de unión a glucano (Song *et al.*, 1998). Se ha demostrado que participa en la accesibilidad de moléculas al sitio activo, estabilidad y especificidad enzimática, así como al anclaje a la pared celular mediante enlaces covalentes (Rathsam, 1993; Ollivares- Illana *et al.*, 2003; Tieking *et al.*, 2005).

## 1.2 Estructura de las fructansacarosas multidominio

Las FNs bacterianas debido a su arquitectura y actividad han sido clasificadas dentro de la familia 68 de las glicosilhidrolasas (GH68). Hasta el momento, la única estructura cristalográfica reportada es la estructura de la inulosacarasa InuJ de *L. johnsonii* que comprende 33 residuos del dominio N-terminal, 453 del dominio catalítico y 45 del dominio C-terminal, esto debido a que dos dominios se encuentran truncados, de manera que, 139 residuos del dominio N-terminal y 89 del C-terminal no son observados en la cristalografía. La estructura de InuJ muestra un plegamiento conservado dentro de las GH68 de tipo  $\beta$ -propela de 5 hojas con una topología clásica en forma de "W" de 4 hebras  $\beta$ -antiparalelas, que genera una cavidad en forma de embudo con carga negativa (Figura 4) (Meng & Fütterer, 2003; Martínez-Fleites *et al.*, 2005). Dentro de esta cavidad se encuentran los 3 residuos catalíticos: dos residuos aspárticos y un glutámico que actúan como nucleófilo, estabilizador del estado de transición y catalizador ácido/base general, respectivamente; en conjunto estos residuos se denominan "triada catalítica" (Pijning *et al.*, 2011; Ozimek *et al.*, 2006).



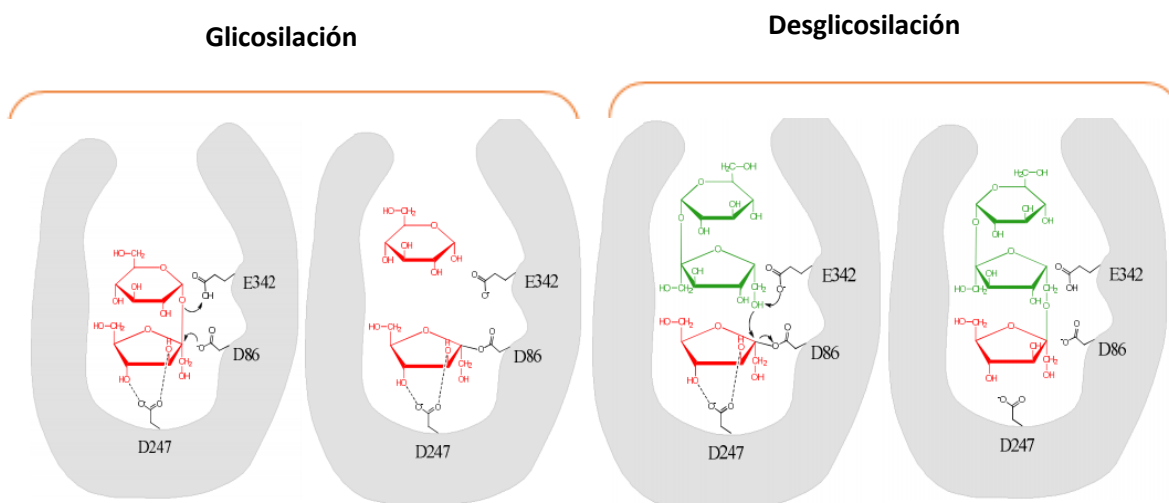
**Figura 4.** Estructura cristalográfica de la inulosacarasa InuJ de *L. johnsonii*, donde se observa el plegamiento tipo  $\beta$ -propela. En azul observamos el dominio N-terminal, en morado el C-terminal y en el centro la triada catalítica, así como el dominio catalítico (Pijning *et al.*, 2011).

Además, la estructura cristalográfica de InuJ reveló que sus dominios N y C-terminales truncados están lejos del sitio activo, por lo tanto, es poco probable que sean críticos para la transfructosilación en esta enzima. Por lo tanto, las observaciones estructurales apoyan la hipótesis de que los dominios N y C-terminal de las FNs bacterianas no son esenciales para la transfructosilación (Meng & Futterer, 2003; Pijning *et al.*, 2011).

### 1.3 Mecanismo molecular

El mecanismo molecular general de las FNs se ajusta a un modelo de dos pasos, glicosilación y desglicosilación, que involucra la formación de un intermediario covalente fructosil-enzima y su posterior intercepción por un aceptor (Figura 5). Al inicio de la reacción se lleva a cabo la *glicosilación* en donde el sustrato se acerca al sitio catalítico de la enzima y un

residuo aspártico conservado actúa como nucleófilo y realiza un ataque nucleofílico al carbono anomérico (C2) del residuo fructosilo de la sacarosa. Posteriormente, un residuo glutámico ácido/base, actúa como ácido y transfiere un protón al oxígeno del enlace glicosídico de la sacarosa, liberando la glucosa al medio de reacción, generándose así, el intermediario covalente fructosil-enzima, el cual es estabilizado por un residuo aspártico a partir de puentes de hidrógeno. En la segunda fase se lleva a cabo la *desglicosilación*, proceso en el cual el residuo glutámico ácido/base ahora actúa como base y remueve un hidrógeno de la molécula aceptora, dando lugar a un anión altamente reactivo que realiza un segundo ataque nucleofílico sobre el C2 del residuo fructosilo del complejo fructosil-enzima, provocando la desestabilización del intermediario y formándose un complejo fructosil-aceptor que posteriormente es liberado al medio de reacción (Chambert *et al.*, 1974; Chuankhayan *et al.*, 2010; Northrop, 1969; Raga-Carbajal *et al.*, 2016).

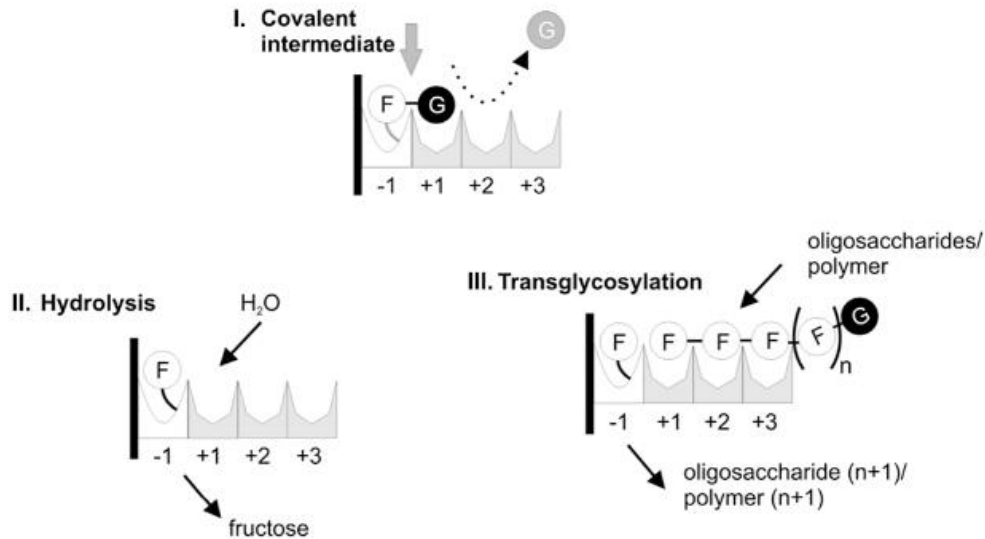


**Figura 5.** Mecanismo molecular de reacción de las fructansacarosas (FNs) en dos fases. Nucleófilo (D86), estabilizador (D247) y estabilizador ácido- base (E342) (Adaptado de Chuankhayan *et al.*, 2010 por Raga- Carbajal, 2015).

#### 1.4 Subsitios de unión a sustrato-aceptor de las FNs

Además de la “triada catalítica” en las fructansacarasas existen otros residuos importantes en la transfructosilación, los cuales se encuentran alejados del sitio catalítico y se ha demostrado que participan en el acomodo del sustrato y moléculas aceptoras (Pijning *et al.*, 2011; Meng & Futterer, 2003). Dichos residuos pueden ser divididos en subsitios respecto a la hidrólisis del enlace glicosídico del sustrato, etiquetándose de -n a +n, de manera que en el sitio -n se acomoda el residuo fructosilo que no tiene el extremo reductor libre y en +n se acomoda el residuo fructosilo que cuenta con el extremo reductor libre. En el centro activo de la enzima, la sacarosa se une a los subsitios -1 y +1, de tal forma que los aminoácidos en contacto con el residuo fructosilo y la molécula de glucosa conforman al subsitio -1 y +1, respectivamente, en conclusión, cada subsitio se complementa geométricamente e interactúa con un único monómero del sustrato (Davies *et al.*, 1997; Allen, 1980) (Figura 6). Cuando la glucosa se libera al medio de reacción, tanto en el subsitio +1 como en los subsitios subsecuentes (+2, +3, etc.) pueden ser acopladas moléculas aceptoras a las cuales será transferido el residuo fructosilo de donde resulta la reacción de transfructosilación afirmada anteriormente (Allen, 1980).

Se ha reportado que la unión de los monómeros a los subsitios de unión a sustrato-aceptor de la enzima esta mediada por diferentes fuerzas químicas, como son las fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Respecto a los puentes de hidrógeno, estos proporcionan estabilidad y especificidad en los complejos generales de proteínas y carbohidratos siendo considerados como las interacciones dominantes en estos complejos (Zolotnitsky *et al.*, 2004). Por otro lado, las interacciones hidrofóbicas de acoplamiento tipo  $\pi$ - $\pi$  stacking entre los residuos aromáticos presentes en los subsitios de la enzima con los anillos de los monosacáridos (Quioco, 1989; McGaughey *et al.*, 1998) confieren la especificidad al no permitir la unión de determinados epímeros de azúcar a través de un obstáculo estérico o un ambiente no polar desfavorable (Vyas, 1991).



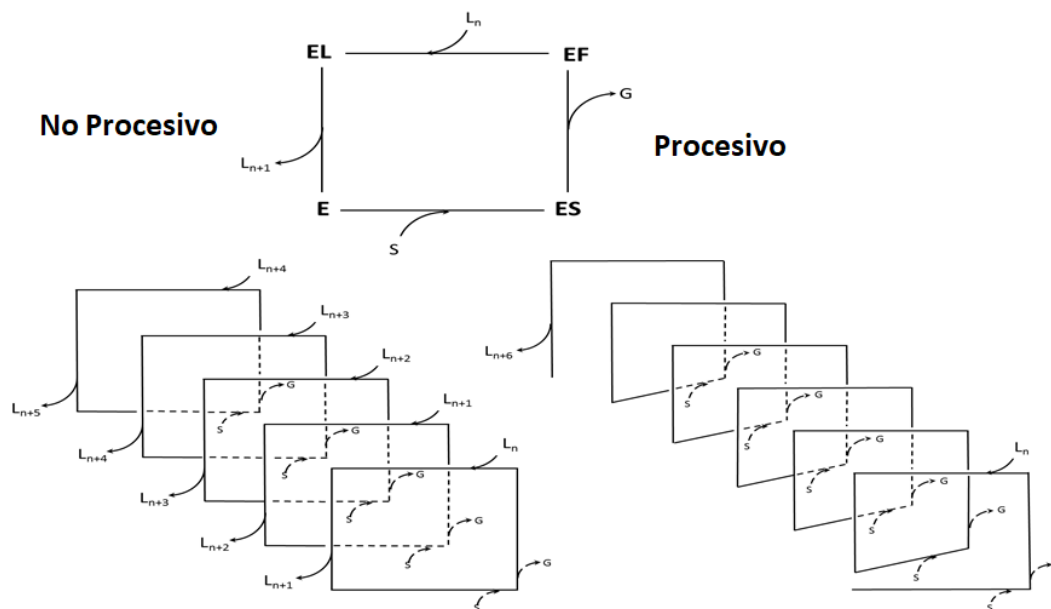
**Figura 6.** Subsitios de unión a sustrato FNs. I. Formación de intermediario fructosil-enzima. II Hidrólisis liberación de glucosa y transferencia de fructosa a una molécula de agua. III Transfructosilación transferencia de residuo fructosilo a una cadena de fructanas en crecimiento (Adaptado de Ozimek *et al.*, 2006 por Pijning *et al.*, 2011).

## 1.5 Mecanismo de elongación

Como ya se mencionó anteriormente el proceso de síntesis del polímero llevado a cabo por las FNs involucra una serie de interacciones que conforman el ciclo de polimerización (Figura 7) el cual comienza con la interacción entre la enzima (E) y la sacarosa utilizada como sustrato (S) formando un intermediario covalente enzima-sustrato (ES) en donde el enlace glicosídico entre la glucosa y fructosa sufre una ruptura y la glucosa es liberada al medio (G), permitiendo así la formación de un segundo intermediario fructosil-enzima (EF). Posteriormente, el monómero de fructosa de este intermediario es transferido a una molécula aceptora ( $L_n$ ) generando un producto de reacción con un monómero adicional ( $L_{n+1}$ ). Se ha demostrado en la levansacarasa SacB que las fructanas y fructooligosacáridos (FOS) son sintetizados mediante dos mecanismos distintos: mecanismo de elongación procesivo y no procesivo, respectivamente (Raga-Carbajal *et al.*, 2016). En el mecanismo procesivo la cadena de fructanas crece mediante la transferencia sucesiva de diversos



monómeros de fructosa a una misma molécula aceptora, dando lugar a polímero de alto peso molecular; esta reacción se lleva a cabo a una alta velocidad y se logra debido a las diversas interacciones que existe entre la enzima y el polímero en crecimiento. Por otro lado, en el mecanismo no procesivo después de la adición de un monómero de fructosa a la molécula aceptora ésta es liberada al medio de reacción, dando lugar a polímero de bajo peso molecular y FOS (Monsan & Paul, 1995; Raga-Carbajal *et al.*, 2016).



**Figura 7.** Mecanismo de elongación propuesto para las fructansacarasas (FNs). Mecanismo procesivo y no procesivo, el cuadro superior representa el ciclo catalítico básico (Raga-Carbajal *et al.*, 2015).

## 1.6 Levansacarasas multidominio presentes en la naturaleza

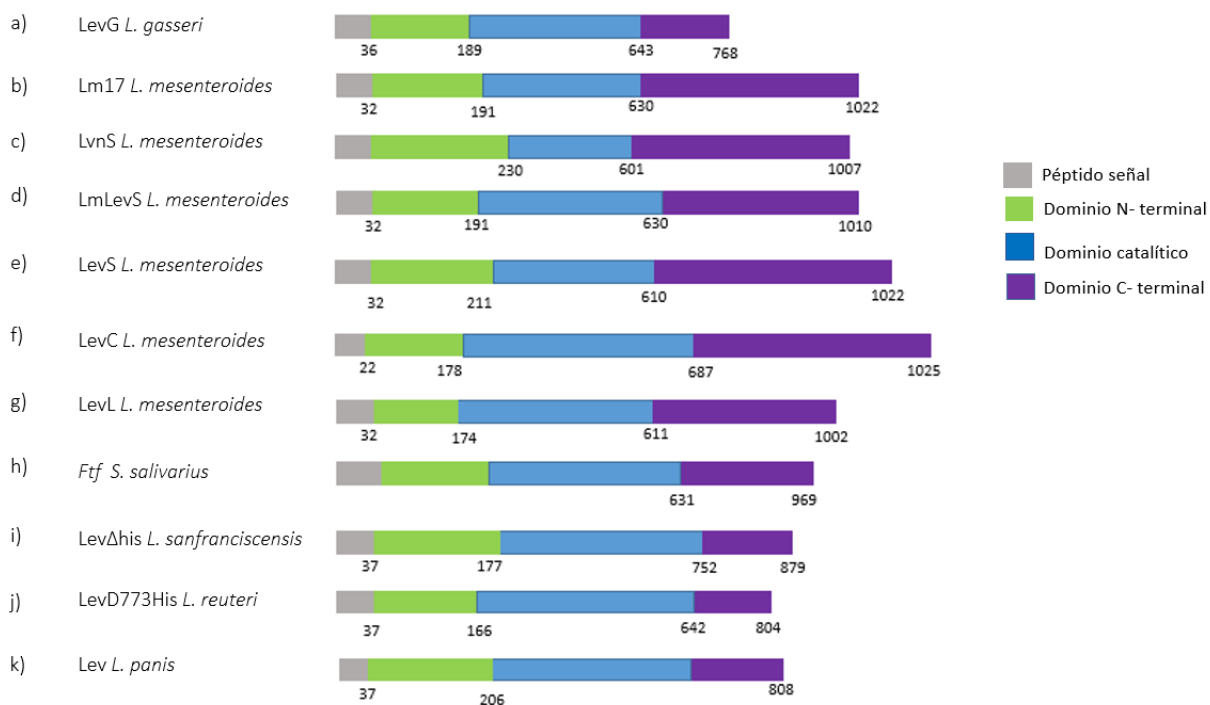
En general, dado que las fructansacarasas son un grupo de enzimas que presentan propiedades interesantes, diferentes investigaciones se han enfocado en identificar y caracterizar diversas enzimas de fuentes naturales. Estos ensayos han permitido el reporte de 12 levansacarasas multidominio (figura 8), cuyas características son resumidas en la tabla 1.

Enzima	Organismo	Peso molecular kDa	pH óptimo	Temperatura óptima °C	FOS	Polímero	Actividad específica u/mg	Referencia
LEVG	<i>Lactobacillus gasserii</i>	84	3.5	55	FOS	Levan	-	Anward <i>et al.</i> , 2010
LM17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	113	5.5	35	FOS	Levan APM	10	Iliev <i>et al.</i> , 2018
LVNS	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	113	5.5	30	Nistosa y Kestosa	Levan	-	Ishida <i>et al.</i> , 2016
LMLEVS	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	112	6	30	FOS	Levan	-	Jadaun <i>et al.</i> , 2019
LEVS	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	113	6	30	-	Levan APM	-	Morales-Arrieta <i>et al.</i> , 2006
LEVC	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	113	6.5	35	-	Levan APM	240	Olvera <i>et al.</i> , 2006
LEVL	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	112	6.5	35	-	Levan APM	-	Olvera <i>et al.</i> , 2006
FTF	<i>Streptococcus salivarius</i>	104	6.5	37	-	Levan BPM	-	Rathsam <i>et al.</i> , 1993
LEVΔHIS	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	94	5.4	35	Kestosa y Nistosa	Levan	-	Tieking <i>et al.</i> , 2005
LEV D773HIS	<i>Lactobacillus reuteri</i>	87	4.5	50	-	Levan APM Y BPM	177	Van Hijum <i>et al.</i> , 2004
LEV	<i>Lactobacillus panis</i>	87	4.0	45	Kestosa	Levan APM	-	Waldherr <i>et al.</i> , 2008
LEV	<i>Streptococcus salivarius</i>	102	6	37	-	Levan APM	58	Song & Jacques, 1999

**Tabla 1.** Compendio de las propiedades bioquímicas y cinéticas, así como las especificidades de las levansacarosas multidominio hasta ahora reportadas. PMA: polímero de alto peso molecular y PBM: polímero de bajo peso molecular, FOS: fructooligosacáridos (Anward *et al.*, 2010; Iliev *et al.*, 2018; Ishida *et al.*, 2016-; Jadaun *et al.*, 2019; Morales-Arrieta *et al.*, 2006; Olvera *et al.*, 2006; Olvera *et al.*, 2006; Rathsam *et al.*, 1993; Tieking *et al.*, 2005; Van Hijum *et al.*, 2004; Waldherr *et al.*, 2008; Song & Jacques, 1999).

Puesto que estas enzimas son aisladas de diferentes organismos, presentan una gran diversidad de características tanto moleculares como bioquímicas (Waldherr *et al.*, 2008;

Van Hijum *et al.*, 2004; Tieking *et al.*, 2005). Aunque la mayoría de las levansacararas presentan rangos óptimos de pH de 5 a 7 y temperatura de 30 a 40 °C, algunas enzimas difieren en estas características bioquímicas. Por ejemplo, la levansacarasa LevG de *Lactobacillus gasseri* presenta un pH óptimo de 3.5 siendo el valor más ácido hasta ahora reportado, así mismo, esta enzima presenta la temperatura óptima más elevada (55 °C), a pesar de ello, es capaz de sintetizar tanto polímero como FOS (Anwar *et al.*, 2010). Respecto al peso molecular de estas enzimas, LevG también se caracteriza por ser la levansacarasa multidominio más pequeña presentando un PM de 84 kDa, en contraste, la levansacarasa LevC estudiada por Olvera *et al.*, 2006 presenta un PM de 113 kDa, por lo cual, es considerada una de las más grande hasta ahora reportada.

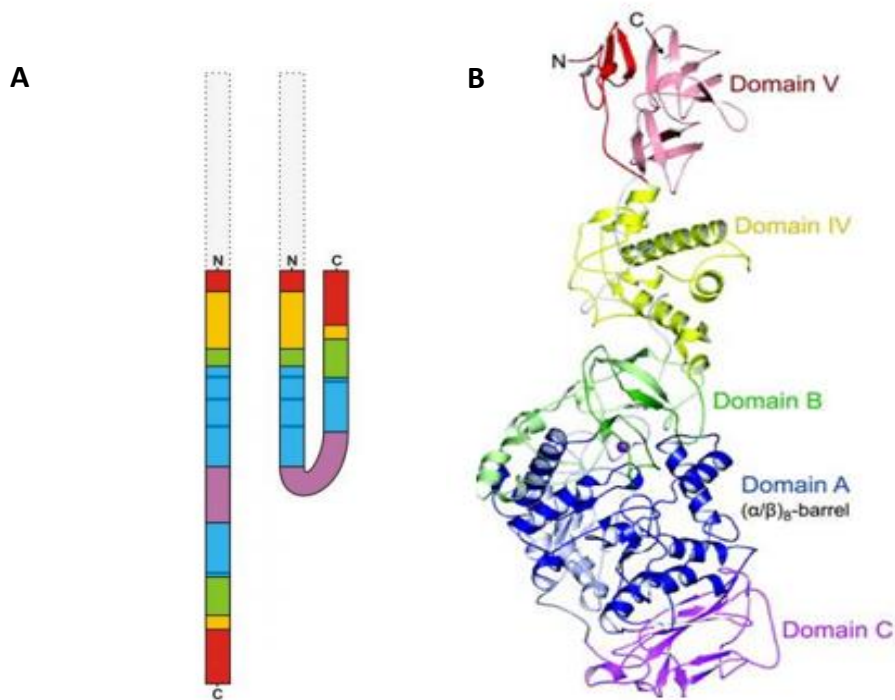


**Figura 8.** Arquitectura de las levansacararas multidominio reportadas hasta el momento (Anward *et al.*, 2010; Iliev *et al.*, 2018; Ishida *et al.*, 2016-; Jadaun *et al.*, 2019; Morales-Arrieta *et al.*, 2006; Olvera *et al.*, 2006; Olvera *et al.*, 2006; Rathsam *et al.*, 1993; Tieking *et al.*, 2005; Van Hijum *et al.*, 2004; Waldherr *et al.*, 2008; Song & Jacques, 1999).

En diferentes estudios se han relacionado a las FNs multidominio con las glucansacararas (GNs) ya que estas presentan similitud de secuencia, en particular la presencia de dominios adicionales al dominio catalítico, así como secuencias repetidas involucradas en unión a glucanos y pared celular, por lo cual los estudios sobre la estructura y funcionalidad de los dominios adicionales de las GNs, podrían sugerir que tipo de plegamiento y funcionalidad tienen los dominios adicionales en la FNs multidominio.

## 1.7 Glucansacararas multidominio

Las glucansacararas (GNs) catalizan la transferencia del residuo de glucosa de una molécula de sacarosa a un polímero en crecimiento de  $\alpha$ -glucano (Monchois *et al.*, 1999). Las GNs pertenecen a la familia 70 de las glicosilhidrolasas (GH70) y están constituidas por un dominio N-terminal seguido del dominio catalítico y dominio C-terminal. Las estructuras cristalográficas de las GNs revelan que estas enzimas presentan un plegamiento tipo “U” formado por 5 dominios: A, B, C, IV y V (Figura 9); tres de ellos muestran similitud con los dominios A, B y C de las  $\alpha$ -amilasas (GH13), por lo cual se les denominó de la misma manera. Debido a que el dominio IV presenta un pliegue novedoso en forma de bisagra sin similitud con ninguna otra enzima conocida, se le asignó un nombre independiente, similar a lo que ocurre con el dominio V, ya que fue considerado como un dominio extra (Brisson *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2011; Pijning *et al.*, 2012; Vujičić-Žagar *et al.*, 2010; Vujičić-Žagar & Dijkstra, 2006).



**Figura 9.** Arquitectura y estructura la glucansacarasa GTF180-ΔN (Vujicic-Zagar *et al.*, 2010). A. Organización lineal de los dominios de las GNs. B. Plegamiento en forma de "U", se observa la distribución de los cinco dominios. Dominio A (azul), B (verde), C (lila), IV (amarillo) y V (rojo).

Se ha demostrado que el dominio A de las GNs corresponde al dominio catalítico, este dominio presenta un plegamiento de barril ( $\beta/\alpha$ ) y es el lugar donde se lleva a cabo la catálisis. Flanqueando al dominio A, se encuentran las regiones, N- y C-terminal que interaccionan entre sí, dando lugar a una estructura secundaria en forma de loop con láminas  $\beta$ , la cual corresponde al dominio B. Dichas regiones presentan una longitud de 60 y 15 aminoácidos, para la región N y C- terminal, respectivamente, por lo cual, en conjunto conceden una longitud aproximada de 75 aminoácidos al dominio B (Vujičić-Žagar *et al.*, 2010). Diversos estudios sugieren que el dominio B participa en la unión del sustrato y aceptor, además, de ser importante en las diferencias de especificidad de los sustratos como se ha observado entre las  $\alpha$ -amilasas (Kralj *et al.*, 2004). Asimismo, se ha encontrado

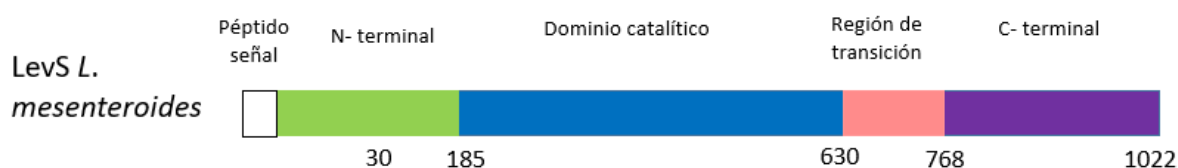
que en conjunto los residuos del dominio B cercanos a la intersección al dominio catalítico forma un sitio de unión a calcio (Kralj *et al.*, 2004; Vujičić-Žagar *et al.*, 2010).

Por otro lado, el dominio C forma el fondo de la "U", aunque la mayoría de las GNs y  $\alpha$ -amilasa tienen este dominio su función precisa no está clara (Pijning, 2014). El dominio IV se coloca entre los dominios B y V, presenta varias interacciones con el dominio B pero muy pocas con el dominio V, sin embargo, su función no está bien definida (Vujičić-Žagar *et al.*, 2010; Pijning *et al.*, 2012). Por último, el dominio V contiene repeticiones de aproximadamente 20 aminoácidos, las cuales se han identificado como regiones repetidas YG ricas en tirosina, glicina y residuos aromáticos que en algunos casos presentan un plegamiento tipo  $\beta$ -solenoides (Pijning *et al.*, 2012; Giffard & Jacques 1994). Se ha propuesto que estas repeticiones son responsables de la unión a la pared celular, de unir glucano y mediar la interacción glucano-proteína, por lo tanto, se consideran como dominios de unión a glucano (Bozonnet *et al.*, 2002; Pijning, 2014). Además, se sugiere que este dominio está involucrado en la polimerización al facilitar la transferencia de glucosa durante la catálisis (Van Hijum *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2011). Desde el punto de vista evolutivo, se cree que esta región se adquirió por recombinación para estabilizar la enzima y modificar su especificidad, con base a la estructura cristalográfica se ha sugerido que las GNs probablemente evolucionaron de las  $\alpha$ -amilasas (Shah *et al.*, 2004).

## 1.8 Fructansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*

En 2006 Morales-Arrieta y colaboradores aislaron un gen que codifica para una levansacarasa multidominio de *L. mesenteroides* B-512 F (LevS), la cual está constituida por 1022 aminoácidos y presenta un peso molecular de 113 kDa (Figura 10). Al analizar su secuencia encontraron que se trata de una enzima quimérica natural que consta de 3 dominios, los cuales tienen similitud con las GNs y FNs principalmente en el dominio C-terminal. El dominio N-terminal de LevS consta de 184 aminoácidos e incluye un péptido señal de 30 residuos cuya función radica en la exportación de la proteína al exterior de la célula, además recientemente, se ha encontrado que dentro de la región N-terminal existe

una región mínima funcional denominada “zona de procesividad” la cual está involucrada en la procesividad de la enzima (Martínez-Bahena, 2019). El dominio catalítico de LevS está constituido por 446 aminoácidos y es el responsable de la actividad catalítica. Finalmente, el dominio C-terminal de esta enzima está formado por 392 aminoácidos, el cual presenta 3 repeticiones en tándem de 90 aminoácidos, se ha propuesto que este dominio está involucrado en la actividad transferasa de la enzima (García-Paz, 2019, datos no publicados).



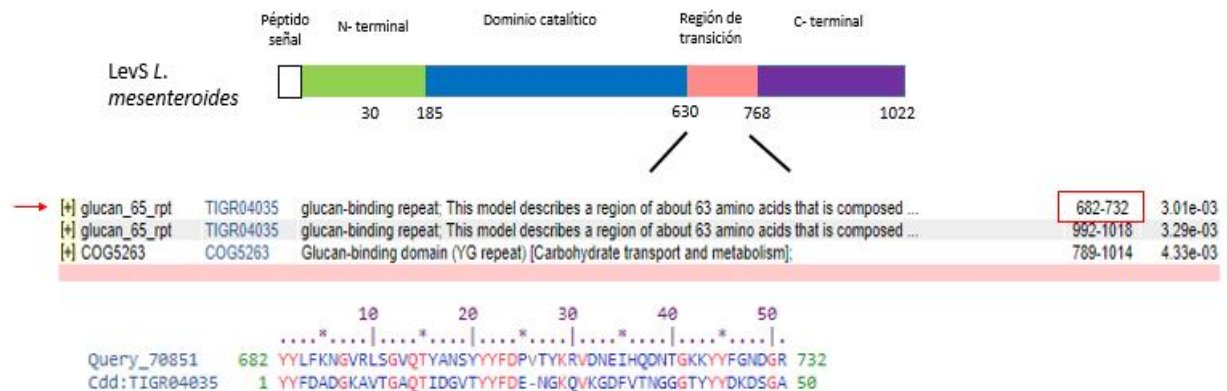
**Figura 10.** Arquitectura de la levansacarasa multidominio LevS de *Leuconostoc mesenteroides* (Morales-Arrieta *et al.*, 2006).

### 1.9 Región de transición de LevS

Entre el dominio catalítico y el dominio C-terminal de la levansacarasa LevS se identificó una región que presenta baja similitud con los dominios C-terminal de las GNs, de tal forma que fue denominada región de transición (Tn). Dicha región se encuentra ubicada entre los residuos 631 al 768 y consta de 138 aminoácidos. El análisis de esta región muestra que presenta un 32% de homología con dominios de unión a glucano, específicamente entre los residuos 682 al 732, los cuales representan el 36.9% de la secuencia total de la región Tn (Morales-Arrieta *et al.*, 2006; García-Paz, 2019, datos no publicados) (Figura 11). Asimismo, se encontró que esta región presenta repetidas YG de un subgrupo de secuencias asociadas con la unión de glucano (Shah *et al.*, 2004), las cuales, presentan residuos altamente

conservados particularmente aminoácidos aromáticos y glicina (García-Paz, 2019, datos no publicados; Boraston *et al.*, 2004; Lynch *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 1990).

Debido a que se identificó que la región Tn presenta identidad con los dominios de unión a glucanos, se ha considerado que esta región podría contener módulos de unión a carbohidrato (CBM). Los CBM se caracterizan por tener una longitud de 30 a 200 aminoácidos los cuales presentan un pliegue discreto e independiente, su ubicación dentro de la proteína parental puede encontrarse tanto en la región N como en la C terminal (Boraston *et al.*, 2004; Guillén *et al.*, 2010; Shoseyov *et al.*, 2006). En general, los CBM son módulos cercanos al sitio activo, pueden unirse a polisacáridos con alta especificidad y afinidad, logrando una asociación entre el sustrato y la enzima (Boraston *et al.*, 2004; Christiansen *et al.*, 2009; Gilkes *et al.*, 1991; Guan *et al.*, 2003).

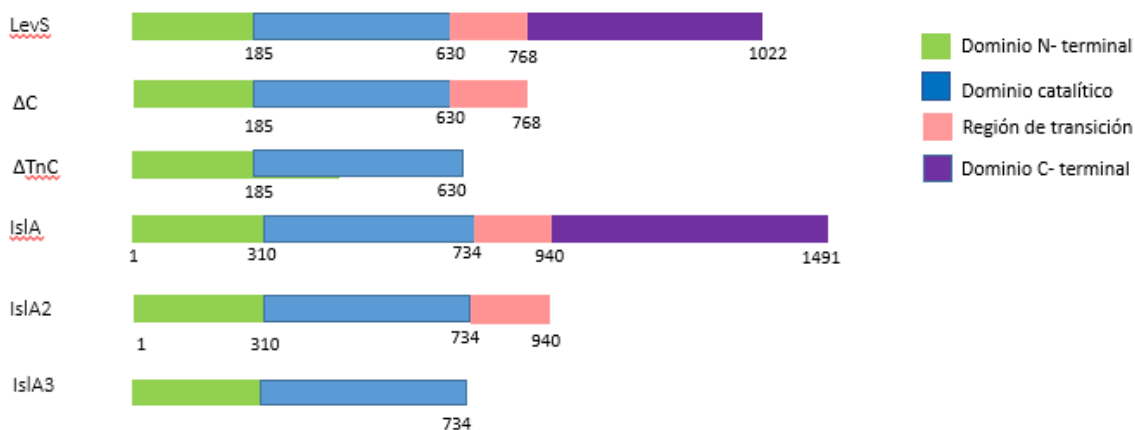


**Figura 11.** Análisis de BLAST de la levansacarasa multidominio LevS de *Leuconostoc mesenteroides* identificando los dominios de unión a glucano (García-Paz, 2019, datos no publicados).



## 2 Antecedentes

Con el propósito de conocer la participación del dominio C-terminal en la actividad enzimática, diferentes estudios se han enfocado en realizar versiones truncadas de dicha región. A partir de la levansacarasa LevS, García-Paz construyó las versiones truncadas  $\Delta C$  y  $\Delta TnC$  las cuales carecen de la región C-terminal y la región de transición, respectivamente (Figura 12). Cuando la región C-terminal fue truncada ( $\Delta C$ ) el porcentaje de hidrólisis de la enzima aumentó 10% en comparación con la enzima silvestre, en contraste, cuando se truncó la Tn ( $\Delta TnC$ ) la tasa de hidrólisis se incrementó un 80%. Por otro lado, al analizar el perfil de productos se encontró que ambas enzimas son capaces de producir polímero tipo levana, sin embargo, en  $\Delta TnC$  se observó una disminución en la producción de polímero. En conjunto estos resultados sugieren que el dominio C-terminal está involucrado en la actividad transferasa y procesividad de LevS, siendo específicamente la región de transición responsable de esta actividad (García-Paz, 2019, datos no publicados).

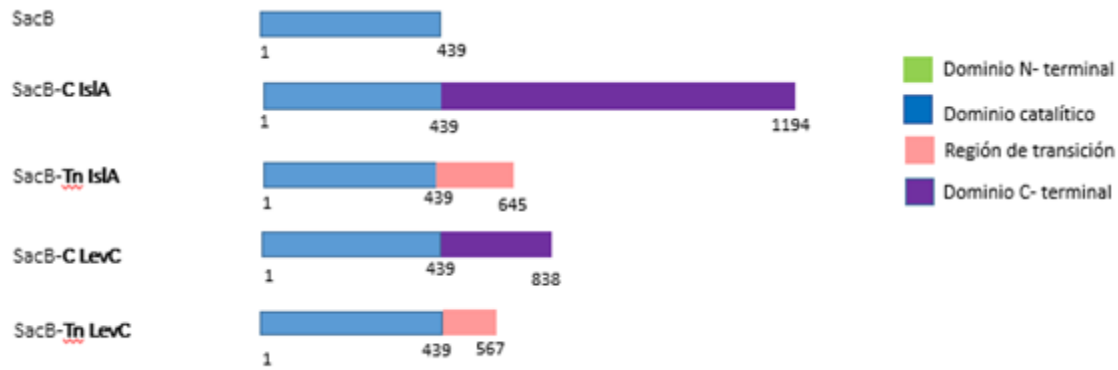


**Figura 12.** Construcción de las enzimas truncadas de la enzima multidominio LevS (García-Paz, 2019, datos no publicados; Del Moral *et al.*, 2008).

Estudios realizados en otras FNs multidominio han demostrado que el dominio C-terminal está involucrado en la actividad transferasa, como es el caso del reporte de Del Moral y

colaboradores en 2008, quienes estudiaron el papel del dominio C-terminal de la inulosacarasa IsIA de *Leuconostoc citreum* (CW28) empleando 2 versiones truncadas. La construcción IsIA2 e IsIA3 resultan del truncamiento de la región C-terminal y la región de transición, respectivamente (Figura 12). Se observó un aumento en el porcentaje de hidrólisis para ambas enzimas, ya que para la enzima WT IsIA se presentó una relación hidrólisis-transferencia (H/T) de 40/60%, mientras para la IsIA2 su relación de H/T fue de 38/62 y para IsIA3 fue de 61/39, aumentando más de un 20% la actividad hidrolítica. Además, en la versión truncada IsIA3 se observó una disminución en el tiempo de vida media de 74 minutos comparado con el tiempo de la vida medio de IsIA2 y de la WT que fue 407 y 420 minutos, respectivamente. Estos resultados demostraron que el dominio C-terminal, en específico la región de transición, confiere estabilidad a la enzima, además de favorecer la actividad transferasa en las enzimas (Del Moral *et al.*, 2008). Estos resultados coinciden con lo observado por García-Paz, que al truncar el dominio C-terminal y la región de transición de LevS la actividad transferasa se ve afectada.

Los resultados observados en los trabajos anteriores muestran la importancia del dominio C-terminal en la actividad transferasa de las enzimas. Con el objetivo de estudiar a fondo la participación de esta región en la actividad transferasa, Olvera y colaboradores en 2012 diseñaron y caracterizaron fructansacarosas quiméricas empleando una enzima unidominio SacB a la cual fueron fusionados de forma separada, el dominio C-terminal y la región de transición provenientes de dos diferentes enzimas multidominio (IsIA y LevC) (Olvera *et al.*, 2012) (Figura 13). En este trabajo se encontró que las versiones quiméricas de SacB que poseen únicamente la región de transición alcanzan la misma eficiencia que las versiones con todo el dominio C-terminal, lo que sugiere que dicha región es suficiente para aumentar la velocidad y actividad transferasa. Además, se observó que la quimera SacB – TnLevC fue capaz de cambiar el perfil de productos de la enzima silvestre de bimodal a un perfil donde solo se produce polímero de alto peso molecular, lo que al igual que García-Paz sugiere que la región de transición participa en la procesividad de la enzima (Olvera *et al.*, 2012).



**Figura 13.** Construcción de las enzimas truncadas y quimera en el estudio del dominio C-terminal de enzimas multidominio (Olvera *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos en estos trabajos demuestran que la región de transición está involucrada en la actividad transferasa y procesividad enzimática de la levansacarasa LevS. A pesar de que se desconocen los detalles sobre su participación en dichas actividades, se sugiere que esta región está involucrada en el reconocimiento del producto (polímero en crecimiento), que también puede ser un sustrato aceptor durante la reacción de síntesis de polímero y, de esta manera afectar la afinidad enzimática por los sustratos dirigidos hacia la transfructosilación. Para descartar o aceptar esta hipótesis es necesario analizar a fondo la posible organización de la estructura de esta región y determinar cuál es la zona mínima necesaria que está involucrada en la actividad transferasa y en la procesividad de la enzima, para en estudios posteriores analizar si esta región participa en el reconocimiento al sustrato aceptor y finalmente dar luz a los mecanismo moleculares a través de los cuales esta enzima realiza la síntesis de levana, un polímero con gran interés industrial.

### 3 Planteamiento del problema

A pesar de los estudios realizados hasta el momento sobre la funcionalidad de la región de transición en las fructansacarosas multidominio, aún hay información limitada sobre su posible estructuración y función, así como la existencia de una zona mínima funcional. En este trabajo estamos interesados en conocer si es posible delimitar una zona mínima funcional de la región de transición.

### 4 Justificación

Los antecedentes obtenidos hasta el momento sugieren que la región de transición está involucrada en la procesividad y actividad transferasa de las fructansacarosas multidominio, en particular de la levansacarasa LevS, sin embargo, hacen falta más estudios que nos ayuden a comprender la importancia de esta región en LevS. Por tal motivo, surge el interés de estudiar con mayor detalle el papel de esta región en la actividad enzimática, lo que podría significar una prospectiva hacia el diseño de enzimas capaces de producir polímeros con características específicas.

### 5 Hipótesis

Existe una zona mínima funcional dentro de la región de transición de LevS que está involucrada en la actividad transferasa y procesividad de la enzima.

## 6 Objetivos

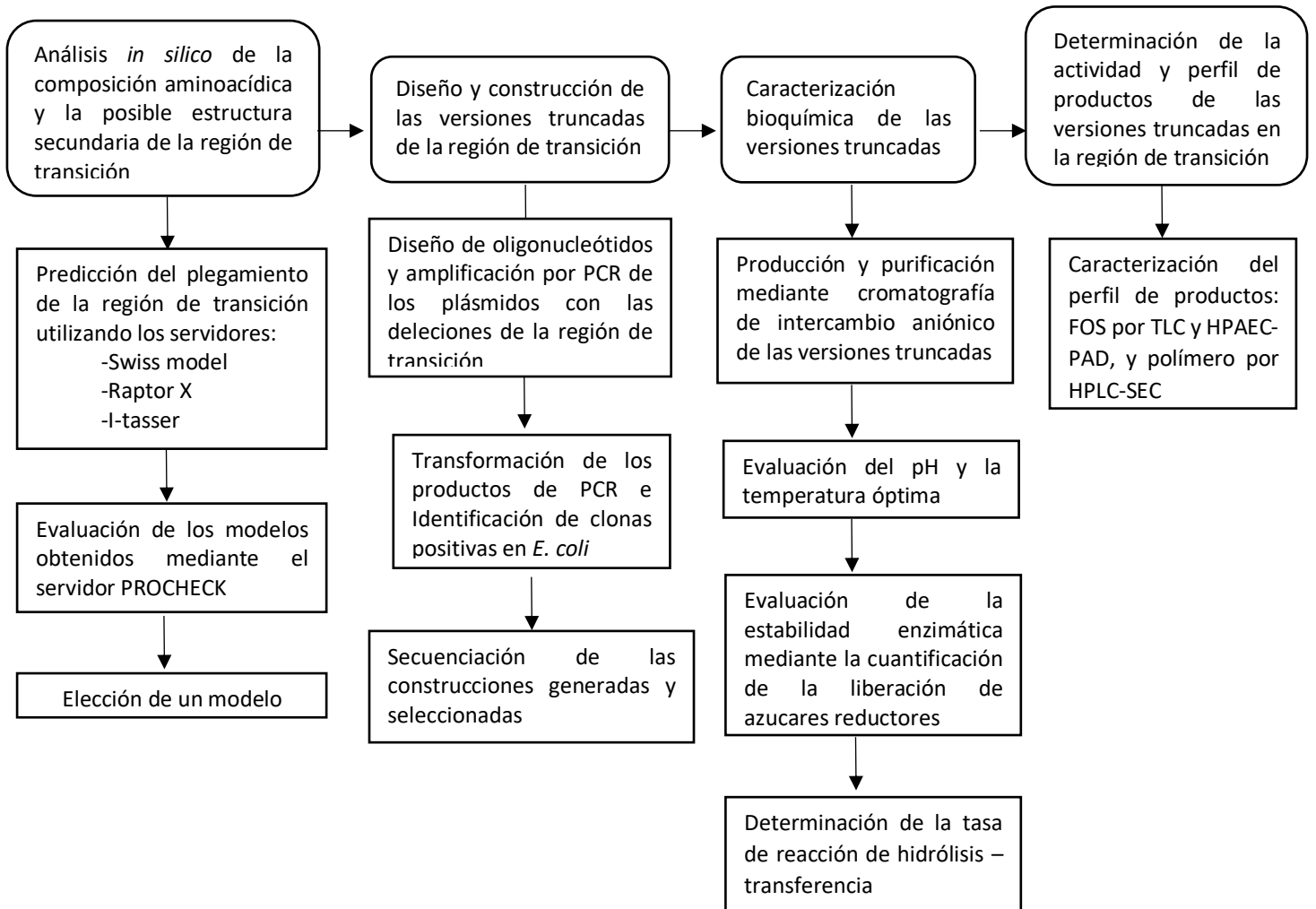
### 6.1 Objetivo general

Delimitar la zona mínima funcional presente en la región de transición en la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*, que participa en la actividad transferasa y procesividad.

### 6.2 Objetivos específicos

1. Analizar la composición aminoacídica y la posible estructura de la región de transición de la levansacarasa LevS *in silico*.
2. Diseñar y construir con base en los análisis *in silico* versiones truncadas de la región de transición de la levansacarasa LevS.
3. Caracterizar bioquímicamente las versiones truncadas en la región de transición de la levansacarasa LevS.
4. Determinar la actividad y el perfil de productos de reacción las versiones truncadas en la región de transición de la levansacarasa LevS.

## 7 Estrategia experimental



## 8 Materiales y métodos

### 8.1 Cepas y medios de cultivo utilizados

#### 8.1.1 Cepas utilizadas

Las cepas utilizadas en este trabajo fueron células electrocompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$  para propósitos de clonación y *E. coli* BL21 para fines de expresión de proteínas.

#### 8.1.2 Preparación de células electrocompetentes

Se realizó un pre-inóculo en medio YENB (tabla 2) de las cepas *E. coli* BL21 Y DH5 $\alpha$  el cual se incubó a 37 °C durante 12 -16 horas con agitación constante a 220 rpm. Posteriormente, se realizó una fermentación de 200 mL en medio YENB utilizando 1 % v/v de pre-inóculo y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 - 0.6 UA a 600 nm. Después de alcanzar la densidad óptica requerida la fermentación se colocó en hielo durante 20 minutos, una vez transcurrido el tiempo se cosecharon las células a 8000 rpm durante 8 minutos, realizando dos lavados con agua Milli-Q desionizada y un lavado con glicerol al 10 %. Por último, a las células se les agregó 1 mL de glicerol al 10 % y se realizaron alícuotas de 60  $\mu$ l las cuales se almacenaron a -80 °C (todo este procedimiento se realizó con materiales previamente esterilizados).

**Tabla 2.** Composición de medio YENB.

Reactivo Medio YENB	Concentración g/L
Bactotripton	7.5
Extracto de levadura	8

Para el crecimiento de las cepas empleadas se utilizó medio líquido Luria Bertani (LB) a 37 °C con agitación constante a 220 rpm durante 12-16 horas. Para el medio LB sólido se agregaron 20 g de agar por cada litro de medio.

**Tabla 3.** Composición de medio LB.

<b>Reactivo medio LB</b>	<b>Concentración g/L</b>
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

La recuperación de las células después de la transformación se llevó a cabo en medio líquido SOC rico en glucosa.

**Tabla 4.** Composición de medio SOC.

<b>Reactivo medio SOC</b>	<b>Concentración</b>
Triptona	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	0.5 g/L
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucosa	20 mM



## 8.2 Técnicas de análisis computacionales

### 8.2.1 Análisis *in silico* y predicción del plegamiento de la región de transición

Se realizó un análisis detallado sobre la composición aminoacídica de la región de transición. Con el fin de determinar la proporción de residuos encontrados en su secuencia se utilizó el servidor ProtParam. Por otro, se utilizó el servidor JPred4 a partir del cual se obtuvo información sobre la exposición al solvente, predicción de la estructura secundaria, así como residuos conservados. Con el objetivo de obtener el posible plegamiento de la región de transición de LevS, se realizaron modelos por homología a partir de su secuencia aminoacídica, utilizando tres servidores online diferentes: I-tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), Raptor X (<http://raptorx.uchicago.edu/>) y Swiss model (<https://swissmodel.expasy.org/>). Los modelos se realizaron sin utilizar algún templado específico.

### 8.2.2 Análisis y evaluación de los modelos obtenidos

Se realizó un análisis de los modelos obtenidos a partir del servidor PSVS, utilizando la evaluación de PROCHECK, el cual proporciona información sobre su calidad estereoquímica. Se eligió el mejor modelo de acuerdo con los análisis de ramachandran, z-score, etc.

### 8.2.3 Análisis de la posible interacción entre residuos de la región de transición

A partir de un análisis sobre los residuos presentes en la región de transición, se realizó una predicción sobre sus posibles interacciones entre residuos aromáticos, para ello se utilizó el modelo seleccionado y con ayuda del software PyMOL se marcaron las posibles interacciones marcando con diferente color cada una de ellas.

### 8.3 Construcción de las versiones truncadas

#### 8.3.1 Diseño de oligonucleótidos

Con el fin de construir las versiones truncadas a partir de la secuencia nucleotídica de LevS de *L. mesenteroides* se diseñaron oligonucleótidos de tipo Quick-change parcialmente superpuestos (Tabla 5). Los oligonucleótidos diseñados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (UNAM) y para realizar la amplificación se diluyeron a una concentración final de 10  $\mu$ M.

**Tabla 5.** Diseño de oligonucleótidos para la construcción de versiones truncadas.

Nombre oligonucleótido	Sentido	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tm (°C)	Versión truncada LevS
<b>MMLEVSCAT</b>	Reverse	<u>CAGCCGGATCCCATGTACCTTGAGCTAAAACAGTATCC</u> AATACTTTTGTG	68	N70 Cat
<b>MMLEVS138/ CAT</b>	Forward	<u>AGGTACATGGGATCCGGCTG</u> CTAACAAAGCCCGAAAG GAAGC	68.8	N70 Cat
<b>MMLEVS77</b>	Reverse	<u>CAGCCGGATCTACTGGATCG</u> AAATAATAATATGAATTT GCATAGGTTTGCACAC	58.2	N70 77Tn
<b>MMLEVS138/ 77FW</b>	Forward	<u>CGATCCAGTAGATCCGGCTG</u> CTAACAAAGCCCGAAAGG AAGC	61.2	N70 77Tn

#### 8.3.2 Amplificación de las versiones truncadas

Mediante la técnica PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se amplificaron los fragmentos de ADN correspondientes a las versiones truncadas. Como templado se utilizó el plásmido con el gen de la enzima  $\Delta$ N85C que se encuentra insertado en el vector pET - 22b(+) (Figura 14). Este vector carece de péptido señal, cuenta con un gen de resistencia a ampicilina, un inductor por IPTG, análogo a la alolactosa, que induce la transcripción del



**Tabla 6.** Concentraciones de reactivos utilizadas en la reacción PCR para la versión truncada LevS N70 Cat.

Componente	Volumen	Concentración final
Agua tetradestilada	13.7	
5X Phusion HF Buffer	4 $\mu$ L	1X
10 mM dNTPs	0.4 $\mu$ L	200 $\mu$ M
Oligo directo	0.4 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
Oligo reverso	0.4 $\mu$ L	0.5 Mm
DNA molde	0.9 $\mu$ L	2.5 ng/ $\mu$ L
Phusion DNA polimerasa	0.2 $\mu$ L	1 U/ 20 $\mu$ L
Volumen final	20 $\mu$ L	

**Tabla 7.** Condiciones de los ciclos en la reacción de PCR para la versión truncada LevS N70 Cat.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98 °C	2 min	1
Desnaturalización	98 °C	15 seg	22
Alineamiento	65 °C	20 seg	
Extensión	72 °C	3 min 40 seg	
Extensión final	72 °C	5 min	1

Por otro lado, la amplificación de la forma truncada LevS N70 Tn77 se llevó a cabo utilizando la polimerasa Vent (New England Biolabs Inc.) en un volumen de 50  $\mu$ L como se describe en

la tabla 8. Las reacciones se realizaron en un termociclador Heal Force advance B960 con las condiciones de reacción de PCR que se describen en la tabla 9. Los tiempos de elongación, así como las condiciones de reacción variaron entre las versiones truncadas debido al tamaño del fragmento a amplificar, así como la polimerasa utilizada. Los productos de PCR fueron digeridos con la enzima DpnI siguiendo las instrucciones del proveedor.

**Tabla 8.** Concentraciones de reactivos utilizadas en la reacción PCR para la versión truncada LevS N70 Tn77 Vent.

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Concentración final</b>
Agua tetradestilada	37.9 $\mu\text{L}$	
ThermoPol Reaction Buffer (10X)	5 $\mu\text{L}$	1X
10 mM dNTPs	1 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{M}$
Oligo directo	2.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{M}$
Oligo reverso	2.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{M}$
DNA molde	0.9 $\mu\text{L}$	1 ng/ $\mu\text{L}$
Deep Vent DNA polimerasa	0.2 $\mu\text{L}$	1 U/ 50 $\mu\text{L}$
Volumen final	50 $\mu\text{L}$	

**Tabla 9.** Condiciones de los ciclos en la reacción de PCR para la versión truncada LevS N70 Tn77.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 seg	25
Alineamiento	60 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	7 min	
Extensión final	72 °C	5 min	1

### 8.3.3 Electroforesis de ácidos nucleicos

Se realizó un análisis de ADN en gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 1x, para ello se cargaron 10 µL de producto de PCR mientras que para plásmido purificado se cargaron 3 µL de muestra en relación 1:1 con buffer de carga para ambos casos, de igual forma se cargó marcador de peso molecular para poder corroborar el peso de las bandas. El gel se corrió a 80 V durante 50 minutos aproximadamente, se tiñó con una solución de bromuro de etidio y se destiñeron con agua destilada. La visualización de bandas se realizó con ayuda de un transiluminador bajo luz ultravioleta.

### 8.3.4 Producción y purificación de ADN plasmídico

Se transformaron células electrocompetentes *E. coli* DH5 por electroporación en un MicroPulser (BioRad) en modo Ec1 (2.5 mV, 5.2 ms) con el producto de PCR previamente digerido con la enzima DpnI y se recuperaron en 1 mL de medio líquido SOC incubándose a 37 °C y 300 rpm durante 1 hora. Después de 1 hora se plaquearon las células transformadas en medio sólido LB con ampicilina 200 µg/mL como marcador de selección y se incubaron a

37 °C durante 12-16 horas. Después del tiempo de incubación se seleccionaron colonias candidatas transformadas y con ellas se realizó un inóculo en medio LB líquido con ampicilina el cual se incubó a 37 °C con agitación constante 220 rpm durante 12-16 horas. Posterior del inóculo, se cosecharon las células a 12000 rpm y se realizó la extracción y purificación de plásmido, para ello se utilizó el kit zyppy™ Plasmid Miniprep de Zymo Research siguiendo las indicaciones del proveedor. Una vez realizada la extracción y purificación de plásmido se verificó su integridad y pureza mediante un gel de agarosa al 1 %, además se cuantificó por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

### 8.3.5 Digestión con enzimas de restricción

Con el fin de corroborar las clonas candidatas de las versiones truncadas se realizó una doble digestión del plásmido con las enzimas de restricción XhoI- XbaI y XhoI- NdeI de Thermo Scientific. Después de incubar las reacciones a 37 °C durante 12 horas se analizó la digestión empleando geles de agarosa al 1 %.

### 8.3.6 Análisis de la secuencia de construcciones

Las construcciones de las versiones truncadas que presentaron el patrón de digestión esperado se verificaron por secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (UNAM) utilizando oligonucleótidos en ambos sentidos del vector Pet-22b(+). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante BLAST en la página del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 8.4 Expresión heteróloga de las versiones truncadas

### 8.4.1 Transformación en *E. coli* BL21

Las células fueron transformadas por electroporación, para ello se colocó 1  $\mu$ L de plásmido purificado que contiene la construcción de las versiones truncadas con 60  $\mu$ L de células electrocompetentes en una celda de 0.2 mm; después de la electroporación se agregó 1 ml de medio SOC y las células se transfirieron a un microtubo de 1.5 mL y fueron incubadas durante 1 h a 37 °C a 300 rpm. Posteriormente, las células se plaquearon en cajas Petri con medio LB solido con ampicilina como medio de selección, a partir de las células transformadas se seleccionó una colonia de bacterias y se inoculo en 10 mL de medio LB con ampicilina a 37 °C durante 12 horas. En un matraz Fernbach se realizó una fermentación con un volumen de 1L de medio LB con ampicilina y se agregó el pre-inoculo a la fermentación y se incubo a 37 °C con agitación constante de 220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 - 0.6 UA a 600 nm.

Una vez alcanzada una densidad óptica de 0.5 - 0.6 UA a 600 nm las células fueron inducidas con IPTG (Isopropil-  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) con una concentración final en la fermentación de 1.5 mM y se incubaron durante 8 horas a 18 °C a una agitación constante de 120 rpm. Posteriormente las células se cosecharon por centrifugación a 8000 rpm a 4 °C y se lavaron dos veces con buffer de fosfatos 1 mM pH 6 y se almacenaron a -20 °C.

### 8.4.2 Extracción de proteínas por lisis celular

Debido a que el tag de histidinas fue eliminado durante la construcción de las versiones truncadas no fue posible purificar a las enzimas por afinidad, por lo cual para lograr su purificación se desarrolló un nuevo método de purificación. Como primer paso, para lograr extraer las proteínas del citoplasma se realizó la lisis de las células transformadas, para ello las células se resuspendieron en 5 mL de solución de lisozima a una concentración final de 1 mg/mL en buffer de fosfatos 1 mM pH 6 y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Una



vez transcurridos los 30 minutos con el fin de desestabilizar la membrana con cambios térmicos se procedió a realizar tres series de congelación- descongelación utilizando hielo seco y acetona. Por último, al extracto se le agregaron 5 mL de buffer de fosfatos 1mM a pH 6 y en un equipo de ultrasonificación Ultrasonic Processor Gex 130 se sonicaron las células con ciclos de 10 segundos On, 30 segundos Off con una amplitud al 70 % durante 1 minuto y medio. Para lograr separar los restos celulares se centrifugo el extracto a 10000 rpm a 4 °C durante 40 minutos, recuperando el sobrenadante.

Para proceder con la purificación se corroboró que la expresión de las proteínas fuera correcta, para ello se realizó un ensayo de actividad enzimática por azúcares reductores utilizando DNS. Una vez asegurada la presencia de nuestra proteína de interés se procedió a la purificación enzimática.

## 8.5 Purificación versiones truncadas

Como estrategia se utilizó la técnica de purificación por intercambio iónico utilizando una columna CM, sin embargo, a pesar de los esfuerzos no fue posible purificar a las proteínas, pues estas proteínas debido a su punto isoeléctrico no se acoplaban a la matriz de la columna. Como alternativa se utilizó una columna con resina DEAE<sup>+</sup> en donde exitosamente las enzimas fueron acopladas. Con el fin de lograr la purificación de nuestras proteínas se utilizaron distintos tipos de elución probando diferentes gradientes, entre ellos un gradiente de 10 a 1000 mM de buffer de fosfatos pH 6, sin embargo, se obtuvieron muestras muy contaminadas. A fin de encontrar la concentración adecuada de nuestro buffer de elución para obtener nuestra enzima pura se modificó el tiempo del gradiente, sin embargo, dicha estrategia tampoco funcionó.

Finalmente, después de algunas modificaciones se utilizó un gradiente escalonado de 250 y 350 mM de buffer de fosfatos pH 6, recuperando de esta forma fracciones con nuestra enzima de interés enriquecida. Con las fracciones obtenidas de la purificación se realizó un ensayo de azúcares reductores por DNS, esto para identificar aquellas fracciones en las que

se encontraba nuestra proteína de interés para posteriormente concentrarlas por ultracentrifugación.

### 8.5.1 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteína se realizó mediante el método de Bradford utilizando el reactivo Protein Assay (Bio-Rad), como estándar se utilizó albúmina sérica bovina (BSA, Bio-Rad). Las lecturas se realizaron con las reacciones entre el reactivo de Bradford y las muestras de las fracciones purificadas las cuales fueron incubadas durante 5 minutos, posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf BioSpectrometer Kinetic).

La concentración de proteína se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración proteína } mg/ml = \left( \frac{Abs_{595nm}}{PC_{BSA}} \right) \left( \frac{1 mg}{1000\mu g} \right) (FD)$$

**Donde:**

$Abs_{595nm}$ : Absorbancia de muestras a 595 nm (UA)

$PC_{BSA}$ : Pendiente curva estándar BSA (UA/ $\mu g/ml$ )

FD: Factor de dilución

### 8.5.2 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando una cámara vertical Migthy Small II con amperaje constante de 20 mA para la migración. Como gel concentrador se utilizó acrilamida al 4 % con pH 6.8 y como gel separador acrilamida al 10 % con pH 8.8. La muestra se mezcló con buffer de carga que contiene 0.125 M tris-Cl pH 6.8, 4 % SDS (w/v), 10 % glicerol (v/v), 10 % de  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v) y azul de bromofenol 0.05 % (w/v).

### 8.5.3 Tinción con Azul de Coomassie

Para lograr observar las bandas correspondientes a las proteínas separadas por electroforesis, se realizó una tinción del gel de acrilamida con azul de coomassie la cual consiste en la adición de una solución teñidora (ácido acético 10 %, metanol 30 % y azul de coomassie 0.2 %) durante 30 min. Para remover el exceso de colorante se utilizó una solución desteñidora (metanol 50 % y ácido acético 10 %) por tiempo indefinido, es decir, hasta que el gel se observara totalmente transparente observándose claramente las bandas y marcador de peso molecular. Para lograr conservar el gel este se enjuago con agua destilada y se enmarco con papel celofán, para ello se colocó el papel en una solución de agua y etanol 50 % V/V durante 10 minutos, para posteriormente con ayuda de un marco secar el gel.

### 8.5.4 Concentración de proteínas

Las fracciones con mayor pureza fueron concentradas por ultrafiltración empleando tubos Amicon con una membrana de corte molecular de 30 kDa. Esta ultrafiltración se llevó a cabo a 6000 rpm a 4 °C

### 8.5.5 Zimograma de las versiones truncadas puras

Después de la migración de las muestras puras de las versiones truncadas por electroforesis, los geles se lavaron con agua destilada durante 10 minutos. Posteriormente se realizaron tres lavados de 30 minutos con una solución de Tween80 1 % v/v con buffer de acetatos 50 Mm pH 6 a temperatura ambiente para renaturalizar a las enzimas. Después, los geles se incubaron en una solución de sacarosa 100 g/L en el mismo buffer durante toda la noche con una agitación constante de 40 rpm. Para fijar el polímero sintetizado, los geles se lavaron con etanol al 75 % v/v durante 30 minutos; posteriormente, para lograr la oxidación de los grupos hidroxilo se incubaron en una solución de ácido peryódico al 0.7 % v/v y ácido acético 5 % v/v durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se realizaron tres lavados de 20

minutos cada uno con metabisulfito de sodio 0.2 %, finalmente los geles se tiñeron con reactivo de Schiff hasta observar bandas color rosa-purpura. El exceso de colorante se eliminó con metabisulfito de sodio 5 % y los geles se secaron para su almacenamiento.

## 8.6 Caracterización enzimática

### 8.6.1 Ensayos de actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó cuantificando los azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática, para ello se empleó un análisis colorimétrico utilizando el método de ácido 3-5dinitrosalicílico (DNS), con el cual se determinó la actividad global que incluye tanto la hidrólisis como la transfructosilación. La reacción se realizó a 30 °C a 300 rpm en buffer de acetatos 50 mM CaCl<sub>2</sub> 1 mM pH 6 utilizando sacarosa 100 g/L como sustrato. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 600 µl de los cuales 500 µl corresponden a la mezcla entre el buffer y la cantidad de enzima necesaria para llevar a cabo la reacción + 100 µl de sacarosa 100 g/L.

Para lograr determinar la actividad enzimática se tomaron 5 alícuotas de 50 µl c/u en diferentes tiempos de la reacción (0, 2.5, 5, 7.5 y 10 minutos) las cuales se neutralizaron con 50 µl de DNS. Posteriormente, con el objetivo de lograr la reducción de un grupo nitro a un grupo amino las alícuotas se calentaron durante 5 minutos, lo cual provocó el cambio colorimétrico de amarillo a rojo; posterior a esto las muestras se dejaron en hielo durante 5 minutos y se añadieron 500 µl de agua destilada. Finalmente, los azúcares reductores liberados se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro Eppendorf BioSpectrometer Kinetic a 540 nm, empleando una solución equimolar de glucosa-fructosa como estándar. El promedio y la desviación estándar se obtuvieron de mediciones realizadas por triplicado.

La ecuación utilizada para determinar la actividad enzimática fue la siguiente:

$$Act. \text{ enzimática volumétrica } \frac{U}{ml} = (PA_{Enz}) \left( \frac{mg/ml}{PC_{DNS}} \right) \left( \frac{1 \text{ mol}}{180000 \text{ mg}} \right) \left( \frac{1 \times 10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \right) \left( \frac{0.6 \text{ ml}}{V_{enzima}} \right)$$

**Donde:**

PA<sub>Enz</sub>: Pendiente actividad enzimática (UA/min)

PC<sub>DNS</sub>: Pendiente curva de estándar DNS (UA)

V<sub>enzima</sub>: Volumen de enzima utilizada en la reacción (mL)

$$Act. \text{ enzimática específica } U/mg = \frac{Act. \text{ enzimática volumétrica } U/mL}{Concentración \text{ de proteína } mg/mL}$$

La actividad enzimática específica se expresó en términos de U/mg, donde una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima capaz de liberar un μmol de azúcares reductores por minuto.

### 8.6.2 Evaluación del pH óptimo de las versiones truncadas

Para evaluar el pH óptimo en la actividad enzimática de las versiones truncadas se llevaron a cabo ensayos enzimáticos a diferentes valores de pH, por lo cual se utilizó una solución de acetatos 50 mM CaCl<sub>2</sub> 1 mM con un rango de pH entre 4 y 9. Se utilizó 1 U/mL de la enzima purificada y una concentración de sustrato 100 g/L.

### 8.6.3 Evaluación de la temperatura óptima de las versiones truncadas

Para evaluar la temperatura óptima en la actividad enzimática de las versiones truncadas se llevaron a cabo ensayos enzimáticos a condiciones estándar a diferentes temperaturas con un rango de entre 15 y 45 °C. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## 8.7 Identificación y análisis de perfil de productos sintetizados por las versiones truncadas

### 8.7.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

La identificación de productos de las versiones truncadas se realizó por cromatografía en capa fina empleando placas de sílica gel ALUGRAM Xtra SIL G/UV254 10 x 20 cm (Merck). Las placas se corrieron en una cámara vertical de vidrio empleando como fase móvil una mezcla de butanol-etanol-agua (10:6:4, v/v/v). Para lograr el revelado de las placas se utilizó difenilamina-anilina y a partir de aspersion y calentamiento se lograron observar los productos. La identificación de productos se realizó a partir de estándares de FOS tipo levana.

### 8.7.2 Análisis de polímero sintetizado

La cuantificación de polímero se realizó con el análisis de las muestras tomadas en distintos tiempos de reacción a condiciones estándar (30°C, 300 rpm y 100 g/L de sacarosa), para ello se utilizó la asistencia de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-SEC), utilizando la columna Ultrahydrogel linear (7.8 x 300 mm) conectado a ultrahydrogel 500 (7.8 x 800 mm).

### 8.7.3 Análisis de FOS

El análisis de fructooligosacáridos se desarrolló mediante HPAE-PAD, utilizando una columna CarboPac PA-200 (3X50 mm) la cual fue equilibrada a 30 °C con NaOH. Los FOS fueron eluidos con gradiente de concentración compuesta de NaOH y CH<sub>3</sub>COO-NA<sup>+</sup>, a 30°C. La muestra analizada comprendía una composición de 10 µL de reacción y 90 µL de agua destilada, el detector del equipo utilizado era de pulso amperométrico. IV.5.3

## 8.8 Análisis de hidrólisis-transferencia

La cuantificación de azúcares simples (glucosa, fructosa y sacarosa) se realizó con ayuda del equipo HPLC que incluye un detector I.R. La detención se realizó utilizando una columna Hypersil GOLD™ Amino 250 x 4.6 a 30 °C y una fase móvil compuesta por acetonitrilo: agua con un flujo de 1.2 mL/min. Las muestras analizadas comprendían una composición 50:50 de muestra y agua desionizada.

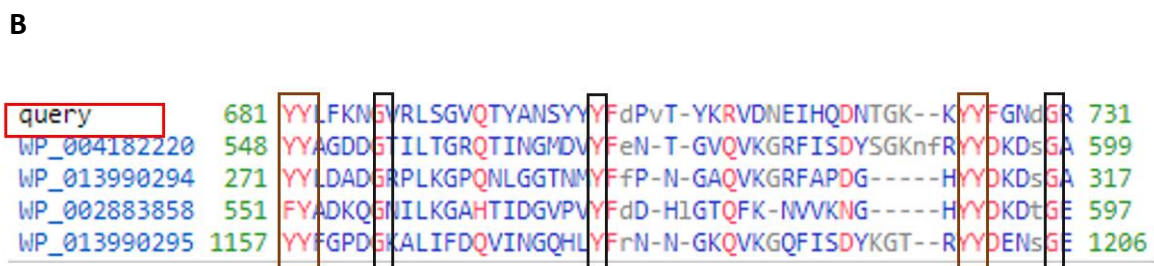
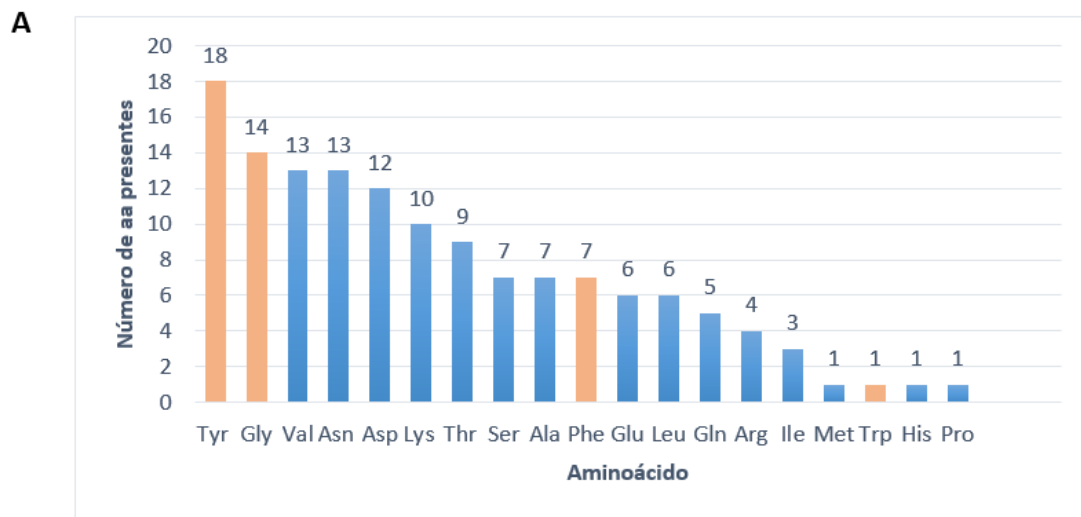
## 9 Resultados y discusión

### 9.1 Análisis *in silico* de la región de transición de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*

Debido a que hasta el momento no se ha dilucidado la estructura cristalográfica de ninguna levansacarasa multidominio, decidimos estudiar la composición aminoacídica de la región de transición empleando el software ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Se encontró que los aminoácidos más abundantes son la tirosina (18 residuos, 13%), glicina (14 residuos, 10 %), valina y asparagina (13 residuos, 9 % cada una) (Figura 15 A). De acuerdo con los análisis realizados por García- Paz en 2019, la región de transición de LevS cuenta con homología a CBMs, los cuales se caracterizan por la presencia de residuos aromáticos y glicinas altamente conservados, estas secuencia repetidas de tirosinas y glicinas son denominadas repetidas YG (Brison *et al.*, 2016).

Con el objetivo de corroborar que dichos residuos pertenecen a las repetidas YG, se realizaron alineamientos logrando identificar 7 residuos conservados los cuales forman 2 grupos de repetidas YG completos y 1 incompleto (Figura 15 B). Estas repetidas ya han sido reportadas en el dominio V de las GNs (Janeček *et al.*, 2000; Kralj *et al.*, 2004), donde se propone su participación en la estabilidad enzimática y en la síntesis de polímeros (Giffard & Jacques, 1994; Rathsam & Jacques, 1998; Suwannarangsee *et al.*, 2007; Kingston *et al.*, 2002). De acuerdo con estas observaciones se propone que estas repetidas puedan llevar a cabo funciones similares en nuestra enzima.



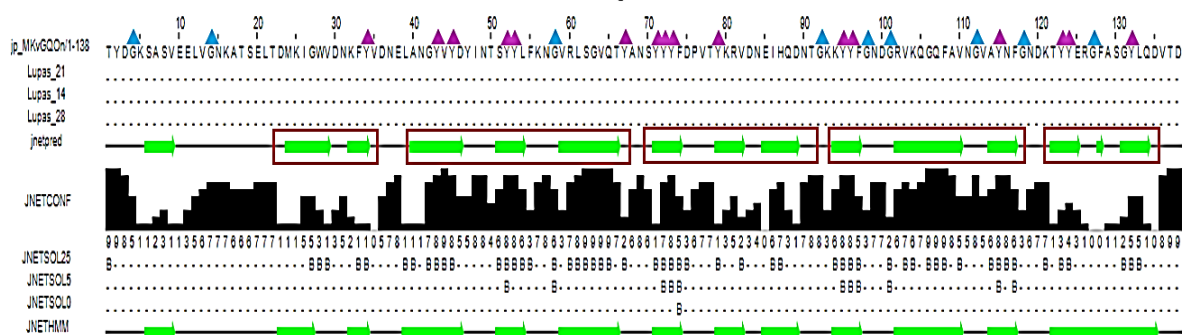


**Figura 15.** Análisis in silico de los residuos presentes en la región de transición. A. Aminoácidos presentes en la región de transición de LevS. B repetidas YG conservadas en la región de transición

Por otro lado, para determinar la estructura secundaria de la región de transición y la exposición de los residuos al solvente se utilizó el servidor JPred4 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>), el cual predice la estructura en función de su composición aminoacídica y similitud con secuencias de estructuras secundarias conocidas (Drozdetskiy *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16, donde se observa que en la estructura secundaria de la región de transición predominan las láminas- $\beta$ , en su mayoría poco expuestas al solvente, de tal forma que se lograron identificar 5

módulos, cada uno de ellos formado por dos o tres láminas  $\beta$  consecutivas conectadas por loops. También se logró observar que el 33.3 % de los residuos de la región de transición se encuentran expuestos al solvente, el 26.8 % parcialmente expuestos y el 39.9% se encuentran poco accesibles al solvente.

Estos resultados son similares a los reportados en los estudios de las repetidas YG del dominio V de las GNs, donde se ha observado que las tirosinas forman parte de láminas  $\beta$  y las glicinas de loops (Leemhuis *et al.*, 2013; Pijning, 2014; Vujičić-Žagar *et al.*, 2010; Brison *et al.*, 2016). Además, dichas láminas  $\beta$  al contener al menos una tirosina, así como valinas y residuos aromáticos, presentan características hidrofóbicas (Brison *et al.*, 2016), lo cual explica porque la mayoría de nuestras láminas  $\beta$  identificadas se encuentran poco expuestas al solvente. Sin embargo, para comprender mejor cómo estos residuos están distribuidos espacialmente se necesitan realizar predicciones sobre el plegamiento de esta región.

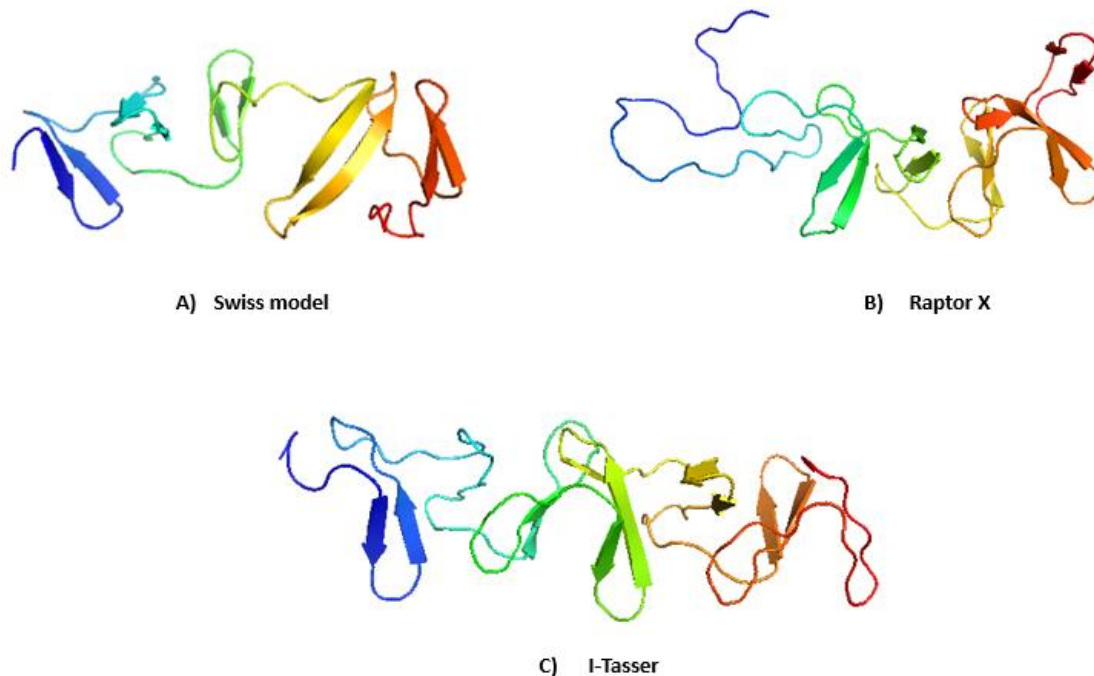


**Figura 16.** Predicción estructura secundaria de la región de transición. La secuencia de la región de transición es la primera en la alineación, mientras que las secuencias restantes son las partes alineadas de los homólogos que se usaron para construir el perfil de secuencia para la predicción. Las flechas verdes indican láminas  $\beta$ , las líneas grises continuas representan loops. Los cuadros rojos indican los módulos identificados. Las barras negras indican la accesibilidad al solvente en donde los niveles de exposición son: 0= expuesto, 3= 25 % accesible, 6= 5 % accesible y 9 enterrado (<5 % expuesto). Triángulos azules: Gly, morados: Tyr.

## 9.2 Predicción del plegamiento de la región de transición de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*

Con el fin de predecir el posible plegamiento de la región de transición de LevS, se realizó un modelado por homología utilizando tres diferentes servidores: I-tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), Raptor X (<http://raptorx.uchicago.edu/>) y Swiss model (<https://swissmodel.expasy.org/>). Cabe mencionar que para la predicción de estructuras no se seleccionó alguna plantilla en especial, por lo cual, cada servidor utilizó un templado diferente para la predicción de los modelos.

Los resultados obtenidos muestran que en el modelo generado por Swiss model (Figura 17-A) se utilizó como templado a una alternansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* y presentó solo el 73.1 % de la secuencia total. Por otro lado, el servidor Raptor X utilizó como templado el dominio de unión a anticuerpos de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* y logró modelar el 100 % de la secuencia (Figura 17-B). Finalmente, el servidor I-tasser también logró modelar el 100 % de la secuencia (Figura 17-C), sin embargo, este servidor utilizó como templado una proteína de unión a lípidos, una fosforilcolina estereasa, la autolisina LytA, así como el dominio de unión a colina C-terminal de *Streptococcus pneumoniae*.



**Figura 17.** Modelos por homología de la región de transición obtenidos con distintos servidores. A) Modelo generado por el servidor Swiss-model, B) modelo generado por el servidor Raptor X y C) modelo generado por el servidor I-tasser.

De acuerdo con estos resultados se decidió descartar el modelo generado por Swiss model ya que solo logró modelar 101 aminoácidos de los 138 que conforman a la región de transición. Por lo tanto, para realizar una elección más apropiada, los modelos de I-tasser y Raptor X fueron analizados con el software PSVS (Protein Structure Validation Suite (<https://montelionelab.chem.rpi.edu/PSVS/>)) empelando el servidor PROCHECK, el cual, utiliza un conjunto de programas que proporcionan una verificación detallada de la estereoquímica de una estructura (modelo). Dicho análisis nos genera gráficos PostScript que analizan la geometría general de cada residuo a partir del grafico de Ramachandran, Z-score y longitud y ángulo de torsión de los enlaces N-C $\alpha$ -C (ángulos  $\Phi$  y  $\Psi$ ) (Laskowski *et al.*, 1993).

El diagrama de Ramachandran proporciona una representación gráfica bidimensional simple en términos de ángulos de torsión, lo cual nos ayuda a determinar la calidad de los modelos. Este diagrama se divide en 4 regiones: Regiones favorecidas, regiones permitidas, regiones parcialmente permitidas y las regiones no permitidas, donde en estas últimas el impedimento estérico está presente entre los átomos, por lo cual su acomodo es imposible en la naturaleza. En la tabla 10, se observan los porcentajes de residuos que se encuentran dentro de estas regiones, un modelo es considerado de buena calidad cuando al menos el 90% de sus residuos se encuentra dentro de las regiones permitidas (Laskowski *et al.*, 1993), por lo cual ambos modelos son considerados de buena calidad.

Por otro lado, el Z-score es una medida que determina la calidad global del modelo, la cual realiza una comparación entre la estructura obtenida y las ya reportadas experimentalmente, es decir, las ya cristalizadas. De acuerdo con el servidor PROCHECK los valores cercanos a -2 del Z-score indican una puntuación aceptable. Conforme a nuestros resultados ambos modelos son considerados como regulares. Asimismo, los valores del ángulo de enlace y de longitud de enlace se tomaron en cuenta, considerándose aceptables los valores de 2.8 ° para el ángulo de enlace y 0.019 Å para la longitud de enlace. De acuerdo con los resultados obtenidos ambos modelos están considerados dentro de esos valores.

Análisis de Ramachandran							
Servidor	Z-score	Regiones favorecidas	Regiones permitidas	Regiones parcialmente permitidas	Regiones no permitidas	Ángulo de enlace	Longitud de enlace
I-tasser	-3.89	64.50 %	28.90 %	2.50 %	4.10 %	2.3 °	.014 Å
Raptor X	-3.98	77.70 %	16.50 %	3.30 %	2.50 %	3.8 °	.02 Å

**Tabla 10.** Análisis en PROCHECK de los modelos generados. Se muestran los servidores utilizados en el modelamiento por homología, seguido del análisis de Ramachandran, ángulo y longitud de enlace.

Debido a que ambos modelos presentan puntuaciones aceptables, con el fin de realizar una elección acertada del modelo final se realizó un análisis de acuerdo con la energía de cada uno de los residuos, sin embargo, ambos seguían teniendo puntuaciones similares, por lo tanto, se consideró necesario analizar a profundidad el método utilizado por cada uno de los servidores para realizar los modelos. Como resultados se encontró que I-tasser utiliza LOMETS, los cuales entre todas sus funciones ayudan a una mejor precisión de estructuras secundarias debido a que abarca una mayor cobertura de estructuras PDB (Protein Data Bank), lo cual le permite realizar una mejor integración de diferentes plantados (Wu & Zhang, 2007). Por otro lado, Raptor X utiliza solo el plantado con la mayor puntuación para predecir el plegamiento. De acuerdo con este análisis se seleccionó como modelo final la predicción obtenida por I-tasser ya que además de realizar una mejor predicción, fue el modelo que correspondía con los análisis mostrados en la figura 16, el cual nos indica que los primeros aminoácidos corresponden a láminas  $\beta$ , lo cual no fue confirmado en Raptor X ya que solo mostró un loop.

De acuerdo con nuestros resultados, el modelo seleccionado presenta un plegamiento solenoide tipo  $\beta$  (figura 18), caracterizado por presentar exclusivamente módulos de láminas  $\beta$  y loops (Vujičić-Žagar *et al.*, 2010; Suwannarangsee *et al.*, 2007; Kingston *et al.*, 2002). Este tipo de plegamiento ya ha sido observado en la autolisina LytA de *S. pneumoniae* (Whatmore & Dowson, 1999), así como el dominio V de la dextranasa DSR-E y de las glucanasa GTF 180 y GTFA, donde se ha reportado la presencia de diversos módulos de unión a glucanos (Pijning, 2014; Leemhuis *et al.*, 2013,).



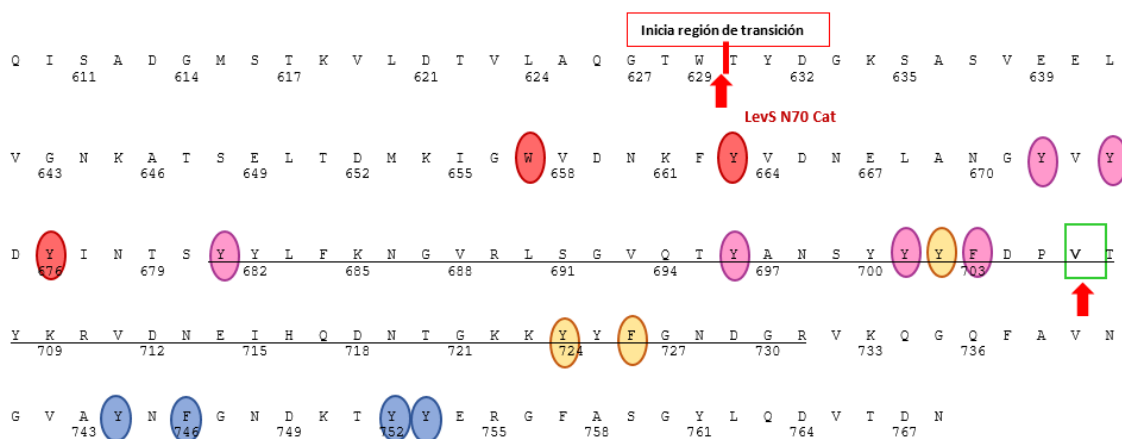
**Figura 18.** Modelo de la región de transición realizado por I-tasser donde se observa un plegamiento tipo solenoide y sus estructuras secundarias. A. Modelamiento de la región de transición de la levansacarasa LevS. Plegamiento tipo solenoide. B. Estructura secundaria: Loops (morado) y laminas  $\beta$  (rojo).

### 9.3 Identificación de posibles módulos de unión a carbohidrato presentes en la región de transición de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*

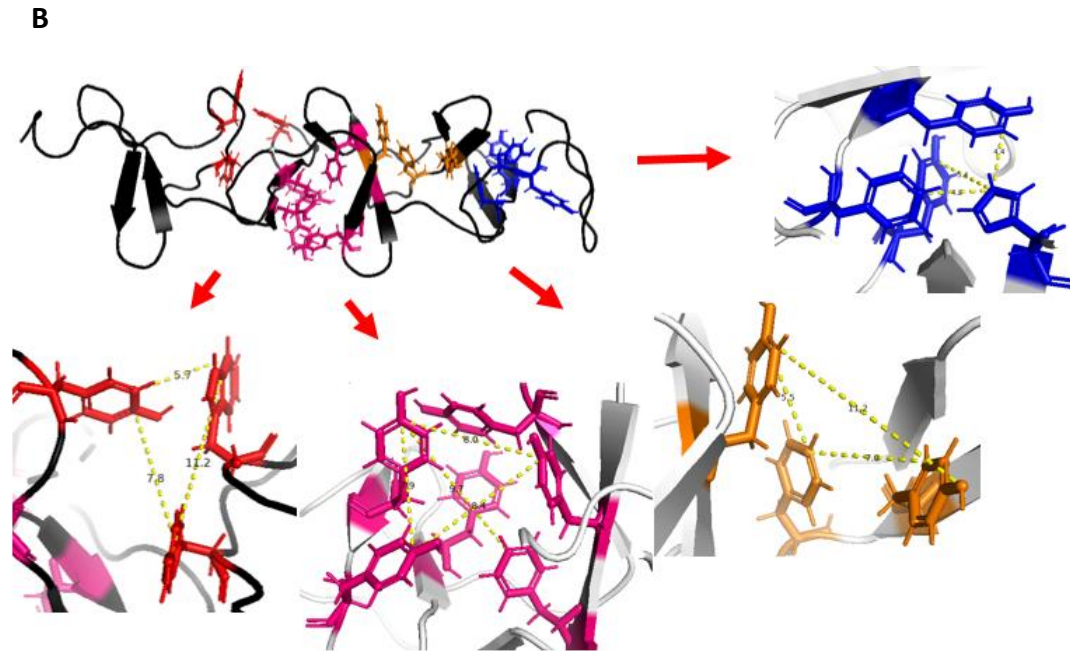
Dentro del plegamiento solenoide de la región de transición de nuestra enzima se identificó que algunas cadenas laterales de aminoácidos aromáticos están formando cavidades hidrofóbicas viendo cara a cara sus anillos, lo cual nos sugiere que puedan estar interaccionando entre sí (Kajava & Steven, 2006; Yoder & Journak, 1995). De acuerdo con estas observaciones en la región de transición se identificaron 4 posibles bolsillos hidrofóbicos (pCBM) formados por 16 residuos aromáticos, estos bolsillos fueron denominados pCBM I, II, III y IV (Figura 19). En particular, los residuos aromáticos 657, 663 y 676 pertenecen al pCBM I, los residuos 672, 674, 681, 696, 701 y 703 al pCBM II, los residuos 702, 724 y 726 pertenecen al pCBM III y los residuos 744, 746, 752 y 753 al pCBM IV, de tal manera que los pCBMs II y III se encuentran formados por residuos aromáticos presentes en la secuencia con homología a CBMs. De hecho, al determinar la distancia entre los anillos aromáticos de cada pCBM, encontramos que en promedio hay una distancia de 7.5 Å, lo que permite la formación de una cavidad del tamaño suficiente para que un monómero de azúcar pueda ser acoplado, ya que un monómero presenta un tamaño de 5 Å aproximadamente (Mathlouthi & Reiser, 1995).

La interacción identificada entre los residuos aromáticos coincide con los bolsillos hidrofóbicos reportados en el dominio V de las GNs, los cuales promueven la interacción de la enzima con las cadenas de polímeros en crecimiento (Brison *et al.*, 2016; Claverie *et al.*, 2017). Recientemente, se identificaron 7 bolsillos en el dominio V de la dextransacarasa DSR-OK (Claverie *et al.*, 2020) y se demostró que los más cercanos al sitio catalítico juegan un papel importante en la síntesis de polímeros. Estas observaciones resultan muy interesantes ya que los bolsillos identificados en este trabajo al estar cercanos al sitio catalítico podrían participar de la misma manera, en la síntesis de polímero y unión de glucanos, sin embargo, para demostrar dicha hipótesis es necesario profundizar en su estudio a través de ensayos fisicoquímicos de afinidad de ligando por calorimetría diferencial de barrido, geles de retardo o revelar la estructura cristalográfica de nuestra enzima.

**A**







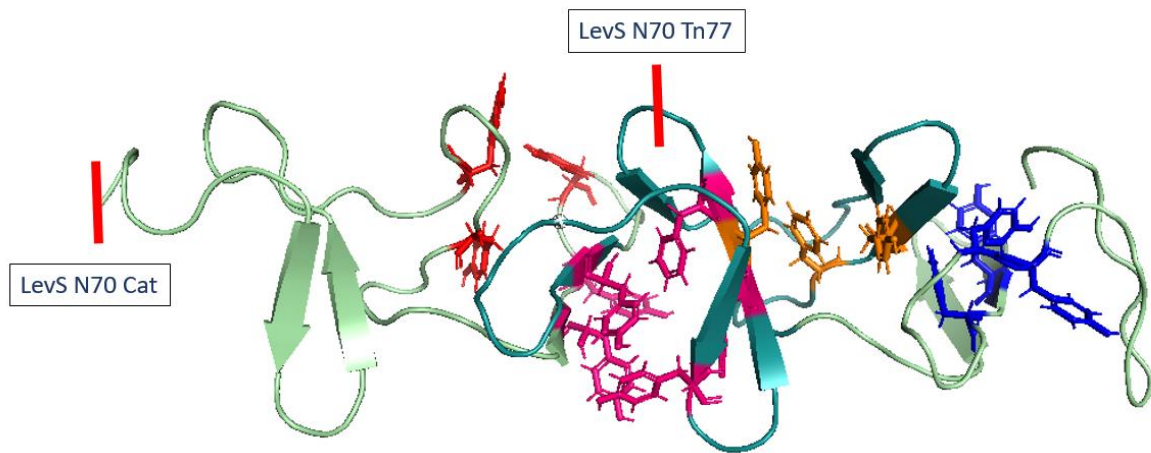
**Figura 19.** Identificación de posibles CBMs. A. Secuencia aminoacídica de la Tn en la cual se observan los posibles bolsillos hidrofóbicos, así como la secuencia con homología a CBMs. B. Modelo con posibles interacciones de aminoácidos aromáticos encontradas dentro de la región de transición. Identificación de 4 pCBMs: pCBM I (Rojo), pCBM II (Rosa), pCBM III (Anaranjado) y pCBM IV (Azul).

#### 9.4 Diseño de las versiones truncadas de la región de transición de la levansacarasa LevS

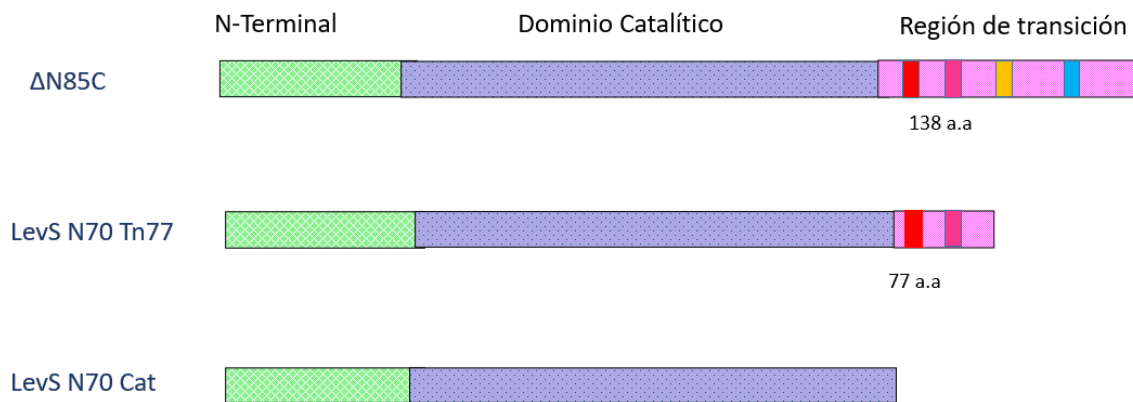
Con el objetivo de delimitar la zona mínima suficiente para mantener la función de la región de transición, se diseñaron dos versiones truncadas (figura 20). La primera versión truncada se nombró LevS N70 Tn77 por la nomenclatura: LevS como referencia a levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides*, N70 y Tn77 por presentar 70 y 77 aminoácidos en su dominio N-terminal y en la región de transición, respectivamente. En esta versión truncada se eliminaron 2 pCBMs dejando solo dos de ellos (I y II), además, se interrumpió y eliminó la mitad de su secuencia con homología a CBMs de las glucansacarasa. La segunda versión truncada fue nombrada LevS N70 Cat, esta vez la abreviación Cat se refiere a que posterior

a los 70 aminoácidos del N-terminal se presenta el dominio catalítico, en esta ocasión se eliminó en su totalidad la región de transición, por lo cual, a diferencia de LevS N70 Tn77 no presenta ningún pCBM. Ambas enzimas permitirán analizar la importancia de los pCBM, además de estudiar si los cuatro pCBMs son necesarios para llevar a cabo la reacción de transfructosilación y mantener la procesividad de la enzima.

**A**



**B**

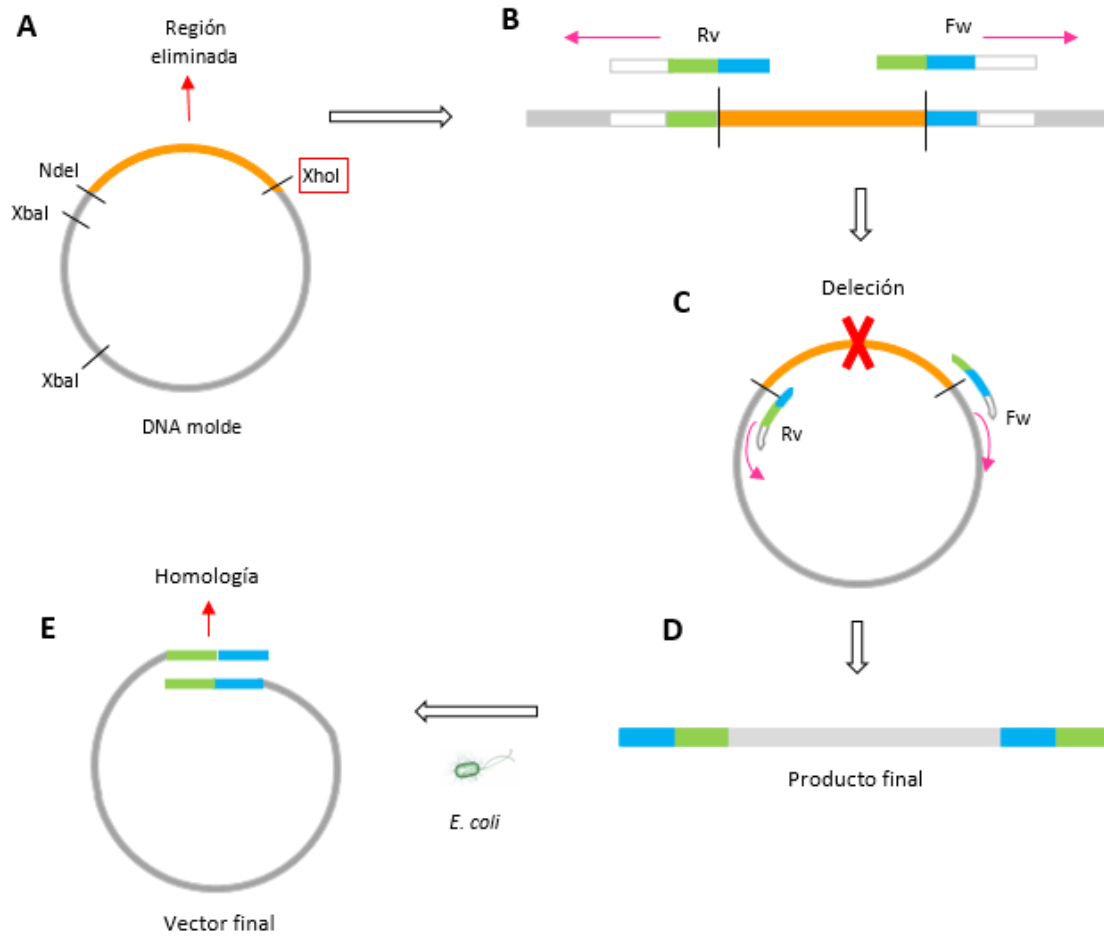


**Figura 20.** Posible estructura de la región de transición y arquitectura de las versiones truncadas construidas en este trabajo. A. Modelos con posibles bolsillos hidrofóbicos en el cual se indican los sitios de truncamiento. B. Estructura lineal de las versiones truncadas.

## 9.5 Construcción de las versiones truncadas

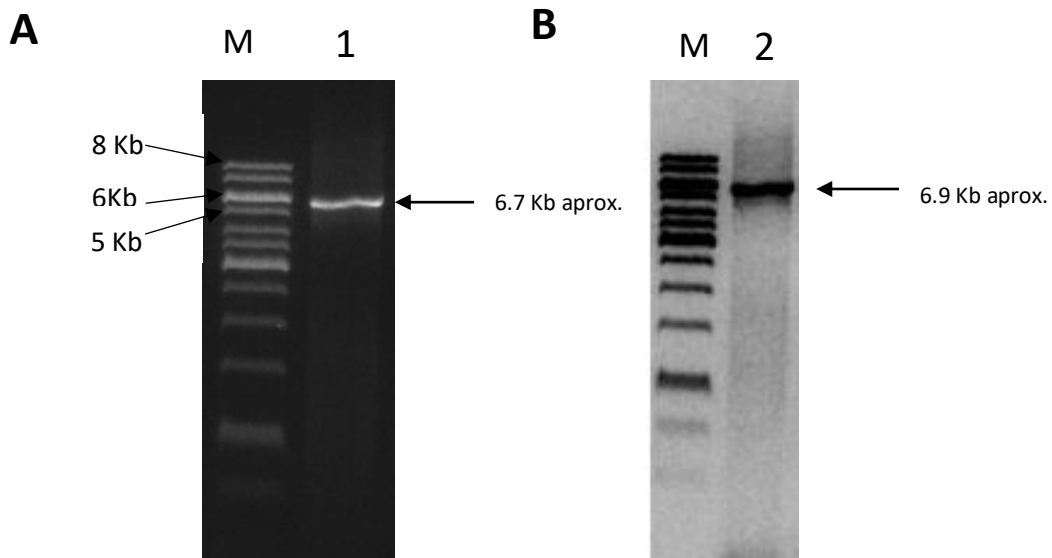
La construcción de las versiones truncadas se realizó usando un método de amplificación tipo Quick-Change, el cual consiste en la delección de una región de interés (Figura 21 A) a partir del diseño de oligonucleótidos parcialmente sobrelapados (Xia & Xun, 2017). Para esta técnica se utilizó como templado un vector que contiene el gen codificante para la versión truncada  $\Delta N85C$ , clonada bajo el promotor T7 y cuya expresión es regulada por IPTG (Martínez-Bahena, 2019). Para la PCR se utilizaron polimerasas de alta fidelidad con el fin de evitar mutaciones y obtener productos precisos, consiguiendo hasta un 95% de colonias positivas en la transformación (materiales y métodos).

Para el diseño de los oligonucleótidos parcialmente sobrelapados se seleccionaron 10 nucleótidos de la secuencia del DNA que flanquea la región a eliminar (Figura 21 B) y se añadieron a la secuencia del oligonucleótido contrario, generando así, las secuencias parcialmente sobrelapadas. Debido a que los oligonucleótidos no incluyen la región a eliminar, durante la amplificación dicha zona es omitida (amplicon), tal como lo muestra la figura 21 C. El amplicon contiene extremos complementarios (Figura 21 D), lo que permite que durante la transformación en *E. coli* se circularice por complementariedad de secuencias, obteniendo un vector final totalmente circularizado (figura 21 E).



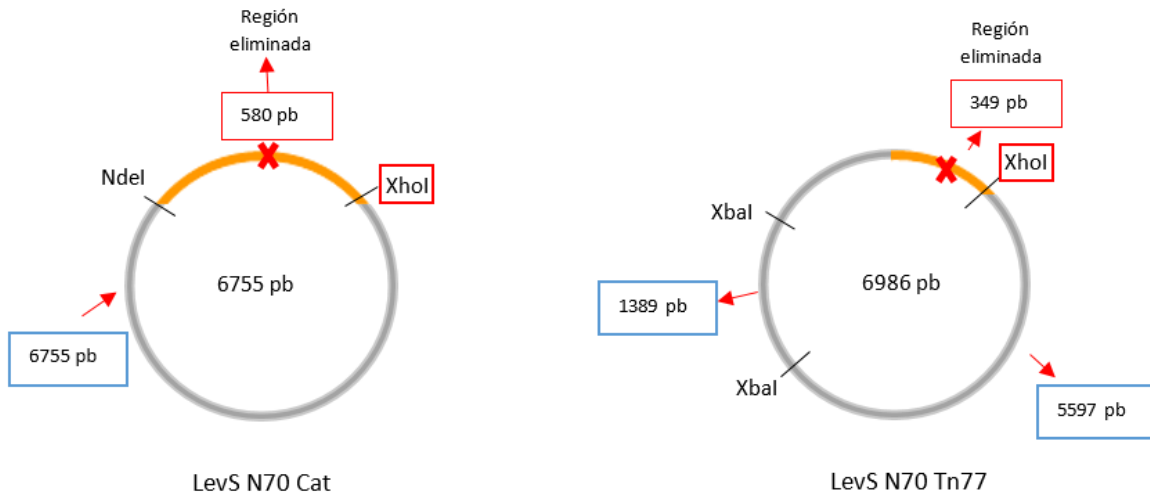
**Figura 21.** Construcción del plásmido que codifica para las versiones truncadas a partir del método tipo Quick-Change. Modificado de Xia & Xun, 2017.

Con el fin de corroborar la correcta amplificación del fragmento de interés, una vez concluida la PCR se llevó a cabo una electroforesis de ácidos nucleicos en un gel de agarosa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22, en donde para ambas enzimas se observó la presencia de una única banda en el peso esperado, para la versión truncada LevS N70 Cat el peso esperado fue de 6.7 Kb y para LevS N70 Tn77 de 6.9 Kb. Posteriormente, con el objetivo de eliminar el DNA molde metilado, que por ser de origen bacteriano se encuentra en esta forma, se realizó una digestión del producto de PCR con la enzima de restricción DpnI y enseguida se transformó en células *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se seleccionaron colonias candidatas y se realizó un preinoculo de las mismas.



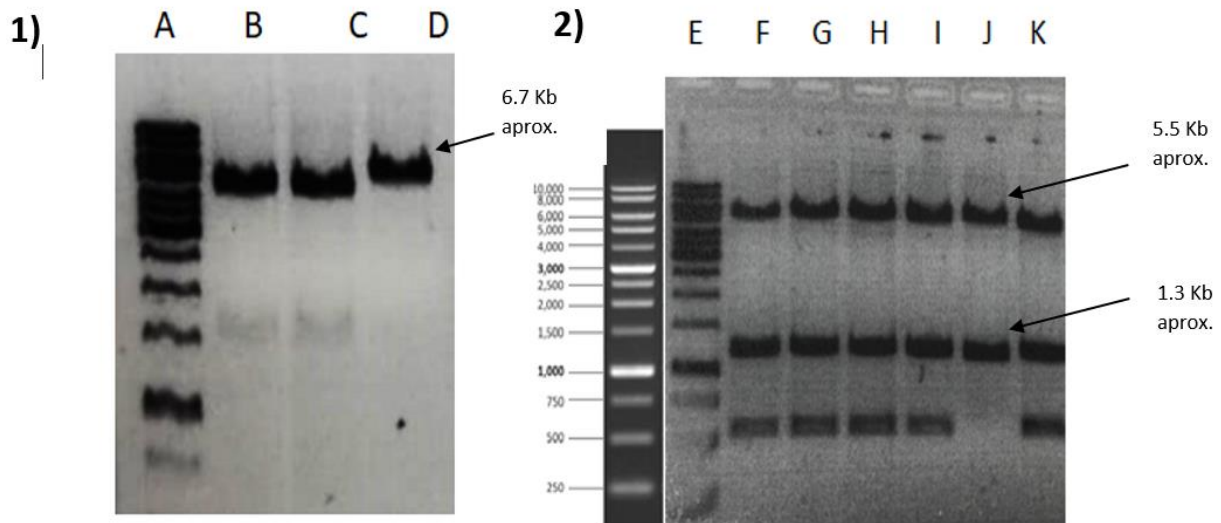
**Figura 22.** Amplicon obtenido por la PCR de las construcciones que codifican para las versiones truncadas. A) En el carril 1 se observa el amplicon que codifican para la versión truncada LevS N70 Cat, en donde se aprecia una única banda en el peso esperado de 6.7 Kb y B) En el carril 2 se observa el amplicon que codifican para la versión truncada LevS N70 Tn77, donde se aprecian una banda con el peso esperado de 6.9 Kb.

Con el objetivo de analizar las clonas candidatas se llevó a cabo la extracción de plásmido y se realizó una doble digestión con enzimas de restricción esperando obtener un patrón de bandas que confirmara a las clonas positivas. Las clonas examinadas para LevS N70 Cat fueron digeridas con las enzimas XhoI y NdeI, esperando que únicamente la enzima NdeI digiriera el DNA, permitiendo obtener una única banda con un peso de 6.7 Kb para las clonas positivas ya que como consecuencia del truncamiento total de la región de transición durante su amplificación se perdió el sitio de restricción XhoI (Figura 23 A).



**Figura 23.** Vectores de las versiones truncadas. Sitios de restricción perdidos. A. LevS N70 Cat; B. LevS N70 Tn77.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24 (1), donde la candidata número 2 fue positiva al presentar una única banda de 6.7 Kb correspondiente al patrón de digestión esperado. Por otro lado, para las clonas candidatas de la versión truncada LevS N70 Tn77 se realizó una doble digestión con las enzimas XhoI y XbaI, esperando un patrón de digestión de 2 bandas para las clonas positivas, una con un peso de 5.5 Kb y 1.3 Kb (debido a que esta construcción tiene dos sitios XbaI), ya que al igual que la truncada LevS N70 Cat está perdió el sitio de restricción para enzima XhoI (Figura 23 B). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24 (2), en donde la candidata número 4 fue positiva al presentar dos únicas bandas de 5.5 y 1.3 Kb correspondiente al patrón de digestión esperado.



**Figura 24.** Patrón de digestión de las versiones truncadas. 1) LevS N70 Cat: el carril A y E corresponde al marcador de peso molecular, en el carril B y F se observa la digestión del plásmido parental utilizado como templado, el cual nos sirve como control positivo. En los carriles C y D se muestra la digestión de las clonas candidatas, en donde solo una de ellas mostró el patrón de digestión esperado (carril D). 2) LevS N70 Tn77: los carriles G - K corresponden a las 5 clonas candidatas en donde solo una de ellas mostro la liberación de las dos bandas esperadas, la cual se observa en el carril J.

Con el objetivo de verificar que la secuencia de las construcciones fuera correcta y no presentara mutaciones, se obtuvo la secuencia de los plásmidos que codifican para las versiones truncadas. Debido a que el tamaño de las construcciones era de  $\approx 7000$  pb, con el fin de que fuera cubierta el total de la secuencia fue necesario secuenciar ambos extremos (materiales y métodos). Posteriormente, se integraron las dos secuencias obtenidas y se analizaron mediante un análisis de BLAST utilizando la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La construcción LevS N70 Cat fue correctamente amplificada, sin embargo, para la construcción LevS N70 Tn77 se identificó una mutación silenciosa, debido a que el cambio de base en el codón codifica para el mismo aminoácido, por lo cual, no presentó un problema para los trabajos posteriores.

## 9.6 Expresión y purificación de las versiones truncadas

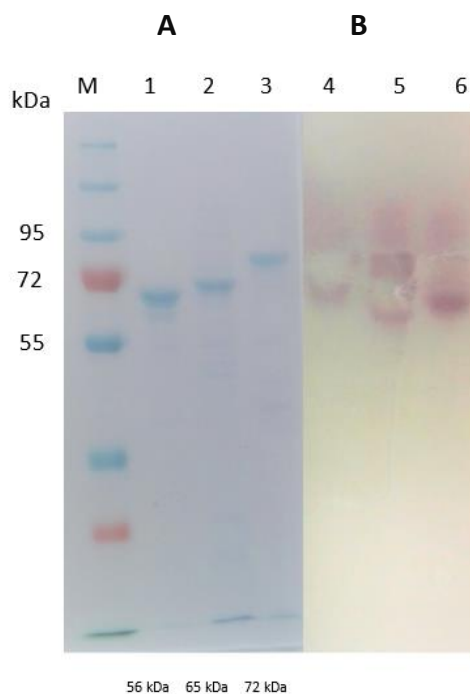
El plásmido correspondiente para cada versión truncada fue transformado en células electrocompetentes *E. coli* BL21, cepa óptima para la expresión de proteínas recombinantes del sistema pET22, vector en el que se encuentra clonados los genes que codifican para las versiones truncadas. De las clonas obtenidas se realizó un preinoculo para llevar a cabo una fermentación de 1L, adicionando ampicilina como marcador de selección. Cuando la fermentación alcanzó una densidad óptica de 0.6 UA a 600 nm, fue inducida con IPTG durante 8 horas. Posterior a esto las células fueron cosechadas por centrifugación y lavadas con buffer de fosfatos 10mM pH 6, una vez obtenido el pellet de las células se procedió a la lisis y purificación.

Debido a que el tag de histidinas fue eliminado durante la amplificación, para lograr purificar a la enzima por otro método diferente a cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), se empleó una cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna con resina DEAE<sup>+</sup>, método en el cual se utilizó un gradiente escalonado de 10, 250 y 350 mM de buffer de fosfatos pH6, recuperando de esta forma fracciones con nuestra enzima de interés enriquecida. Con las fracciones obtenidas de la purificación se realizó un ensayo de azúcares reductores por DNS, esto, para identificar aquellas fracciones en las que se encontraba nuestra proteína de interés para concentrarlas por ultracentrifugación.

Para determinar el grado de pureza de las fracciones seleccionadas y previamente concentradas, se realizó un gel de acrilamida SDS-PAGE. En la Figura 25 se observan proteínas recombinantes enriquecidas, las cuales presentan pesos moleculares de 56 kDa para la truncada LevS N70 Cat, 72 kDa para  $\Delta$ N85C y 65 kDa para LevS N70 Tn77. Además, observamos que las proteínas presentan un grado de pureza de 80% (LevS N70 Cat) y 75% ( $\Delta$ N85C y LevS N70 Tn77), debido a la presencia de bandas con pesos moleculares menores al de las versiones truncadas, probablemente producto de la proteólisis de las enzimas. Con el fin de determinar si nuestras enzimas se encontraban activas y eran capaces de producir polímero se realizó un zimograma, con el cual se corroboró que después del método de



purificación tanto  $\Delta N85C$  como las 2 versiones truncadas eran activas y capaces de producir polímero.



**Figura 25.** Gel SDS-PAGE y Zimograma. A. Enzimas purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico. B. Zimograma; M. Marcador, 1 y 4. LevS N70 Cat, 2 y 5 LevS N70 77Tn, 3 y 6  $\Delta N85C$ .

Con el fin de evaluar la eficiencia del método de purificación desarrollado, se elaboraron tablas de rendimiento para cada una de las versiones truncadas. En la Tabla 11, podemos observar que la enzima con mayor rendimiento de purificación es la truncada LevS N70 Cat, ya que presenta un rendimiento del 31.6% en comparación con LevS N70 Tn77 y  $\Delta N85C$  que muestran un rendimiento del 9.2 y 5.5 %, respectivamente. Por otro lado, se observó que LevS N70 Cat además de presentar el mayor porcentaje de pureza, rendimiento y factor de purificación, es la enzima en la que se pierden menor número de unidades de enzima durante la concentración por ultracentrifugación. Los resultados obtenidos muestran que, a pesar del grado de pureza final, el rendimiento mediante este método de purificación es de 5.5 a 32.2 % que es considerado bajo, por lo cual para lograr optimizarlo se podría

emplear alguna modificación futura, ya sea en el pH o en el tipo de resina utilizada, sin embargo, para los fines de este trabajo la cantidad de enzima recuperada es suficiente para realizar los ensayos posteriores.

**A**

Enzima	Proceso de purificación	Actividad total (U)	Proteína (mg)	Act. Específica U/mg	Rendimiento %	Factor de purificación
	Antes de purificar	9113	220	41.42	100	1
<u><math>\Delta</math>N85C</u>	Cromatografía intercambio aniónico DEAE <sup>+</sup>	533	20.87	61.32	5.8	1.5
	Concentrado y diálisis	503	1.68	314.7	5.5	7.5

**B**

Enzima	Proceso de purificación	Actividad total (U)	Proteína (mg)	Act. Específica U/mg	Rendimiento %	Factor de purificación
	Antes de purificar	15728	6.78	57.97	100	1
<u>LevS N70 Tn77</u>	Cromatografía intercambio aniónico DEAE <sup>+</sup>	1444	1.18	306.4	9.2	5.3

**C**

Enzima	Proceso de purificación	Actividad total (U)	Proteína (mg)	Act. Específica U/mg	Rendimiento %	Factor de purificación
	Antes de purificar	3838	5.5	31.09	100	1
<u>LevS N70 Cat</u>	Cromatografía intercambio aniónico DEAE <sup>+</sup>	1235	5.06	229.52	32.2	7.4
	Concentrado	1214	0.84	314.93	31.6	10.12

**Tabla 11.** Tablas de rendimiento de las enzimas purificadas **A.**  $\Delta$ N85C, **B.** LevS N70 Tn77 y **C.** LevS N70 Cat.

## 9.7 Estudio de la actividad de las versiones truncadas

De acuerdo con los resultados obtenidos en las tablas de rendimiento, se decidió determinar la actividad específica tanto de  $\Delta N85C$  como de las dos versiones truncadas (Tabla 12). Nuestros resultados fueron sorprendentes y muy interesantes, ya que no se logró observar un cambio significativo en la actividad enzimática global aún en la enzima que carece totalmente de la región de transición. Este fenómeno coincide con lo reportado en algunas levansacararas (Tieking *et al.*, 2005) e inulosacararas (Olivares-Illana *et al.*, 2003). Sin embargo, existen reportes contradictorios en las GNs, donde se observó que al truncar repetidas YG del dominio C-terminal se presentó una disminución drástica en la actividad específica (Kralj *et al.*, 2004). Debido a que esta actividad está dada, tanto por la actividad hidrolítica como la actividad transferasa, es necesario realizar ensayos de especificidad H/T y caracterización bioquímica para comprender la participación de los pCBMs en nuestra enzima.

Enzima	Actividad volumétrica (U/mL)	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)
<u><math>\Delta N85C</math></u>	286 $\pm$ 27.37	.84 $\pm$ .007	317.85 $\pm$ 31.98
<u>LevS N70 Tn77</u>	372 $\pm$ 15.5	1.08 $\pm$ .16	306.42 $\pm$ 29.36
<u>LevS N70 Cat</u>	384 $\pm$ 2.12	1.27 $\pm$ .134	314.93 $\pm$ 37.69

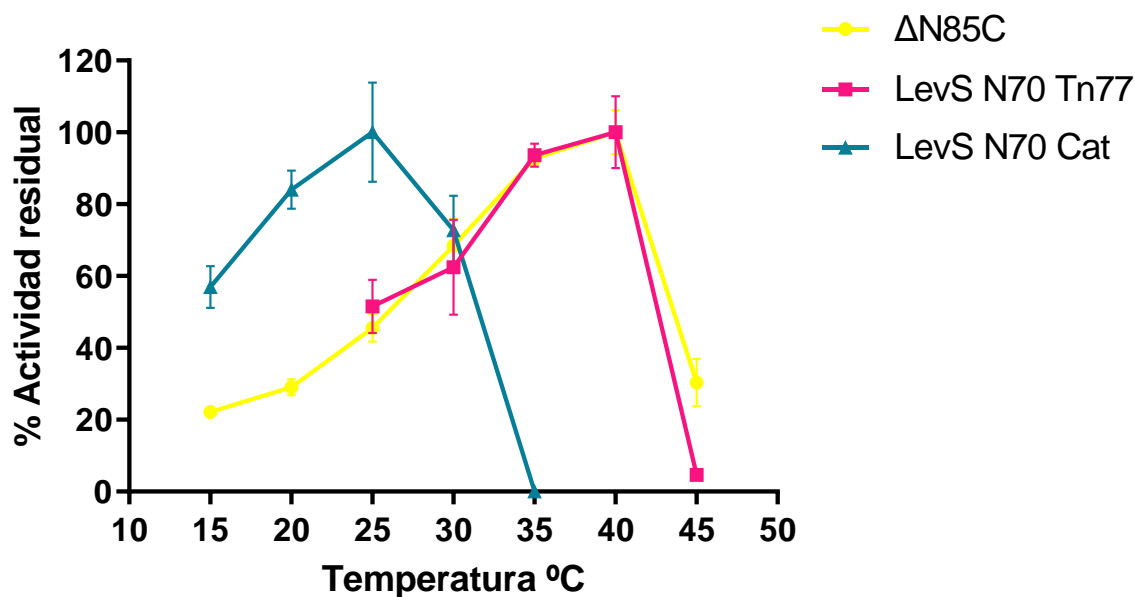
**Tabla 12.** Actividad enzimática de las versiones truncadas. La actividad volumétrica y la concentración de proteína se representan en mL y mg de enzima pura. La enzima pura se recuperó en un volumen de 3 mL.

## 9.8 Caracterización bioquímica de las versiones truncadas

Con el objetivo de determinar la importancia de los pCBMs en las propiedades bioquímicas de LevS se evaluó el pH y temperatura óptima de las versiones truncadas. Para ello, con las

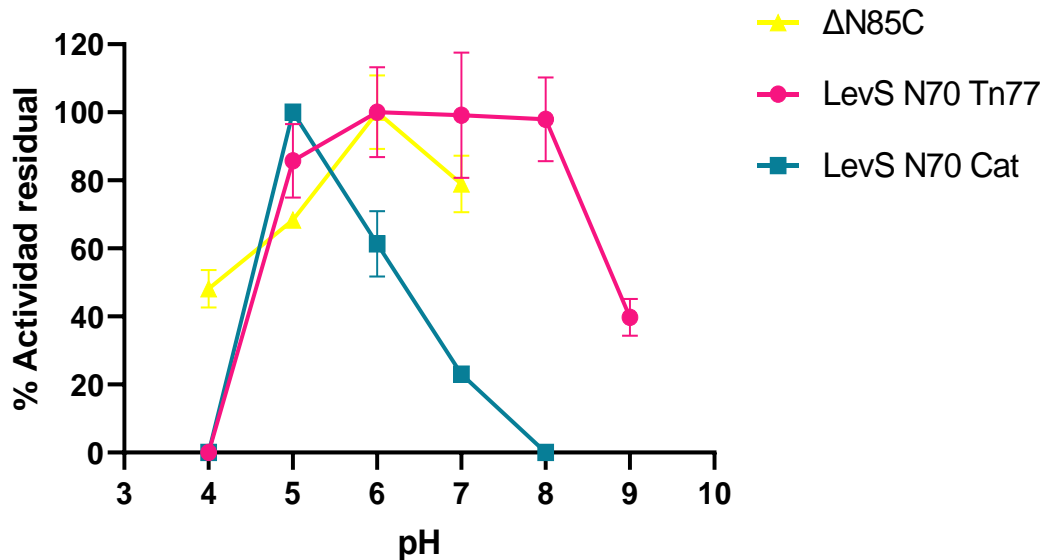
proteínas puras se realizaron ensayos de actividad enzimática utilizando una solución de acetatos 50 mM CaCl<sub>2</sub> 1mM a distintos pHs (pH de 4 a 9), así como a diferentes rangos de temperatura (15 a 45°C). Respecto a los ensayos en este trabajo se caracterizó a las versiones truncadas LevS N70 Tn77 y LevS N70 Cat, ya que la caracterización de la enzima ΔN85C fue realizada anteriormente por Ramírez-Torres en 2019.

Los estudios para determinar la temperatura óptima de las versiones truncadas se muestran en la figura 26, en donde observamos que la actividad de la versión truncada LevS N70 Tn77 a diferentes temperaturas muestra un patrón similar a ΔN85C, donde ambas enzimas funcionan a una temperatura óptima de 40°C y una disminución del 50% de su actividad a los 25° C. Por otro lado, cuando se analizó la actividad de LevS N70 Cat observamos que su temperatura óptima es de 25° C, 15°C menos en comparación con ΔN85C y LevS N70 Tn77. En particular, nuestros resultados indican que la ausencia de los pCBMs III y IV no afecta la temperatura óptima de ΔN85C, mientras que los pCBMs I y II si participan en esta propiedad.



**Figura 26.** Temperatura óptima de ΔN85C y versiones truncadas. Reacciones 1U/ml, 300rpm pH 6. Datos de ΔN85C determinados por Ramírez-Torres, 2019.

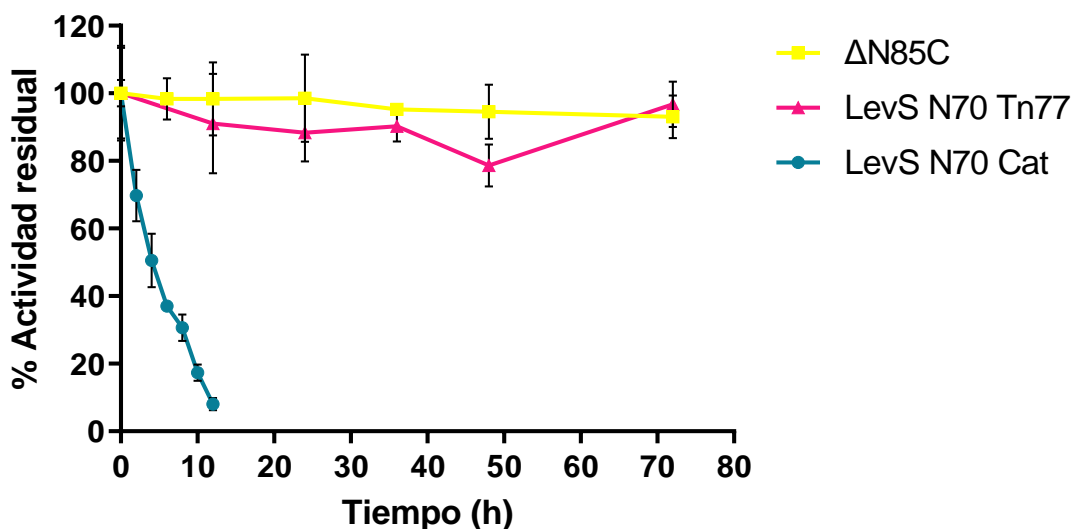
Por otro lado, los análisis para determinar el pH óptimo de las versiones truncadas se muestran en la figura 27 en donde se observa que al igual que  $\Delta N85C$ , LevS N70 Tn77 presenta un pH óptimo de 6. En contraste, encontramos que la versión truncada LevS N70 Cat que carece de la región de transición presenta un pH óptimo de 5, sugiriendo que de nuevo los pCBMs I y II, afectan las propiedades bioquímicas de la enzima. Los resultados de este trabajo son contrarios a lo reportado en GNs, en donde no se observa un cambio aparente en el pH y temperatura óptima después del truncamiento del dominio V (Meng *et al.*, 2015; Monchois *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2017). De acuerdo con estas observaciones la variación tanto en el pH como en la temperatura óptima de LevS N70 Cat posiblemente se deba a la pérdida de estabilidad enzimática, es decir, a un cambio en su estructuración como, por ejemplo, la pérdida de interacciones intramoleculares tal y como se ha observado en algunas fructansacarosas (Del Moral *et al.*, 2008; Mercado, 2020; Privolov & Gill, 1988). Sin embargo, para corroborar esta hipótesis es necesario realizar ensayos de termoestabilidad de las versiones truncadas de LevS.



**Figura 27.** pH óptimo de  $\Delta N85C$  y versiones truncadas. Reacciones 1U/ml, 300rpm 30°C. Datos de  $\Delta N85C$  determinados por Ramírez-Torres, 2019.

## 9.9 Estabilidad de las versiones truncadas

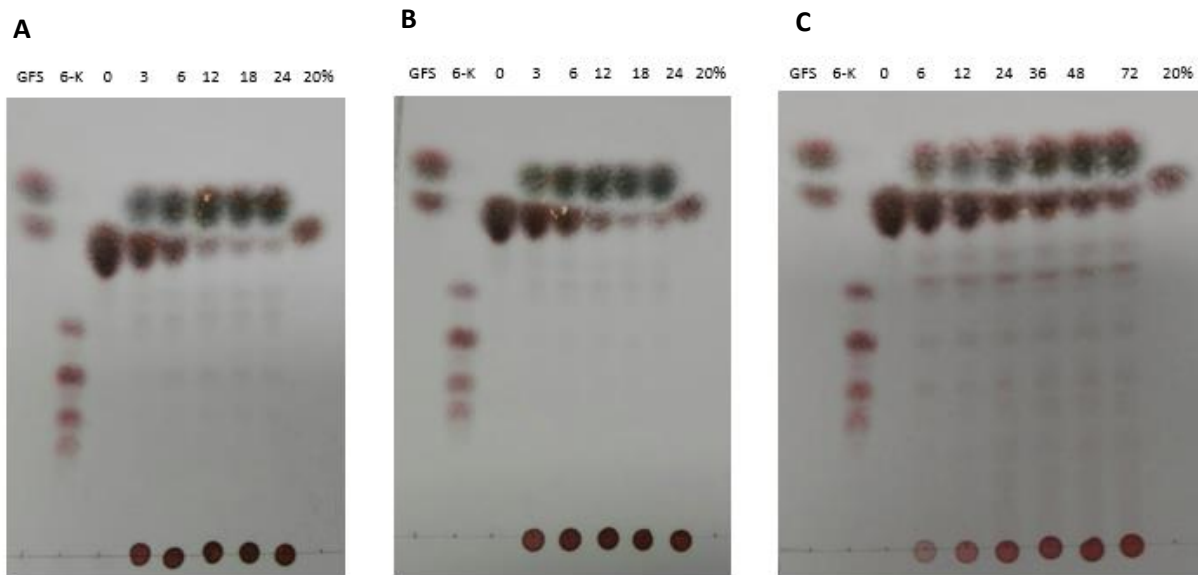
Con el propósito de evaluar la participación de los pCBMs en la estabilidad de la levansacarasa LevS, se realizaron ensayos de termoestabilidad utilizando proteínas puras a 30° C. Los datos obtenidos se presentan en la figura 28, en donde observamos que  $\Delta N85C$  y LevS N70 Tn77 a las 72 horas poseen el 93% y 96% de actividad residual, respectivamente. Por otro lado, LevS N70 Cat a las 12 horas solo presenta el 8% de su actividad residual, lo que equivale a una disminución de 90% en 12 horas. De esta manera se determinó que el tiempo de vida media para LevS N70 Cat es de 4 horas, mientras que para  $\Delta N85C$  y LevS N70 Tn77 es mayor a 72 horas. En conclusión, se sugiere que los pCBMs III y IV no participan en la estabilidad de  $\Delta N85C$ , mientras que los pCBMs I y II si participan en esta propiedad, pues en su ausencia disminuye drásticamente el tiempo de vida media. Estos resultados concuerdan con lo ya reportado en fructansacarosas y  $\alpha$ -amilasas, en donde la estabilidad se ve fuertemente afectada después del truncamiento del dominio B y C-terminal, así como en la mutagénesis de los residuos formadores de puentes de hidrogeno y bolsillos hidrofóbicos que actúan como subsitios de unión a sustrato (Wang *et al.*, 2017; Del Moral *et al.*, 2008; Olivares-Illana *et al.*, 2003; Rathsam & Jacques, 1998; Khemakhem *et al.*, 2009). Es probable que la pérdida de estabilidad se deba a una disminución en la interacción del dominio C-terminal con el dominio catalítico (Del Moral *et al.*, 2008), lo cual llevaría a la pérdida de puentes de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas que favorecen la termoestabilidad de la enzima principalmente al reducir la desnaturalización de la cadena proteica (Ge *et al.*, 2018; Van Den Burg *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2019).



**Figura 28.** Estabilidad de almacenamiento de  $\Delta N85C$  y versiones truncadas. Reacciones 1U/ml, 30°C 300rpm.

### 9.10 Análisis cualitativo de las reacciones desarrolladas por las versiones truncadas

Con el objetivo de determinar el efecto de la eliminación de los bolsillos hidrofóbicos en la actividad enzimática se analizó, en primer término, la cinética de reacción de las versiones truncadas mediante cromatografía en capa fina (TLC). En las placas utilizadas se cargaron las muestras tomadas a diferentes tiempos de reacción las cuales se llevaron a cabo a condiciones estándar. En la figura 29 se observa que las enzimas  $\Delta N85C$  y LevS N70 Tn77 a las 18 horas de reacción son capaces de consumir la mayor parte del sustrato en comparación con la truncada LevS N70 Cat que a las 72 horas parece no consumir la misma cantidad de sustrato que las otras enzimas. En cuanto a la síntesis de productos de reacción, podemos observar que las tres enzimas tienen la capacidad de producir polímero y FOS, sin embargo, es necesario realizar la cuantificación de los productos para determinar las diferencias en cuanto a la cantidad de productos y su naturaleza. En conclusión, se observó que la ausencia de los pCBMs no inhibe la síntesis de polímero y FOS, sin embargo, sí parece afectar la velocidad en el consumo de sustrato.



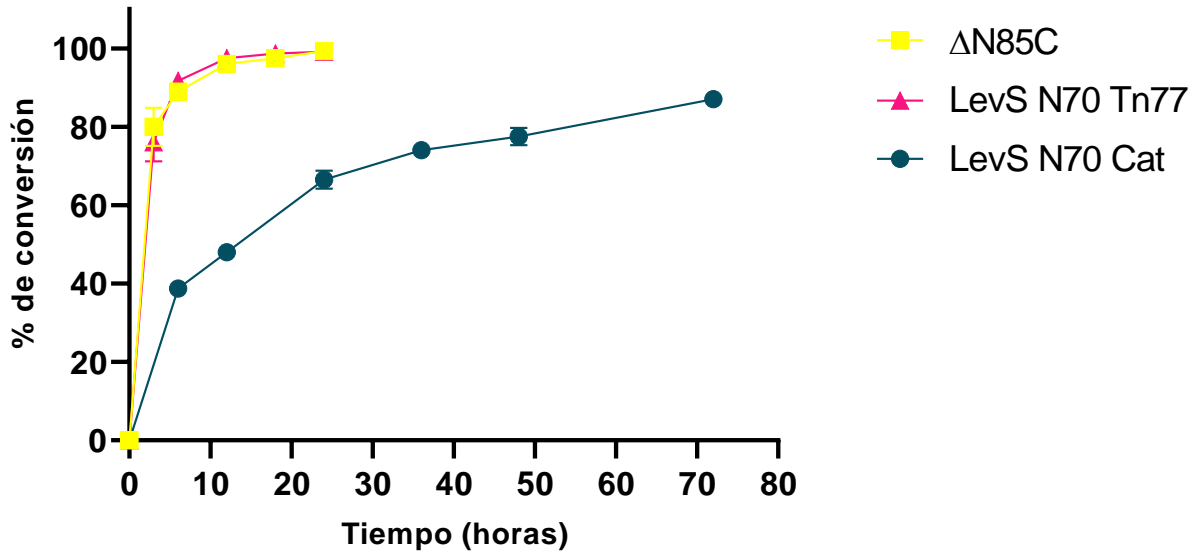
**Figura 29.** Análisis cualitativo de las reacciones desarrolladas por las versiones truncadas. Reacciones 1U/ml, 30°C 300rpm. A.  $\Delta$ N85C; B. LevS N70 Tn77; C. LevS N70 Cat. Cromatografía en capa fina (TLC).

Por otro lado, con el objetivo de determinar la conversión de sustrato durante la reacción, se realizó la cuantificación de sacarosa y la liberación de monosacáridos (Glu-Fru). En la figura 30 se muestra el consumo de sustrato a través del tiempo de las versiones truncadas, encontrando que las enzimas  $\Delta$ N85C y LevS N70 Tn77 a las 6 horas de reacción logran consumir más del 80% de la sacarosa, mientras que la enzima LevS N70 Cat hasta las 72 horas logra consumir ese porcentaje de conversión.

En conclusión, estos resultados sugieren que los pCBMs III y IV no participan en la capacidad enzimática, mientras que los pCBMs I y II están involucrados en la velocidad de reacción. La determinación de las constantes cinéticas es un análisis indispensable para demostrar esta hipótesis, sin embargo, este estudio queda como perspectiva de este trabajo. El cambio observado en el consumo de sustrato coincide con lo reportado en GNs (Kingston *et al.*, 2002; Claverie *et al.*, 2019; Monchois *et al.*, 1998), en donde se sugiere que la disminución en la velocidad enzimática al eliminar el dominio V en estas enzimas, probablemente se



debe a una disminución en la estabilidad y afinidad de los sustratos aceptores, lo cual provocaría que la actividad sea más lenta (Pijning *et al.*, 2011).



**Figura 30.** Consumo de sustrato a través del tiempo de las versiones truncadas.

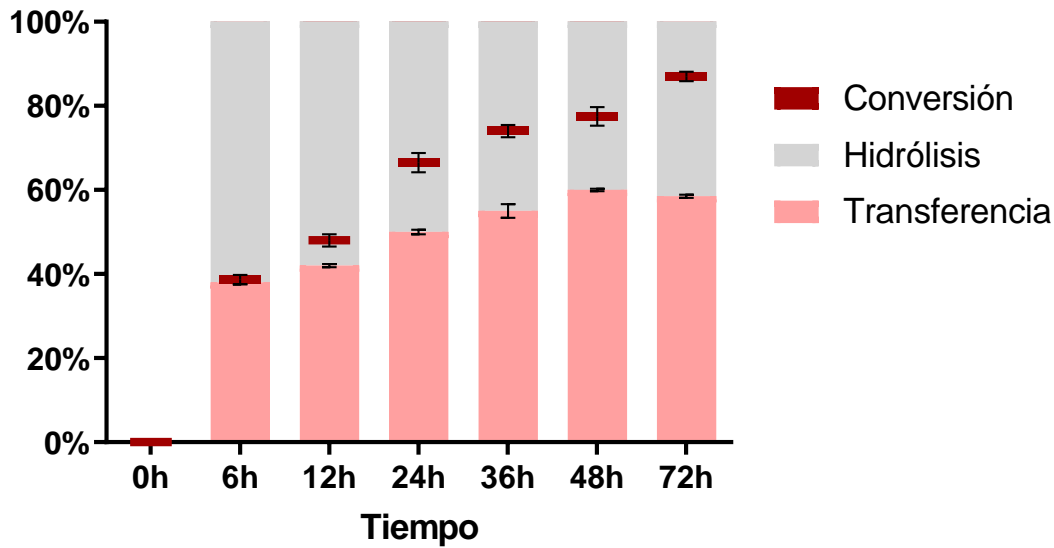
### 9.11 Análisis de la especificidad de las versiones truncadas hacia la reacción de hidrólisis y transferencia (H/T)

Con el fin de comparar la especificidad de las enzimas hacia las reacciones de hidrólisis-transferencia, se analizaron los datos obtenidos al mismo porcentaje de conversión de sustrato (Figura 31). Los resultados encontrados muestran que las enzimas  $\Delta N85C$  y LevS N70 Tn77 presentan mayor especificidad hacia la reacción de transferencia, presentando un porcentaje de 84 y 89 %, respectivamente. Por otro lado, la versión truncada LevS N70 Cat mostró mayor especificidad por la reacción de hidrólisis, presentando un porcentaje de 41.5 % y un 58.5% de transferencia a las 72 horas de reacción.



**Figura 31.** Relación H-T de las versiones truncadas. Porcentaje de conversión: ΔN85C (89 %), LevS N70 Tn77 (91.7 %) y LevS N70 Cat (87 %). En las barras grises y rosas se muestra la reacción de hidrólisis y transferencia, respectivamente; en rojo se muestra el porcentaje de conversión de sustrato a través del tiempo de reacción.

Debido a la variación observada en la versión truncada LevS N70 Cat respecto a las otras dos enzimas, se decidió estudiar a mayor profundidad la evolución de la reacción. Los resultados obtenidos (Figura 32) muestran que respecto a la relación hidrólisis-transferencia, esta enzima presenta mayor porcentaje de actividad hidrolítica, además, se observó que la actividad transferasa aumenta conforme avanza la reacción, es decir, a mayor conversión de sustrato mayor porcentaje de actividad transferasa, sin embargo, la actividad hidrolítica sigue siendo favorecida en la enzima.

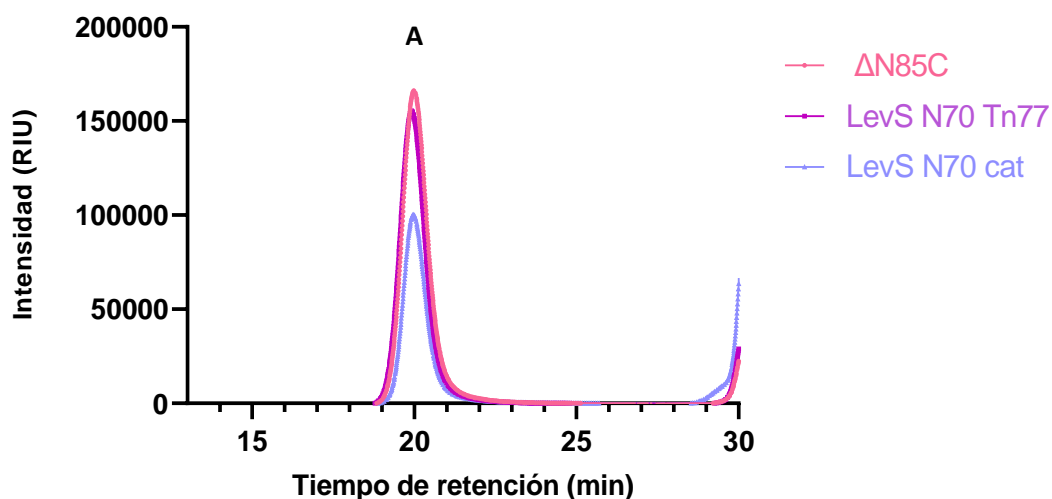


**Figura 32.** Relación H-T y consumo de sustrato de la enzima LevS N70 Cat. En las barras grises y rosas se muestra la reacción de hidrólisis y transferencia, respectivamente; en rojo se muestra el porcentaje de conversión de sustrato a través del tiempo de reacción.

Estos resultados concuerdan con lo reportado en las fructansacarosas y GNs (Del Moral *et al.*, 2008; Olivares-Illana *et al.*, 2003; Pijning *et al.*, 2011; Kralj *et al.*, 2004; Wangpaiboon *et al.*, 2019), ya que las deleciones y mutaciones de residuos, principalmente aromáticos y básicos dentro del dominio V y C- terminal afectan la actividad transferasa de la enzima (Shah *et al.*, 2004; Leemhuis *et al.*, 2013). Se ha propuesto que los residuos aromáticos presentes en las enzima forman interacciones tipo stacking con los enlaces C-H de los carbohidratos, estas interacciones se dan por las propiedades electrónicas de ambos, es decir, los carbohidratos poseen enlaces CH polarizados con menor densidad electrónica en los átomos de hidrógeno que los residuos aromáticos (Spiwok, 2017; Mason *et al.*, 2011; Hudson *et al.*, 2015). Estas observaciones nos sugieren que estos residuos en LevS además de favorecer el consumo de sustrato probablemente puedan participar en el crecimiento de polímero a partir de su unión a carbohidratos por interacciones tipo stacking (Ito *et al.*, 2011; Pijning *et al.*, 2014). Sin embargo, para corroborar dicha hipótesis es necesario analizar los polisacáridos sintetizados por las versiones truncadas.

## 9.12 Producción de polímero de las versiones truncadas

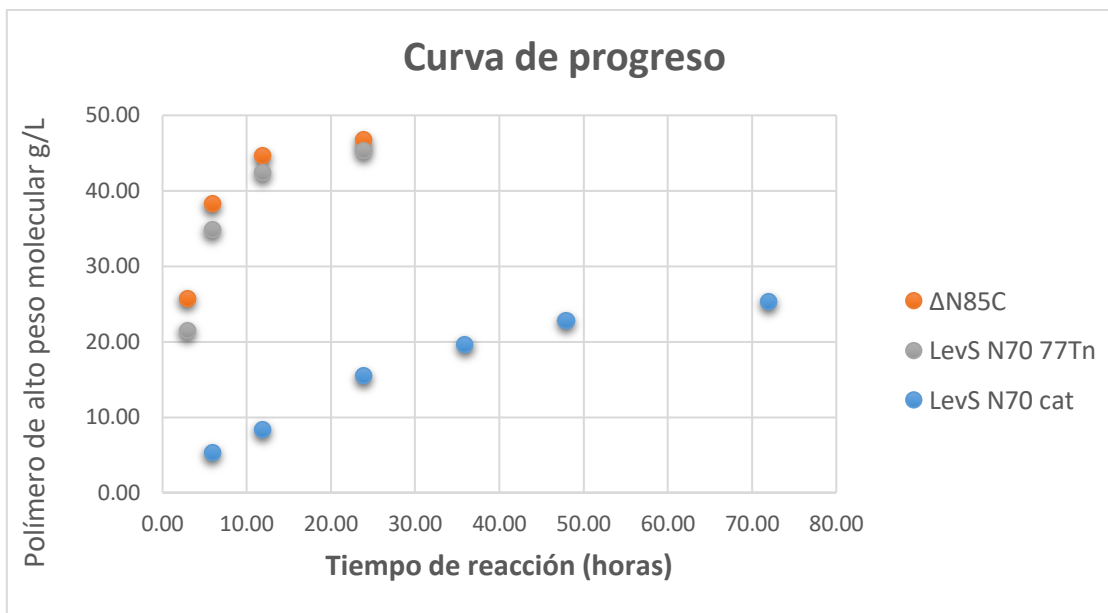
Con el fin de determinar el tamaño y la cantidad del polímero sintetizado por las versiones truncadas, analizamos el perfil de productos mediante cromatografía de exclusión molecular (HPLC-SEC) cuando las reacciones alcanzaron más del 80% de conversión. En la Figura 33, podemos observar que las tres versiones truncadas fueron capaces de producir polímero de alto peso molecular con un tamaño similar. Estos resultados coinciden con lo reportado en GNs y fructansacarosas, donde el truncamiento del dominio V y C terminal, respectivamente, no afecta el tamaño del polímero sintetizado (García-Paz, 2019, datos no publicados; Del Moral *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2015; Joucla *et al.*, 2006), lo cual sugiere que los 4 pCBMs no son indispensables para llevar a cabo la síntesis de polímero de alto peso molecular. Sin embargo, sabemos que estas regiones afectan la velocidad de reacción, por lo que para demostrar si el efecto en la velocidad impacta en la cantidad de polímero sintetizado, es necesario realizar un análisis más detallado de la concentración de este producto sintetizado por las tres enzimas.



**Figura 33.** Producción de polímero de las versiones truncadas al 80% de conversión de sustrato. A. polímero de alto peso molecular.

Con los datos obtenidos mediante HPLC-SEC se analizó la cinética de producción de polímero de alto peso molecular (figura 34). Se observó que para las enzimas  $\Delta$ N85C y LevS N70 Tn77 la velocidad de reacción fue muy similar, pues al 80 % de conversión de sustrato ambas enzimas lograron sintetizar 38.19 g/L y 37.08 g/L de polímero, respectivamente. En contraste, para LevS N70 Cat la ausencia de la región de transición afectó drásticamente la producción de polímero de alto peso molecular en casi un 40%, cuantificando al 80% de conversión solo 25.2 g/L. En conclusión, se sugiere que los pCBMs no son indispensables para llevar a cabo la síntesis de polímero, sin embargo, si potencian la polimerización, pues en ausencia de los pCBMs I y II, la velocidad de reacción, la actividad transferasa, así como la producción de polímero se vieron afectadas.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado en fructansacarosas y GNs (García-Paz, 2019. Datos no publicados; Meng *et al.*, 2015), sin embargo, son contrarios a lo observado en la GNs donde después del truncamiento del dominio C-terminal se perdió completamente la capacidad de síntesis de polímero (Kato & Kuramitsu 1990; Wang *et al.*, 2017). La disminución de síntesis de polisacáridos observada en nuestro trabajo puede deberse a que al igual que en estas enzimas, el dominio V y C-terminal, específicamente los pCBMs I y II en nuestro trabajo, facilitan la síntesis de polisacáridos al favorecer el reconocimiento de aceptores (Ito *et al.*, 2011; Leemhuis *et al.*, 2013; Pijning *et al.*, 2014; Wangpaiboon *et al.*, 2019).

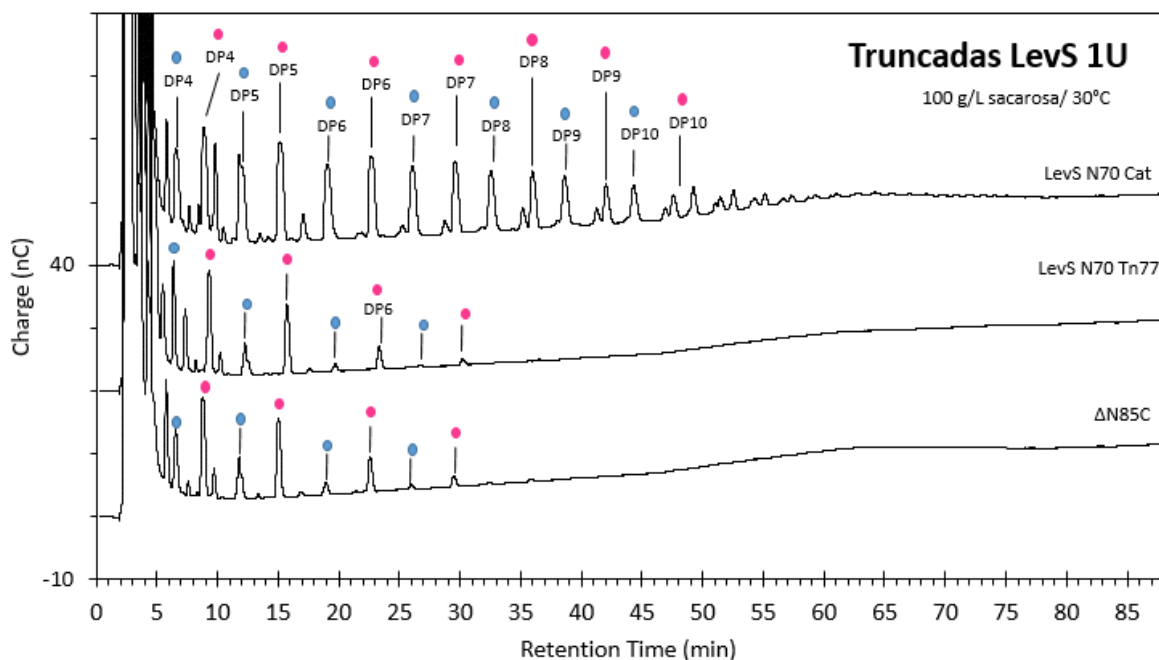
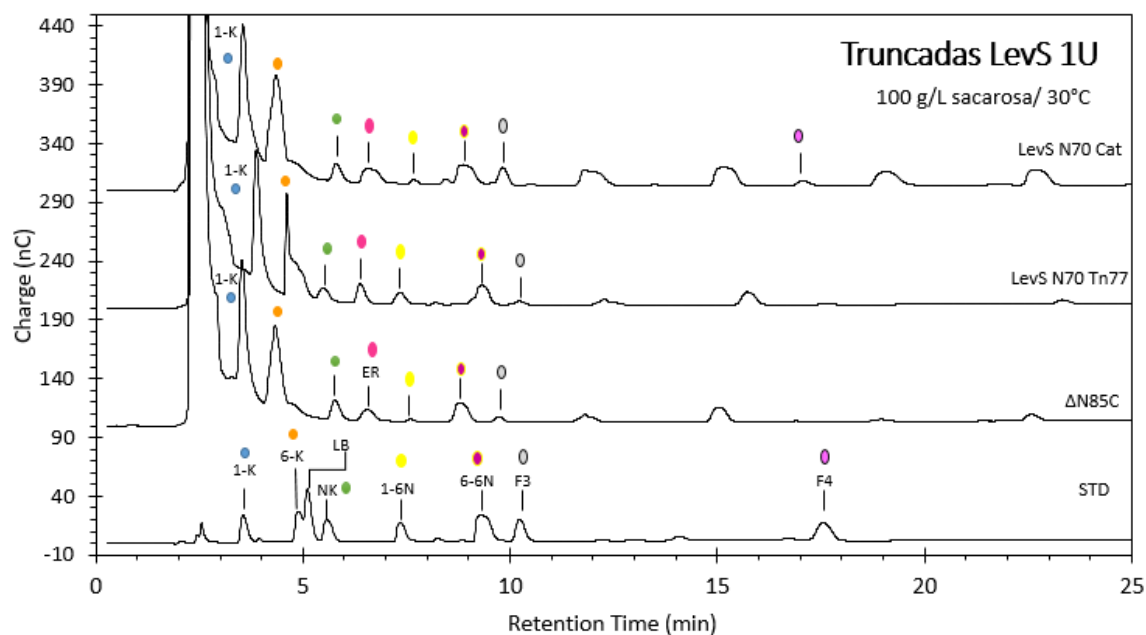


**Figura 34.** Cinética de reacción de la producción de polímero de las versiones truncadas. A. polímero de alto peso molecular. B. polímero de bajo peso molecular.

### 9.13 Síntesis de FOS de las versiones truncadas

Con el objetivo de identificar los fructooligosacáridos sintetizados por las versiones truncadas, se analizaron los productos de reacción de las enzimas por HPLC-PAD, comparando con estándares de FOS existentes en el grupo de investigación. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 35, en donde para las tres versiones truncadas se identificó la síntesis de FOS tipo levana. En particular, tanto para  $\Delta N85C$  como para LevS N70 Tn77 se observó la presencia de 1-kestosa, 6-kestosa, levanobiosa, Neokestosa, 1,6-Nistosa, 6,6-Nistosa y Levantriosa, además, de FOS de las series 1-K y 6-K con un grado de polimerización desde 4 a 7. Por otro lado, aunque los productos de bajo grado de polimerización sintetizados por la versión truncada LevS N70 Cat (Figura 36) son similares a los producidos por las enzimas  $\Delta N85C$  y LevS N70 Tn77, estos alcanzan hasta un DP10, detectando la presencia de levantetraosa como producto nuevo, el cual no fue identificado en las otras dos enzimas. Además, no se logró identificar varios oligosacáridos, lo cual nos sugiere que podrían ser nuevos productos, probablemente con ramificaciones

diferentes a los estándares, por lo cual sería interesante analizarlos por RMN para determinar su estructura.



**Figura 35.** Análisis de FOS sintetizados por  $\Delta$ N85C y versiones truncadas. 1-K: 1-kestosa, 6-K: 6-kestosa, LB: levanobiosa, NK: Neokestosa, 1-6N: 1,6-Nistosa, 6,6-N: 1,6-Nistosa, F3: Levanotriosa y F4: Levanotetraosa.

En conclusión, debido a que en la enzima LevS N70 Cat se observaron FOS con un mayor grado de polimerización, se sugiere que la velocidad con la que esta enzima elonga estos FOS es menor a las otras dos enzimas, lo cual provocaría la acumulación de estos productos. Además, se sugiere que los pCBMs I y II están implicados en el reconocimiento a los fructooligosacáridos aceptores, lo cual disminuye la síntesis de polímero.

## 10 Especificidad de la reacción transferasa (productos de bajo y alto peso molecular).

Con el fin de realizar una integración de nuestros resultados se elaboró la tabla 13, en la cual se muestra el porcentaje de hidrólisis y el porcentaje de productos de alto y bajo peso molecular sintetizado por las versiones truncadas. En este análisis, es posible observar que en la enzima que carece de los 4 pCBMs la actividad hidrolítica es mayor que las otras dos enzimas, además, también se pudo apreciar que en esta misma enzima los productos de alto peso molecular sintetizados disminuyeron un 50% en comparación con  $\Delta$ N85C y LevS N70 Tn77. La distribución de productos de alto y bajo peso molecular observados sugiere que la región de transición participa en la reacción de transferencia, favoreciendo la síntesis de polímero de alto peso molecular. En las GNs se ha encontrado que la presencia de loops en zonas flanqueantes al dominio catalítico actúan como subsitios de unión a aceptor, de manera que cuando se forman oligosacáridos más largos estos funcionan como moléculas aceptoras en el siguiente paso de elongación (Leemhuis *et al.*, 2013; Claverie *et al.*, 2019). Por lo anterior, se propone que los pCBM I y II forman parte de los subsitios de unión aceptor en esta enzima potenciando la síntesis de polímero de alto peso molecular.

Además, existen otras evidencias que apoyan nuestra hipótesis, Bai *et al.*, 2017, al revelar la estructura cristalográfica de GtfB, la cual presenta un plegamiento en U, donde las regiones N y C-terminal flanqueantes interactúan entre sí formando el denominado dominio B, el cual interactúa con el dominio catalítico. Los loops del dominio B y del dominio catalítico en conjunto forman un túnel, en el cual se observó que un oligosacárido



de mayor tamaño logra ser acoplado, permitiendo así, su unión a subsitios superiores de reconocimiento a aceptores, lo cual potencia la actividad transferasa y procesividad enzimática (Pijning *et al.*, 2011). Con base en estos resultados, sugerimos que la levansacarasa LevS podría presentar un plegamiento en “U” de manera que la zona de la región de transición que presenta los pCBMs I y II, en conjunto la zona de procesividad (70 aa flanqueantes de la región N-terminal), formen una cavidad o túnel que participa en la transfructosilación y síntesis de polímero en nuestra enzima, similar al dominio B de las GNs y amilasas.

Enzima	% Hidrólisis	Productos de alto peso molecular %	Productos de bajo peso molecular %
<b>ΔN85C</b>	16 ± 0.8	73.12 ± 0.69	10.87 ± 0.28
<b>LevS N70 Tn77</b>	11 ± 0.5	72.05 ± 1.23	16.94 ± 0.53
<b>LevS N70 Cat</b>	41.5 ± 0.51	36.76 ± 0.31	21.73 ± 0.59

**Tabla 13.** Análisis de actividad hidrolítica y polímeros sintetizados por ΔN85C y versiones truncadas.

## 11 Conclusión

En este trabajo, se lograron identificar a partir de análisis *in silico* 4 posibles bolsillos hidrofóbicos (pCBMs) dentro de la región de transición. Nuestros análisis demostraron que los bolsillos III y IV no participan de manera relevante en las propiedades de la enzima. Mientras que los bolsillos I y II son importantes para las características bioquímicas de la enzima, principalmente la termoestabilidad. Además, se encontró que estos bolsillos (I y II) participan en la síntesis de PAPM, favoreciendo la elongación de FOS aceptores, aumentando así la actividad transferasa y la velocidad de reacción. Nuestros resultados indican que la región mínima funcional de la región de transición para mantener las propiedades bioquímicas y la capacidad catalítica de LevS corresponde a los primeros 77 residuos, en los cuales se encuentran ubicados los pCBMs I y II.

Con base en nuestros resultados, se propone que esta zona mínima está involucrada en favorecer interacciones que incrementan la afinidad de la enzima por las moléculasceptoras, probablemente debido a que esta zona en conjunto con la zona de procesividad contiene residuos, entre ellos aromáticos, que constituyen los subsitios superiores de reconocimiento al aceptor en las fructansacarosas multidominio, similar al dominio B de las GNs y amilasas.

## 12 Perspectivas

- Estudiar la participación de los pCBM en las constantes cinéticas de la enzima.
- Diferenciar la participación de los pCBM I y II en las propiedades bioquímicas y capacidades de la enzima.
- Confirmar la posible función de los pCBMs como módulos de unión a carbohidratos a través de ensayos de calorimetría diferencial de barrido o geles de retardo.
- Revelar la estructura cristalográfica de LevS.

## 13 Referencias

- Allen, J. D. (1980). Subsite Mapping of Enzymes: Application to Polysaccharide Depolymerases. *Methods Enzymol*, 64, 248–277.
- Anwar, M., Kralj, S., Pique, A., Leemhuis, H., van der Maarel, M. & Dijkhuizen, L. (2010). Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology*, 156(4), 1264-1274.
- Bai, Y., Gangoiti, J., Dijkstra, B. W., Dijkhuizen, L., & Pijning, T. (2017). Crystal Structure of 4,6- $\alpha$ -Glucanotransferase Supports Diet-Driven Evolution of GH70 Enzymes from  $\alpha$ -Amylases in Oral Bacteria. *Structure*, 25(2), 231–242.
- Bealing, F. J., & Bacon, J. S. (1953). The action of mould enzymes on sucrose. *The Biochemical Journal*, 53(2), 277–285.
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. 781, 769–781.
- Bozonnet, S., Dols-Laffargue, M., Fabre, E., Pizzut, S., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., & Willemot, R. M. (2002). Molecular characterization of DSR-E, an  $\alpha$ -1,2 linkage-synthesizing dextransucrase with two catalytic domains. *Journal of Bacteriology*, 184(20), 5753–5761.
- Brison, Y., Malbert, Y., Czaplicki, G., Mourey, L., Remaud-Simeon, M., & Tranier, S. (2016). Structural insights into the carbohydrate binding ability of an  $\alpha$ -(132) branching sucrose from glycoside hydrolase family 70. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7527–7540.
- Brison, Y., Pijning, T., Malbert, Y., Fabre, É., Mourey, L., Morel, S., Potocki-Véronèse, G., Monsan, P., Tranier, S., Remaud-Siméon, M., & Dijkstra, B. W. (2012). Functional and structural characterization of  $\alpha$ -(1→2) branching sucrose derived from DSR-E glucansucrase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 7915–7924.
- Chambert, R., Gonzy-Tréboul, G. (1976). Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Kinetic and Thermodynamic Aspects of Transfructosylation Processes. *European Journal of Biochemistry*, 62, 55-64.
- Chambert, R., Treboul, G., & Dedonder, R. (1974). Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 41(2), 285–300.
- Chandrashekar, P., Prashanth, K. & Venkatesh, Y. (2011). Isolation, structural elucidation and immunomodulatory activity of fructans from aged garlic extract. *Phytochemistry*, 72(2): 255-264.

- Christiansen, C., Abou Hachem, M., Janeček, Š., Viksø-Nielsen, A., Blennow, A., & Svensson, B. (2009). The carbohydrate-binding module family 20 - Diversity, structure, and function. *FEBS Journal*, 276(18), 5006–5029.
- Chuankhayan, P., Hsieh, C. Y., Huang, Y. C., Hsieh, Y. Y., Guan, H. H., Hsieh, Y. C., Tien, Y. C., Chen, C. De, 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.
- Claverie, M. (2017). GH70 dextransucases: Insights on the molecular determinants of dextran molar mass control. *Biomolecules*.
- Claverie, M., Cioci, G., Guionnet, M., Schörghuber, J., Lichtenecker, R., Moulis, C., Rемаud-Siméon, M., Lippens & G., 2019. Futile Encounter Engineering of the DSR-M Dextransucrase Modifies the Resulting Polymer Length. *Biochemistry (Mosc.)* 58, 2853–2859.
- Claverie, M., Cioci, G., Vuillemin, M., Bondy, P., Rемаud-Simeon, M., & Moulis, C. (2020). Processivity of dextransucrases synthesizing very-highmolar-mass dextran is mediated by sugar-binding pockets in domain v. *Journal of Biological Chemistry*, 295(17), 5602–5613.
- Claverie, M., Cioci, G., Vuillemin, M., Monties, N., Roblin, P., Lippens, G., Rемаud-Simeon, M., & Moulis, C. (2017). Investigations on the determinants responsible for low molar mass dextran formation by DSR-M dextransucrase. *ACS Catalysis*, 7(10), 7106–7119.
- Davies, G. J., Wilson, K. S. & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 321, 557-559.
- Dedonder, R. (1966). Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology*, 8(C), 500–505.
- Del Moral, S., Olvera, C., Rodriguez, M. E., & Munguia, A. L. (2008). Functional role of the additional domains in inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28. *BMC Biochemistry*, 9(1), 1–10.
- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., & Barton, G. J. (2015). JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W389–W394.
- Dušek, Jiří. (2002). Saccharide reserves, growth and mineral composition of *Calamagrostis epigejos* growing in alluvial meadows.
- French, A. D. (1988). Accessible conformations of the  $\beta$ -d-(2→1)- and -(2→6)-linked d-fructans inulin and levan. *Carbohydrate Research*, 176(1), 17–29.

- French, A. D. (1989). Chemical and Physical Properties of Fructans. *Journal of Plant Physiology*, 134(2), 125–136.
- Fuchs, A. (1991). Current and potential food and non-food applications of fructans. *Biochemical Society Transactions*, 19(3), 555–560.
- García-Paz, F. M. (2019). Estudio de la relación estructura/función de las fructosiltransferasas multidominio. Tesis de doctorado. Datos no publicados. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ge, L., Li, D., Wu, T., Zhao, L., Ding, G., Wang, Z., & Xiao, W. (2018). B-factor-saturation mutagenesis as a strategy to increase the thermostability of  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus*. *Journal of Biotechnology*, 275(May 2017), 17–23.
- 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.
- Giffard, P. M., Jacques, N. A. (1994). Definition of a fundamental repeating unit in streptococcal glucosyltransferase glucan-binding regions and related sequences. *J Dent Res* 73:1133–1141.
- Gilkes, N. R., Henrissat, G., Kilburn, D. G., Miller, R. C., & Warren, R. A. J. (1991). Domains in Microbial 3-1,4-Glycanases: Sequence Conservation, Function, and Enzyme Families. 55(2), 303–315.
- Guan, L., Hu, Y., & Kaback, H. R. (2003). Aromatic stacking in the sugar-binding site of the lactose permease. *Biochemistry*, 42(6), 1377–1382.
- Guillén, D., Sánchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2010). Carbohydrate-binding domains: Multiplicity of biological roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1241–1249.
- Hestrin, S., Feinold, D. S., & Avigad, G. (1956). The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 3. Donor-acceptor specificity of levansucrase from *Aerobacter levanicum*. *The Biochemical Journal*, 64(2), 340–351.
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T., & Tashiro, Y. (1986). Effects of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health. *Bifidobacteria and Microflora*, 5(1), 37–50.
- Hudson, K. L., Bartlett, G. J., Diehl, R. C., Agirre, J., Gallagher, T., Kiessling, L. L., & Woolfson, D. N. (2015). Carbohydrate-Aromatic Interactions in Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 137(48).

- Iliev, I., Vasileva, T., Bivolarski, V., Salim, A., Morel, S., PRabier P. & Gabriel V. 2018. Optimization of the expression of levansucrase L17 in recombinant E. coli. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 477-486.
- Ishida, R., Sakaguchi, K., Matsuzaki, C., Katoh, T., Ishida, N., Yamamoto, K. & Hisa, K. (2016). Levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 produces a levan exopolysaccharide with immunomodulating activity. *Biotechnol Lett*, 38:681–687.
- Ito, K., Ito, S., Shimamura, T., Weyand, S., Kawarasaki, Y., Misaka, T., Abe, K., Kobayashi, T., Cameron, A. D., & Iwata, S. (2011). Crystal Structure of Glucansucrase from the Dental Caries Pathogen *Streptococcus mutans*. *Journal of Molecular Biology*, 408(2), 177–186.
- Jadaun, J. S., Narnoliya, L. K., Agarwal, N. & Singh, S. P. (2019). Catalytic biosynthesis of levan and short-chain fructooligosaccharides from sucrose-containing feedstocks by employing the levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* MTCC10508. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 486-495.
- Janeček, Š., Svensson, B., & Russell, R. R. B. (2000). Location of repeat elements in glucansucrases of *Leuconostoc* and *Streptococcus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 192(1), 53–57.
- Jimenez-Sanchez, M., Perez-Morales, R., Goycoolea, F. M., Mueller, M., Praznik, W., Loeppert, R., Bermudez-Morales, V., Zavala-Padilla, G., Ayala, M. & Olvera, C. (2019). Self-assembled high molecular weight inulin nanoparticles: Enzymatic synthesis, physicochemical and biological properties *Carbohydrate Polymers*, 215, 160-169.
- Joucla, G., Pizzut, S., Monsan, P., & Remaud-Simeon, M. (2006). Construction of a fully active truncated alternansucrase partially deleted of its carboxy-terminal domain. *FEBS Letters*, 580(3), 763–768.
- Kajava, A. V., & Steven, A. C. (2006).  $\beta$ -Rolls,  $\beta$ -Helices, and Other  $\beta$ -Solenoid Proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 73(06), 55–96.
- Kato C. & Kuramitsu H. K. (1990). Carboxy-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme. *FEMS Microbiol Lett* 72:299–302.
- Khemakhem, B., Ali, M. Ben, Aghajari, N., Juy, M., Haser, R., & Bejar, S. (2009). Engineering of the  $\alpha$ -amylase from *geobacillus stearothermophilus* US100 for detergent incorporation. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2), 380–389.
- Kingston, K. B., Allen, D. M., & Jacques, N. A. (2002). Role of the C-terminal YG repeats of the primer -dependent streptococcal glucosyltransferase, GtfJ, in binding to dextran and mutan. *Microbiology*, 148(2), 549–558.

- Kralj, S., Van Geel-Schutten, G. H., Dondorff, M. M. G., Kirsanovs, S., Van der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2004). Chapter 7 Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: Isolation and.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283–291.
- Leemhuis, H., Dijkman, W. P., Dobruchowska, J. M., Pijning, T., Grijpstra, P., Kralj, S., Kamerling, J. P. & Dijkhuizen, L. (2013). 4,6- a-Glucanotransferase activity occurs more widespread in lactobacillus strains and constitutes a separate GH70 subfamily. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(1):181–93.
- Lynch, D. J., Fountain, T. L., Mazurkiewicz, J. E., & Banas, J. A. (2007). Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiology Letters*, 268(2), 158–165.
- Martínez-Bahena, S. (2019). Delimitando la región N-terminal involucrada en la procesividad de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*. Tesis licenciatura.
- Martínez-Fleites, C., Ortiz-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*. *Biochem. J.*, 390, 19–27.
- Mason, P. E., Lerbret, A., Saboungi, M. L., Neilson, G. W., Dempsey, C. E., & Brady, J. W. (2011). Glucose interactions with a model peptide. *Proteins*, 79(7), 2224–2232.
- Mathlouthi, M. & Reiser, P. (1995). *Sucrose: Properties and Applications*. Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- McGaughey, G. B., Gagné, M. & Rappé, A. K. (1998).  $\pi$ -Stacking Interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(25), 15458–15463.
- Meng & Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural Biology*, 10(11), 935–941.
- Meng, X., Dobruchowska, J. M., Pijning, T., Gerwig, G. J., Kamerling, J. P., & Dijkhuizen, L. (2015). Truncation of domain V of the multidomain glucansucrase GTF180 of *Lactobacillus reuteri* 180 heavily impairs its polysaccharide-synthesizing ability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(14), 5885–5894.
- Mercado, I. (2020). Estudio de la relación estructura/función de la región N100 terminal de la inulosacarasa (IsIA) de *Leuconostoc citreum* CW28. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.



- Monchois, V., René-Marc, W., & Monsan, P. (1999). Glucansucrases : mechanism of action and structure ^ function relationships. 23.
- Monsan, P., & Paul, F. (1995). Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiology Reviews*, 16(2–3), 187–192.
- Morales-Arrieta, S., Rodríguez, M., Segovia, L., López-Munguía, A. & Olvera-Carranza, C. (2006). Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene*, 376(1), 59-67.
- Niness, K. (1999). Inulin and oligofructose: What are they?. *The Journal of Nutrition*, 129(7):1402-1406.
- Northrop, D. B. (1969). Transcarboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(21), 5808-5819.
- Olivares-Illana, V., Lopez-Munguia, A. & Olvera, C. (2003). Molecular Characterization of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a Fructosyltransferase within a Glucosyltransferase. *Journal of Bacteriology*, 185(12), 3606-3612.
- Olvera, C., Castillo, E., & López-Munguía, A. (2007). Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Biotecnología*, 14, 327–346.
- Olvera, C., Centeno-Leija, S. & López-Munguía, A. (2006). Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92(1), 11-20.
- 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.
- Ozimek, L. K., Kralj, S., Kaper, T., Van Der Maarel, E. C. & Dijkhuizen, L. (2006). Single amino acid residue changes in subsite -1 of inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 strongly influence the size of products synthesized. *FEBS J.*, 273(17), 4104- 4113.
- Pijning, T. (2014). Truncated and full-length glucansucrase GTF180 from *Lactobacillus reuteri* adopt an elongated structure in solution.
- Pijning, T., Anwar, M. A., Böger, M., Dobruchowska, J. M., Leemhuis, H., Kralj, S., Dijkhuizen, L., & Dijkstra, B. W. (2011). Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: Insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *Journal of Molecular Biology*, 412(1), 80–93.
- Pijning, T., Vujičić-Žagar, A., Kralj, S., Dijkhuizen, L., & Dijkstra, B. W. (2012). Structure of the  $\alpha$ -1,6/ $\alpha$ -1,4-specific glucansucrase GTFA from *Lactobacillus reuteri* 121. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 68(12), 1448–1454.

- Privalov, P.L. & Gill, S. J. (1988). Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Advances in protein chemistry*, 39, 191-234.
- Quiócho, F. (1989). Protein-carbohydrate interactions: basic molecular features *Flórate*. *Pure & Appl. Chem.*, 61(7), 1293-1306.
- Raga-Carbajal, E., Carrillo-Nava, E., Costas, M., Porrás-Domínguez, J., L3pez-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.
- Ramírez-Torres, V. (2019). Caracterización bioquímica de las versiones truncadas en el dominio N-terminal de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rathsam, C. & Jacques, N. A. (1998). Role of C-terminal domains in surface attachment of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *J Bacteriol* 180, 6400–6403.
- Rathsam, C., Giffard, P. & Jacques, N. (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.
- Ritsema, T., & Smeekens, S. (2003). Fructans: Beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 223–230.
- Sarilmise, H. & Oner, E. (2014). Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6T. *Biochemical Engineering Journal*, 92: 28-34.
- Shah, D. S. H., Joucla, G., Remaud-simeon, M., & Russell, R. R. B. (2004). Conserved Repeat Motifs and Glucan Binding by Glucansucrases of Oral *Streptococci* and *Leuconostoc mesenteroides*. 186(24), 8301–8308.
- Shiroza, T. & Kuramitsu, H. K. (1988). Sequence Analysis of the *Streptococcus mutans* Fructosyltransferase Gene and Flanking Regions. *Journal of Bacteriology*, 170(2), 810-816.
- Shoseyov, O., Shani, Z., & Levy, I. (2006). Carbohydrate Binding Modules : Biochemical Properties and Novel Applications. 70(2), 283–295.
- Song, D. & Jacques, N. (1999). Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem. J.*, 341, 285–291.
- Song, K.-B., Seo, J.-W., Kim, M.-G., & Rhee, S.-K. (1998). Levansucrase of *Rahnella aquatilis* ATCC33071 Gene Cloning, Expression, and Levan Formation.

- Spiwok, V. (2017). Interactions in Carbohydrate Recognition. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(7), 1038.
- Sprenger, N., Bortlik, K., Brandt, A., Böller, T., & Wiemken, A. (1995). Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25), 11652–11656.
- Steinmetz, M., Le Coq, D., Aymerich, S., Gonzy-Treboul, G. & Gay, P. (1985). The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol. Gen. Genet*, 200 (1985) 220-228.
- Suwannarangsee, S., Moulis, C., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., & Chulalaksananukul, W. (2007) Search for a dex- transucrase minimal motif involved in dextran binding. *FEBS Lett.* 581, 4675–4680.
- Tang, L. B., Lenstra, R., Borchert, T. V. & Nagarajan V. (1990). Isolation and characterization of levansucrase-encoding gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Gene*, 96, 89-93.
- Tieking, M., Ehrmann, M., Vogel, R. & Gänzle, M. (2005). Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(6), 655-663.
- Tungland, B. C. (2003). Fructooligosaccharides and Other Fructans: Structures and Occurrence, Production, Regulatory Aspects, Food Applications, and Nutritional Health Significance. *Oligosaccharides in Food and Agriculture*, 135–152.
- Van Arkel, J., Sévenier, R., Hakkert, J. C., Bouwmeester, H. J., Koops, A. J., & Van Der Meer, I. M. (2013). Tailor-made fructan synthesis in plants: A review. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 48–56.
- Van Den Burg, B., Dijkstra, B. W., Vriend, G., Van Der Vinne, B., Venema, G., & Eijssink, V. G. H. (1994). Protein stabilization by hydrophobic interactions at the surface. *European Journal of Biochemistry*, 220(3), 981–985.
- Van Hijum, S., Kralj, S., Ozimek, L., Dijkhuizen, L., & Van Geel-Schutten, I. (2006). Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 70(1), 157-176.
- Van Hijum, S., Szalowska, E., Van Der Maarel, M. & Dijkhuizen, L. (2004). Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*, 150(3), 621-630.
- Velázquez-Hernández, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M. P., & Valdez-Alarcón, J. J. (2009). Microbial

- fructosyltransferases and the role of fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 1763–1778.
- Vijn, I., & Smeekens, S. (1999). Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology*, 120(2), 351–359.
- Vujičić-Žagar, A. & Dijkstra, B. (2006). Monoclinic crystal form of *Aspergillus niger*  $\alpha$ -amylase in complex with maltose at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 62(8), 716-721.
- Vujičić-Žagar, A., Pijning, T., Kralj, S., López, C. A., Eeuwema, W., Dijkhuizen, L., & Dijkstra, B. W. (2010). Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21406–21411.
- Vyas, N. K. (1991). Atomic features of protein-carbohydrate interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 1, 732-740.
- Waldherr, F. W., Meissner, D. & Vogel, R. (2008). Genetic and functional characterization of *Lactobacillus panis* levansucrase. *Arch Microbiol*, 190:497–505.
- Wang, C., Zhang, H. bin, Li, M. qi, Hu, X. Gin & Li, Y. (2017). Functional analysis of truncated and site-directed mutagenesis dextransucrases to produce different type dextrans. *Enzyme and Microbial Technology*, 102(March), 26–34.
- Wangpaiboon, K., Pitakchatwong, C., Panpetch, P., Charoenwongpaiboon, T., Field, R. A., & Pichyangkura, R. (2019). Modified properties of alternan polymers arising from deletion of SH3-like motifs in *Leuconostoc citreum* ABK-1 alternansucrase. *Carbohydrate Polymers*, 220, 103–109.
- Whatmore, A. M., & Dowson, C. G. (1999). The autolysin-encoding gene (lytA) of *Streptococcus pneumoniae* displays restricted allelic variation despite localized recombination events with genes of pneumococcal bacteriophage encoding cell wall lytic enzymes. *Infection and Immunity*, 67(9), 4551–4556.
- Wong, C., Hefta, S. A., Paxton, R. J., Shively, J. E. & Mooser, G. (1990). Size and subdomain architecture of the glucan-binding domain of sucrose:3--D- glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. *Infect. Immun* 58:2165– 2170.
- Wu, S., & Zhang, Y. (2007). LOMETS: A local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 35(10), 3375–3382.
- Xia, Y., & Xun, L. (2017). Revised mechanism and improved efficiency of the quikchange site-directed mutagenesis method. *Methods in Molecular Biology*, 1498, 367–374.

- Xu, J., Chen, D., Liu, C., Wu, X., Dong, X. & Zhou, J. (2016). Structural characterization and anti-tumor effects of an inulin-type fructan from *Atractylodes chinensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82: 765-771.
- Xu, W., Ni, D., Zhang, W., Guang, C., Zhang, T., & Mu, W. (2019). Recent advances in Levansucrase and Inulosucrase: evolution, characteristics, and application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(22), 3630–3647.
- Yoder, M. D., & Jurnak, F. (1995). The parallel  $\beta$  helix and other coiled folds. *The FASEB Journal*, 9(5), 335–342.
- Zolotnitsky, G., Cogan, U., Adir, N., Solomon, V., Shoham, E. & Shoham Y. (2004). Mapping glycoside hydrolase substrate subsites by isothermal titration calorimetry Gennady. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(31), 11275-11280.