



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Generación semi-racional y selección de mutantes afectadas en la síntesis de levanas de alto peso molecular de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
I.Q. SALVADOR MARTINEZ BAHENA

TUTORA PRINCIPAL:

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. WENDY XOLALPA VILLANUEVA  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

DR. CARLOS AMERO TELLO  
[Centro de Investigaciones Químicas, UAEMor](#)

Ciudad de México. Febrero de 2024



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.

*Los gustos frívolos me han abandonado. Ya no hay  
necesidad de entrega ni de amor divino.*

*Arthur Rimbaud, 1873*

El presente trabajo de tesis de maestría fue desarrollado en el laboratorio de polímeros biocompatibles y nanobiotecnología a cargo de la Dra. Clarita Olvera Carranza dentro del departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

La realización de este proyecto contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT/UNAM del proyecto IN227723. Este trabajo se realizó gracias a la beca de CONACyT para estudios de posgrado bajo el número de becario 1003140.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la **Doctora Clarita Olvera Carranza** por haberme recibido en su laboratorio desde la licenciatura hasta concluir la maestría; además, por la confianza depositada en mi para realizar mi proyecto de maestría y su acertada guía en los momentos poco fructíferos.

Al **Dr. Enrique Raga** y a la **Dra. Flor de María García**, miembros valiosos del grupo de *Polímeros Biocompatibles* y de mi completa admiración, quienes compartieron y confiaron su valioso conocimiento conmigo, además de siempre dedicar tiempo a mi proyecto para apoyarme a erigir el proyecto hasta el ápice de su inflorescencia.

A la **Dra. Wendy Xolalpa** y al **Dr. Carlos Amero** por sus observaciones, críticas constructivas y recomendaciones durante el desarrollo del proyecto. Quiero agradecer especialmente a la **Dra. Wendy** con quien podía conversar de manera muy amena acerca de proteínas y enzimas en los pasillos del edificio sur de vez en cuando.

A los miembros del jurado: **Dr. Daniel Segura**, **Dra. Maricarmen Quirasco**, **Dra. Carmina Montiel**, **Dr. Carlos Peña** y **Dr. Karen Manoutcharian** quienes con sus observaciones permitieron enriquecer y armonizar el fulgor de este trabajo que constantemente me costaba percibir.

A la **Doctora Marcela Ayala** por todas las entusiastas y acertadas observaciones a este trabajo y al trabajo de laboratorio.

A la **Biol. Rosa Román Miranda** por todo el apoyo técnico.

A las diferentes unidades de apoyo del Instituto de Biotecnología como **Paul Gaytán**, **Eugenio López**, **Jorge Yáñez** y **Santiago Becerra** de la unidad de síntesis y secuenciación de DNA, biblioteca, docencia, servicios generales, cómputo, planta piloto y los miembros que los conforman, quienes nos ayudan enormemente. Quiero agradecer especialmente al **Lic. Antonio Bolaños**, quien ha sido un enorme e invaluable apoyo.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Este larguísimo camino tuvo distintos matices, muchos pentimentos y demasiados momentos de los cuales, ninguno fue límpido. No obstante, hubo personas que me acompañaron en distintas partes de la travesía (haciéndola cálida y divertida) hasta terminar este trabajo.

Agradezco a mi **padre, madre, hermano, sobrina y cuñada**, quienes siempre estuvieron, están y estarán para mí, si lugar a dudas. Aquí aprovecho para pedirles disculpas por hablarles de mi tema de tesis a cada rato; buenas noticias, se han terminado esos asaltos.

Al joven **Diego**, quien además de robarme el corazón, ha permanecido a mi lado desde que inicie este posgrado hasta ahora, y gracias al cielo, a su compañía no se le ve fin. Este es un agradecimiento muy especial ya que es quien más me ha motivado a perseguir mis sueños y a reinventarme como persona. Gracias por siempre estar para mí, con las palabras correctas o con un tranquilizante silencio.

A **Clarita** quien además de desempeñar extraordinariamente su función como tutora, su calidez humana, comprensión y cariño también me acompañaron. Es una persona íntegra y como pocas le quedan a este mundo. No tengo palabras para expresar el enorme agradecimiento y admiración que le tengo, ya que cuando mi padre partió y perdí terriblemente el rumbo, me dirigió al camino de vuelta. No hubo momento que no aprendiera de ella, desde el principio e incluso hasta el último momento. Eternamente agradecido, gracias, por tanto.

A **Kike** por todos los consejos y aventuras dentro y fuera del laboratorio, es una de las personas que más admiración y cariño le tengo. Que buenas veladas de tacos al pastor y partidas de Mortal Kombat, gracias por haberme enseñado tanto valioso y querido amigo.

A **Ceci** quien me vino a salvar de mí mismo dentro y fuera del laboratorio, es una master de vida para mí y me ayudó a encararme a mí mismo. Quien ahí ocultaba como hater en el grupo se terminó convirtiendo en una de mis más queridas amigas y aliadas.

A mis amigos de generación que siempre han estado para mí, **Paquito, Astrid, Tomas, Diana y Luisillo**, quienes han sido muy buenos conmigo. Un agradecimiento especial a **Paquito y Astrid**, quienes son como mis hermanitos y amigos de por vida.

A todos los **Claritos** y **Marcelitos** que estuvieron ahí.

A **Lucas, Mila**, y especialmente a **Church**, quien me cuida desde el paraíso.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS .....	4
AGRADECIMIENTOS PERSONALES .....	5
ÍNDICE .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE TABLAS .....	9
ABREVIATURAS .....	10
RESUMEN .....	11
1 GENERALIDADES .....	13
1.1 Fructanas .....	13
1.2 Fructansacarosas .....	14
1.3 Dominio catalítico de las fructansacarosas .....	19
1.4 Aspectos moleculares del mecanismo de reacción .....	20
1.5 Mecanismo de elongación de levanas .....	24
2 ANTECEDENTES .....	26
2.1 La levansacarasa LevS de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B512-F .....	26
2.2 Estudios de relación estructura-función de las regiones adicionales de LevS .....	28
2.3 Función de la región N-terminal de LevS en la síntesis de levanas de alto peso molecular .....	31
3 HIPÓTESIS .....	35
4 OBJETIVOS .....	35
4.1 Objetivo general .....	35
4.2 Objetivos específicos .....	35
5 MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
5.1 Construcción de las librerías por mutagénesis combinatoria basada en alanina .....	37
5.1.1 Librería <sup>135</sup> EKL <sub>137</sub> .....	38
5.1.2 Librería <sup>138</sup> DDS <sub>140</sub> .....	38
5.1.3 Librería <sup>141</sup> VSK <sub>143</sub> .....	38
5.1.4 Librería <sup>144</sup> DLN <sub>146</sub> .....	38
5.2 Screening de las mutantes de LevS en la región N-terminal afectadas en la síntesis de levanas de alto peso molecular .....	39
5.3 Ligación SLiCE .....	39
5.3.1 Preparación del extracto SLiCE a partir de la cepa <i>E. coli</i> DH5α .....	39
5.3.2 Preparación del SLiCE buffer (10X) .....	40

5.3.3 Reacción de ligación SLiCE para los bancos de mutantes.....	40
5.4 Cultivos de las clonas candidatas.....	41
5.5 Purificación de LevS $\Delta$ N85C.....	41
5.5.1 Amortiguadores.....	41
5.5.2 Preparación de los extractos.....	42
5.5.3 Cromatografía IMAC de LevS $\Delta$ N85C.....	43
5.6 Ensayos de purificación de LevS WT.....	44
5.6.1 Soluciones.....	44
5.6.2 Preparación de los extractos.....	44
5.6.3 Cromatografía IMAC de LevS WT.....	44
5.6.4 Cromatografía de intercambio iónico de LevS WT.....	45
5.7 Determinación de la actividad enzimática.....	45
5.8 Determinación de la concentración de proteína.....	46
5.9 Determinación de los parámetros cinéticos de LevS $\Delta$ N85C.....	46
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
6.1 Diseño y construcción de los bancos de mutantes en la zona de veinte residuos del N-terminal de LevS.....	47
6.2 Construcción del banco 136EKL138.....	50
6.3 Construcción del banco 139DDS141.....	53
6.4 Construcción del banco 142VSK144.....	55
6.5 Construcción del banco 145DLN147.....	56
7 IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE SCREENING DE MUTANTES AFECTADAS EN LA SÍNTESIS DE LEVANAS DE ALTO PESO MOLECULAR.....	58
8 CRIBADO DE LOS BANCOS DE MUTANTES EN LA REGIÓN N-TERMINAL DE LEVS.....	67
9 ANÁLISIS DE LA ENZIMA SILVESTRE Y LAS MUTANTES DE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LEVS.....	72
9.1 Purificación de LevS $\Delta$ N85C.....	72
9.2 Determinación de los parámetros cinéticos de LevS $\Delta$ N85C.....	75
10 CONCLUSIONES.....	79
11 PROSPECTIVAS.....	80
12 ANEXO.....	81
A Ensayos de purificación de LevS WT.....	81
13 BIBLIOGRAFÍA.....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las levanas e inulinas.....	13
Figura 2. Esquema de las reacciones efectuadas por las fructansacararas.....	15
Figura 3. Diversidad de fructansacararas multidominio .....	18
Figura 4. Estructura cristalográfica de InuJ de <i>Lactobacillus johnsonii</i> . ....	19
Figura 5. Mecanismo molecular de reacción de las fructansacararas.....	21
Figura 6. Subsitios de unión a carbohidrato en InuJ de <i>Lactobacillus johnsonii</i> .....	22
Figura 7. Subsitios de unión a carbohidrato en SacB de <i>Bacillus subtilis</i> . ....	23
Figura 8. Cromatografía en capa fina de productos a tiempos finales de reacción de una inulosacarasa.....	24
Figura 9. Dominios que conforman a LevS. ....	26
Figura 10. FOS sintetizados por LevS.....	27
Figura 11. Esquema de las versiones truncadas de LevS construidas. ....	28
Figura 12. Representación del plegamiento hipotético de la levansacarasa multidominio propuesto por García-Paz y colaboradores en 2021. ....	30
Figura 13. Esquema de las versiones truncadas en la región N-terminal de LevS construidas. ....	33
Figura 14. Los veinte residuos presentes en la región N-terminal de la versión truncada LevS $\Delta$ N135C. ....	34
Figura 15. Representación de los veinte residuos de la región N- terminal de LevS objetos de estudio. ....	48
Figura 16. Representación esquemática de LevS $\Delta$ N85C y de LevS $\Delta$ N135C.....	50
Figura 17. Electroforesis de ácidos nucleicos del producto de PCR para el banco de mutantes 136EKL138.....	51
Figura 18. Electroforesis de ácidos nucleicos del producto de PCR para el banco de mutantes 139DDS141. ....	54
Figura 19. Células de <i>E. coli</i> BL21 DE3 sembradas en medio de selección.....	60
Figura 20. Células de <i>E. coli</i> BL21 DE3 transformadas y sembradas en medio de selección con las mutantes productoras y no productoras de HM <sub>w</sub> L (LevS $\Delta$ N85C y SacB N242A respectivamente).....	62
Figura 21. Fenotipo mucoside con forma de burbuja de LevS $\Delta$ N85C .....	65
Figura 22. LevS $\Delta$ N85C con péptido-sígnal PelB leader. ....	66
Figura 23. Células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas y sembradas en medio de selección. ....	67
Figura 24. Reacción del 2,3,5-TTC en presencia de azúcares reductores. ....	71
Figura 25. Electroforesis de proteínas SDS-PAGE proveniente del ensayo de purificación de LevS N85C. ....	73

Figura 26. Electroforesis de proteínas SDS-PAGE proveniente del ensayo de purificación de LevS $\Delta$ N85C. ....	75
Figura 27. Gráfica de velocidad versus concentración de sustrato de LevS $\Delta$ N85C .....	77
Figura A1. Cromatograma del ensayo de purificación de LevS WT por IMAC.....	82
Figura A2. SDS-PAGE del ensayo de purificación de LevS WT.....	83
Figura A3. Cromatograma del ensayo de purificación de LevS WT por intercambio aniónico. ..	85

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Porcentaje de fructosa destinada a la síntesis de levana de alto peso molecular, FOS e hidrólisis de las versiones truncadas de LevS.....	29
Tabla II. Porcentaje de fructosa destinada a la síntesis de levana de alto peso molecular, FOS e hidrólisis de las versiones truncadas en la región N-terminal de LevS. ....	32
Tabla III. Representación del método “Mutagénesis Combinatoria Basado en Alanina”.....	48
Tabla IV. Bancos de mutantes de los 20 residuos de la región N-terminal de LevS.....	49
Tabla V. Cambios en el tamaño de la librería 136EKL138 antes y después de implementar la ligación SLiCE.....	53
Tabla VI. Representación de los residuos y los codones que fueron degenerados para la construcción del banco 139DDS141 .....	53
Tabla VII. Representación de los residuos y los codones que fueron degenerados para la construcción del banco 142VSK144.....	56
Tabla VIII. Representación de los residuos y los codones que fueron degenerados para la construcción del banco 145DLN147.....	57
Tabla IX. Parámetros cinéticos de levansacarosas uni- y multidominio.....	78
Tabla A1 Ensayo de purificación de LevS por IMAC. ....	84
Tabla A2 Ensayo de purificación de LevS por cromatografía de intercambio iónico.....	87

## ABREVIATURAS

<i>6xHisTag</i>	<i>Etiqueta de histidinas</i>
<i>Å</i>	<i>Angstroms</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosín Trifosfato</i>
<i>DEAE+</i>	<i>Dietilaminoetilcelulosa</i>
<i>DNS</i>	<i>Ácido 3,5-dinitrosalicílico</i>
<i>FOS</i>	<i>Fructooligosacáridos</i>
<i>FPLC</i>	<i>Cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad</i>
<i>GH</i>	<i>Glicosil-Hidrolasa</i>
<i>H/T</i>	<i>Hidrolisis- Transferencia</i>
<i>HM<sub>w</sub>L</i>	<i>Levana de alto peso molecular</i>
<i>IMAC</i>	<i>Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados</i>
<i>IPTG</i> <i>kDa</i>	<i>Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranososa</i> <i>Kilodalton</i>
<i>LB</i>	<i>Luria Bertani</i>
<i>OB</i>	<i>Sitio de unión a oligosacárido</i>
<i>PCR</i>	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>
<i>recA</i>	<i>Gene de a recombinasa A</i>
<i>SLiCE</i>	<i>Seamless Ligation Cloning Extract</i>
<i>SUD</i>	<i>Sitio de unión desordenado</i>
<i>TTC</i>	<i>2,3,5- Trifeniltetrazolio</i>
<i>UV</i>	<i>Ultravioleta</i>
<i>WT</i>	<i>Silvestre</i>

## RESUMEN

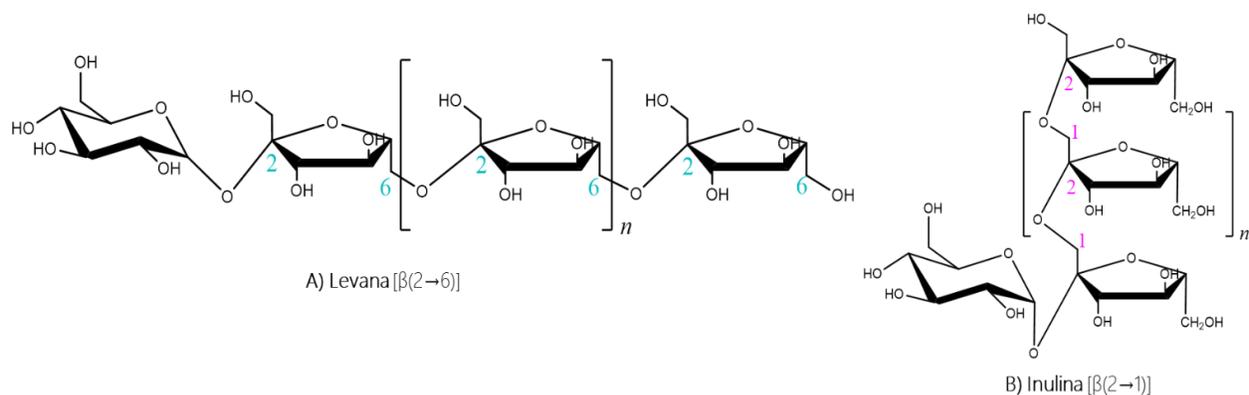
En este trabajo se diseñó un método novedoso para la construcción de bancos de triples mutantes continuas en la región N-terminal implicada en la síntesis de levana de alto peso molecular ( $HM_{wL}$ ) de LevS, a través de la modificación de los codones silvestres por el de alanina, que genera bancos de mutantes con diversidad controlada y una cantidad de clonas pequeñas (~200 clonas por banco) a explorar para estudiar todas las variantes en términos de aminoácidos posibles, a este método lo denominamos “mutagénesis combinatoria basada en alanina”. A su vez fue posible implementar un método de cribado que permite diferenciar las mutantes de LevS afectadas en la síntesis de  $HM_{wL}$  de las que no, a través de la identificación de un fenotipo mucoide y uno no mucoide respectivamente. Este método fue utilizado para cribar los cuatro bancos de mutantes construidos en este trabajo, que son:  $^{136}EKL_{138}$ ,  $^{139}DDS_{141}$ ,  $^{142}VSK_{144}$  y  $^{145}DLN_{147}$ . El cribado de los bancos arrojó que el banco  $^{139}DDS_{141}$  posee un conjunto de mutaciones  $^{139}ASG_{141}$ , sin embargo, todas las mutantes de los bancos construidos poseen una transversión de G→T que ocasiona la aparición de un codón de paro en el residuo E123, cuya secuencia nucleotídica GAA, sugerimos es un hotspot. Por otra parte, se implementó un método de purificación y se realizó la caracterización cinética de la enzima modelo de este trabajo, demostrando que esta enzima tiene una  $K_M$  de 22.89 mM,  $k_{cat}$  146.6 s<sup>-1</sup> y una eficiencia catalítica de 6.4 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Siendo estos parámetros similares a los de otras levansacararas multidominio de *Leuconostoc mesenteroides*, mientras que la eficiencia catalítica es inferior tanto para levansacararas multidominio del género *Lactobacillus*, así como para las unidominio.

El estudio de la región N-terminal implicada en la síntesis de HM<sub>w</sub>L de LevS permitió elaborar un protocolo que incluye el desarrollo e implementación de técnicas novedosas para el estudio de regiones que comprenden más de un residuo en enzimas fructansacarasas, implicadas en la síntesis de fructanas de alto peso molecular.

# 1 GENERALIDADES

## 1.1 Fructanas

Las fructanas son polisacáridos compuestos predominantemente por fructosas unidas mediante enlaces tipo  $\beta$ -glicosídico. Las fructanas se pueden clasificar de acuerdo a la cantidad de fructosas unidas en la cadena principal: fructooligosacáridos (FOS) cuando constan de 3 a 10 unidades de fructosa; mientras que, cuando posee más de 10 unidades se denomina polímero de fructana propiamente [Olvera, Castillo & Lopez-Munguia, 2007]. La posición del enlace glicosídico que une a las fructosas en este tipo de carbohidratos, clasifica a las fructanas en dos grandes grupos: las (i) inulinas que se caracterizan por tener enlaces  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) en la cadena principal, con ramificaciones del tipo  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6); mientras que, las fructosas unidas con enlaces de naturaleza  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 6) con ramificaciones  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) reciben el nombre de (ii) levanas (Figura 1) [Banguela, 2006].



**Figura 1. Estructura química de las levanas e inulinas**

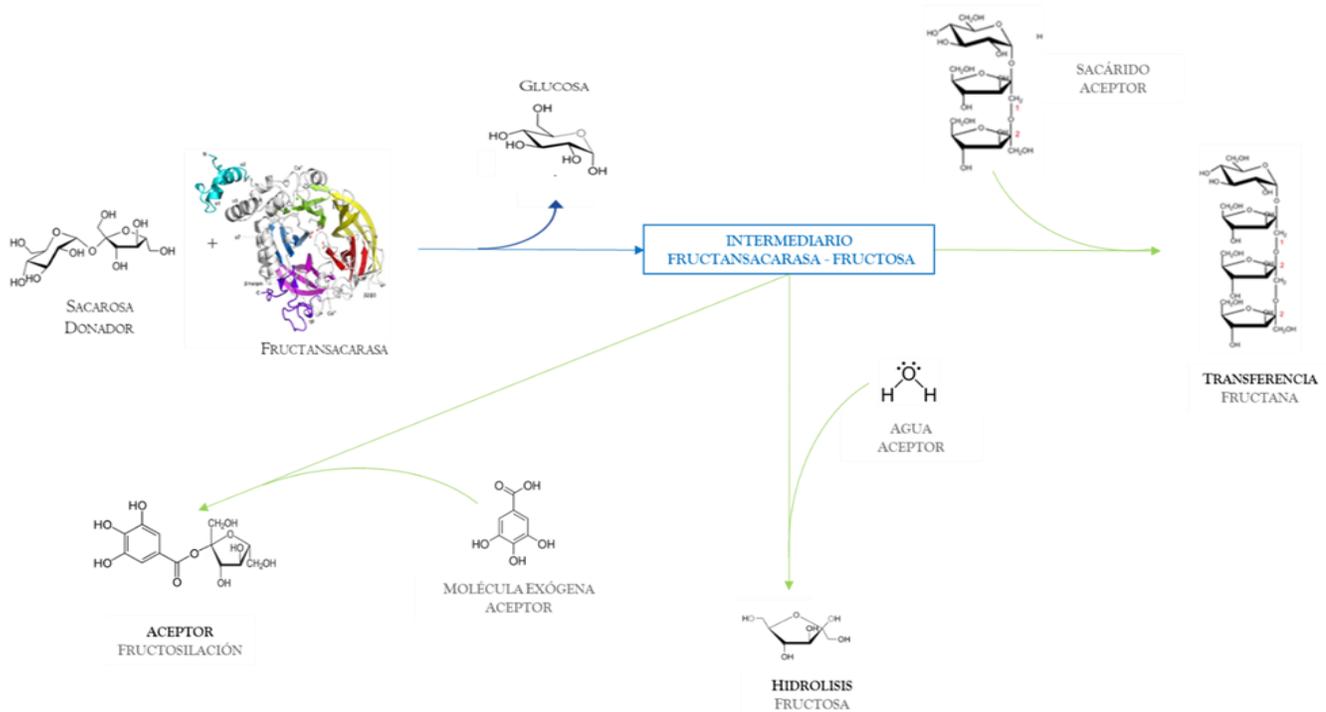
Las fructanas han demostrado ser moléculas con potencial biotecnológico, ya que es más conocido que este tipo de carbohidratos son agentes prebióticos, debido a que no son digeridos por el ser humano, pero si consumidos por la microbiota intestinal benéfica, mejorando la salud [Roberfroid & Slavin, 2000]. Recientemente, se demostró que los polímeros de fructanas de alto peso molecular se estructuran en forma de nanopartículas durante su síntesis enzimática [Jiménez-Sánchez et al., 2019], lo que implica una apertura hacia su aplicación dentro de la nanobiotecnología. Por otra parte, se ha demostrado que la fructana producida por una fructansacarasa presente en *Leuconostoc mesenteroides* S81 actúa como inmunomoduladora, ya que promueve la síntesis de la citosina antiinflamatoria IL-4, sugiriendo su potencial biomédico el cual se está explorando en tiempo recientes [Taylan, Yilmaz & Dertli, 2019].

## 1.2 Fructansacarasas

Las fructansacarasas son las enzimas responsables de la síntesis de fructanas, quienes utilizan sacarosa como sustrato. Las fructansacarasas pueden clasificarse de acuerdo a la fructanas que sintetizan en: inulosacarasas (EC 2.4.1.9) que sintetizan inulina y levansacarasas que sintetizan levana (EC 2.4.1.10) [Banguela, 2006].

Durante la reacción enzimática de síntesis de las fructanas, una molécula de sacarosa actúa como donador de la unidad de fructosa, después de la ruptura del enlace glicosídico, reteniendo la fructosa de manera covalente en la enzima (intermediario fructosil-enzima) y liberando la molécula de glucosa al medio de reacción. La molécula de fructosa retenida por la

enzima será transferida a una molécula aceptora. La naturaleza química de los aceptores define los tres tipos de reacción que las fructansacararas catalizan (Figura 2). En la (i) reacción de hidrólisis, una molécula de agua actúa como aceptor de la fructosa, liberando ésta al medio de reacción; si la molécula aceptor es sacarosa o una fructana en crecimiento, esta reacción se denomina (ii) reacción de polimerización, mientras que si el aceptor es un compuesto exógeno al medio de reacción (i.e. alcohol primario) se lleva a cabo una (iii) reacción de aceptor [Chambert, Treboul & Dedonder, 1974].



**Figura 2. Esquema de las reacciones efectuadas por las fructansacararas.**

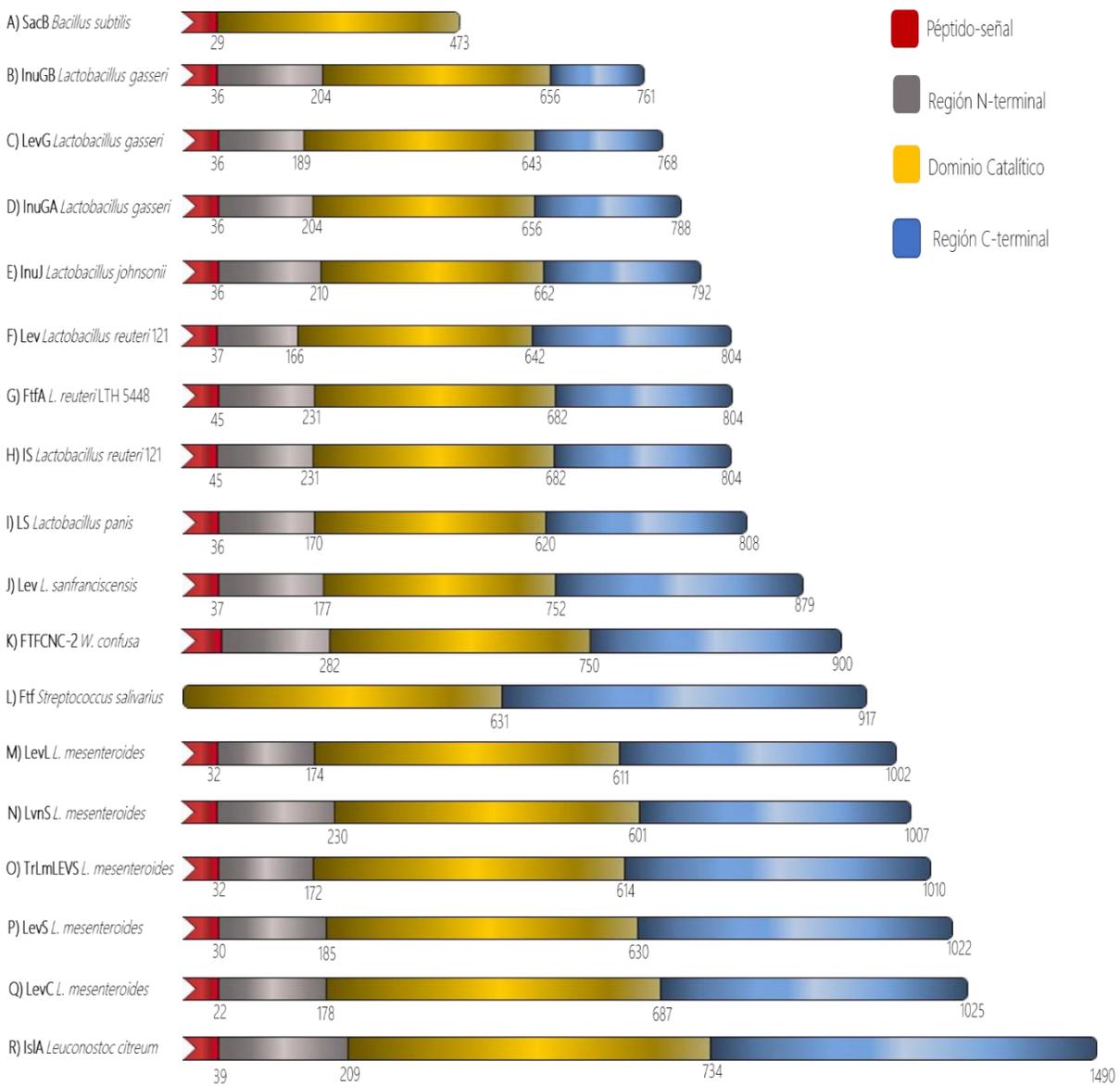
Las fructansacararas se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a su arquitectura: las (i) unidominio, que cuentan únicamente con el dominio catalítico, lo que les confiere un peso molecular que oscila entre 40 y 60 kDa (Figura 3A), y son producidas por microorganismos tanto Gram positivos, como Gram-negativos, como *Bacillus subtilis*; *Gluconacetobacter diazotrophicus* [Martínez-Fleites et al., 2005] y *Zymomonas mobilis* [Bekers et al., 2002]. Las fructansacararas (ii) multidominio, que además del dominio catalítico, cuentan con regiones adicionales que lo flanquean en los extremos N y C-terminal y son producidas principalmente por bacterias ácido lácticas del género *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weisiella*, entre otros.

Ambos tipos de enzimas contienen un péptido-señal, que es una región de aproximadamente 30 aminoácidos en estas enzimas, que auxilia en la translocación de la proteína hacia el medio extracelular.

En las enzimas multidominio, la región N- terminal presenta un tamaño que oscila entre los 150 y 200 aminoácidos, y su composición es variable entre las distintas fructansacararas de esta subclase. El dominio catalítico posee en promedio 500 residuos. Mientras que, la región C-terminal en algunas enzimas tiene motivos LPXTG, que se asocian a anclaje en pared celular tanto en inulosacararas como en levansacararas [Del Moral et al., 2008; Lee, Pancholi & Fischetti, 2002; van Hijum, Karjl, Ozimek, Dijkhuizen & van Geel-Schutten, 2006].

En la figura 3, se representan las fructansacararas multidominio reportadas hasta el momento, entre las que podemos destacar a la inulosacarasa IsIA de *Leuconostoc citreum* CW28 (Figura 3R), que posee dominios adicionales al catalítico que se extienden hacia los extremos N- y C-terminal, este último

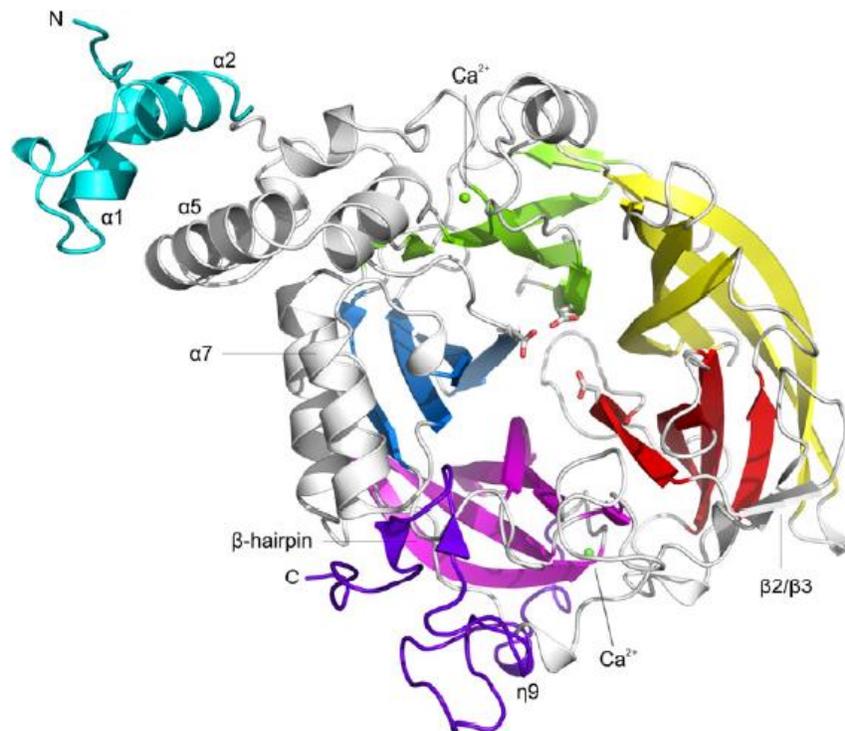
participa en el anclaje de la enzima hacia la superficie celular; mientras que, se propone que los dos dominios interactúan con el dominio catalítico permitiendo el acceso a una estructura tridimensional que le da estabilidad a la enzima durante la catálisis [Del Moral et al., 2008]. Por otra parte, en el mismo grupo de investigación, se identificaron y clonaron dos levansacararas provenientes de la cepa *Leuconostoc mesenteoides* NRRL B-1118, LevL (Figura 3M), que cuenta con 1002 residuos, que equivale a un peso molecular de aproximadamente 112 kDa y LevC (Figura 3Q), que posee 1015 residuos, con un peso molecular teórico de 113 kDa. Estas levansacararas poseen una región N-terminal variable, que, además, en LevC se describe la presencia de 10 unidades repetidas de 13 residuos en promedio dentro de esta zona. El dominio catalítico de LevC está conformado por 445 residuos, mientras que el de LevL cuenta con 444 residuos. La región C-terminal de estas dos levansacararas posee 500 residuos con tres repeticiones de 90 residuos que se ha propuesto, podrían estar relacionadas con la unión de carbohidrato en estas enzimas [Olvera et al., 2006].



**Figura 3. Diversidad de fructansacarosas multidominio.** Representación esquemática de las fructansacarosas multidominio microbianas reportadas actualmente.

### 1.3 Dominio catalítico de las fructansacarasas

Las fructansacarasas uni y multidominio poseen un dominio catalítico que presenta un plegamiento de tipo  $\beta$ -propela de cinco láminas  $\beta$ , con topología tipo “W”, debido a la disposición antiparalela de las cuatro hebras  $\beta$  que componen cada lámina. Estas láminas están empaquetadas de frente, lo que genera un arreglo tridimensional global en forma de “embudo” (Figura 4) [Pijning et al., 2011].



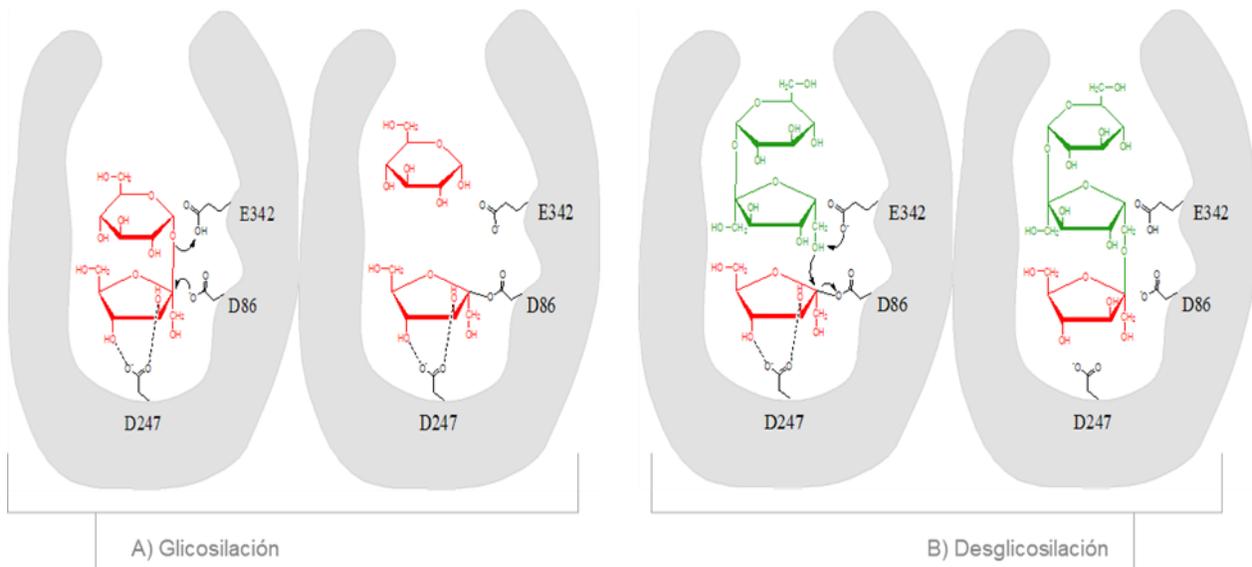
**Figura 4. Estructura cristalográfica de InuJ de *Lactobacillus johnsonii*.** Se aprecia el plegamiento del dominio catalítico, una fracción del dominio N-terminal, conformado por dos  $\alpha$ -hélices interconectadas por un loop, la región y una fracción de la región C-terminal [Pijning et al., 2011].

La estructura cristalográfica de una enzima multidominio truncada, la inulosacarasa InuJ, nos permite apreciar la  $\beta$ -propela de tipo embudo en estas enzimas (Figura 4). InuJ está compuesta por una región N-terminal variable de 172 residuos conformada por dos  $\alpha$ -hélices conectadas a través de un loop. Estas dos hélices ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ) están empaçadas de manera lateral al dominio catalítico, interactuando con la  $\alpha$ -hélice  $\alpha 5$  de este dominio. La hélice  $\alpha 2$  está conectada a través de un loop conformado por 12 residuos al dominio catalítico, 453 aminoácidos, y una región C-terminal de la que apenas pueden apreciarse 45 residuos que forman una  $\alpha$ -hélice corta y una horquilla beta que se empaquetan a un lado del dominio catalítico [Pijning et al., 2011].

#### 1.4 Aspectos moleculares del mecanismo de reacción

El inicio de la reacción está definido por la interacción de la sacarosa, que actúa como donadora de la unidad de fructosa, en la fructansacarasa. Es entonces cuando el residuo nucleofílico realiza un ataque sobre el carbono anomérico de la unidad de fructosa de la sacarosa. Al mismo tiempo, un residuo aspártico cede un protón al oxígeno del enlace glicosídico de la sacarosa, lo que resulta en la formación de un intermediario covalente fructansacarasa-fructosa (Figura 5A), esta etapa de la reacción es conocida como "glicosilación", y permite la liberación de la glucosa al medio de reacción. La siguiente etapa, denominada "desglicosilación" (Figura 5B), el residuo ácido-base actúa como base removiendo un hidrógeno ácido del aceptor, lo que se traduce en la formación de un mejor nucleófilo con carga formal negativa, que realiza un ataque sobre el carbono anomérico de la

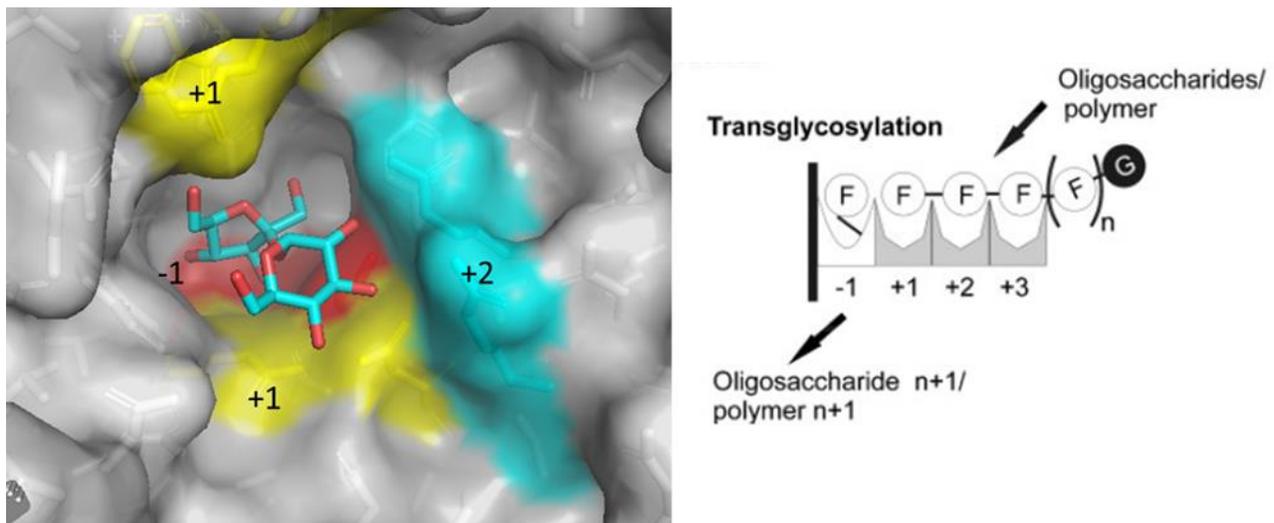
fructosa del intermediario covalente. Esto causa la ruptura del intermediario y la transferencia de la unidad de fructosa a la molécula aceptora, con la regeneración de los residuos catalíticos [Chambert & Gonzy-Treboul, 1976].



**Figura 5. Mecanismo molecular de reacción de las fructansacarasas.** Se muestran las dos etapas, (a) glicosilación y (b) desglicosilación [Modificado de Raga-Carbajal, 2018].

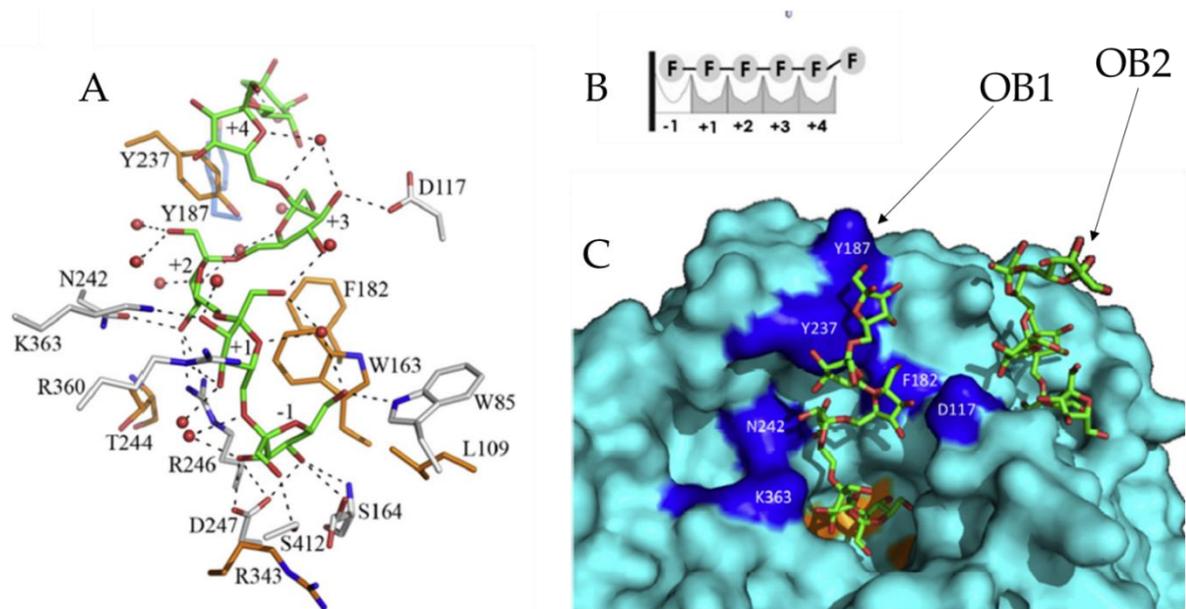
Ubicados en el fondo de la  $\beta$ -propela, se encuentran los residuos responsables de reconocimiento al residuo fructosilo en un arreglo tridimensional específico dentro de un radio de 5.0 a 6.4 Å, denominado subsitio de unión a carbohidrato -1. Contiguo a este, se encuentran otros residuos que a través de diversas interacciones intermoleculares como las hidrofóbicas [McGaughey, Gagné & Rappé, 1998], o los puentes de hidrogeno directos y/o mediados por moléculas de agua [Meng & Futterer, 2003], auxilian en el reconocimiento y acomodo de los productos en estas enzimas. Tanto los esqueletos como las cadenas laterales de estos residuos pueden participar como subsitios de unión a carbohidrato, y obedecen una nomenclatura, que por convención y en contraste con la propela, posiciona

el extremo reductor del carbohidrato hacia afuera de y el no reductor en dirección hacia la cavidad catalítica, el punto donde se lleva la ruptura o formación de enlace es entre los subsitios -1 y +1 y define el resto de los subsitios en cuestión. Para el caso de levanas e inulinas los extremos no reductores se posicionan en los subsitios +2, +3, etc. [Davies, Wilson & Henrissat, 1997]. La estructura cristalográfica de InuJ de *Lactobacillus johnsonii* nos permite apreciar tres subsitios de unión a carbohidrato, el -1, +1 y +2 (Figura 6), que mantienen interacciones intermoleculares con el trisacárido 1-kestosa.



**Figura 6. Subsitios de unión a carbohidrato en InuJ de *Lactobacillus johnsonii*.** Representación esquemática de la asignación de subsitios de unión a carbohidratos en InuJ de acuerdo a la nomenclatura descrita por Davies y colaboradores en 1997 [Modificado de Pijning et al., 2011; Ozimek 2006]

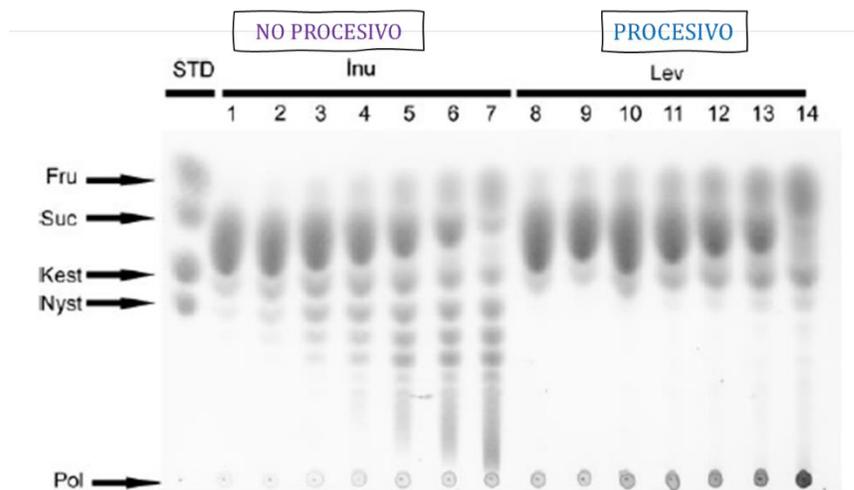
Por otra parte, Raga et al., en 2020 obtuvieron la cristalográfica de la levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis*, en complejo con un ligando tipo levanhexosa, que permitió definir 5 subsitios de unión a carbohidrato, desde el -1 hasta el +4 (Figura 7). Las mutaciones realizadas sobre los residuos que pertenecen a estos subsitios afectaron el tamaño de las levanas de bajo peso molecular sintetizadas, mientras que la síntesis de levanas de alto peso molecular se mantuvo. Esto podría indicar que los elementos estructurales involucrados en la síntesis de levanas de alto peso molecular podrían encontrarse en elementos o ubicaciones alejadas de la cavidad catalítica, como es el caso del sitio de unión a oligosacárido 2 (OB2) (Figura 7C), el cual podría estar auxiliando la producción de levanas reteniendo al aceptor a la enzima. [Raga-Carbajal et al., 2021].



**Figura 7. Subsitios de unión a carbohidrato en SacB de *Bacillus subtilis*.** (A) Levanhexosa unida a SacB desde el subsitio -1 hasta el +4. (B) Representación esquemática de los subsitios de unión a carbohidrato identificados en SacB y el ligando levanhexosa. (C) Sitios de unión a oligosacárido OB1 y OB2 hallados en complejo con SacB [Raga-Carbajal et al., 2021].

## 1.5 Mecanismo de elongación de levanas

El mecanismo de elongación describe la cantidad de residuos fructosilo que pueden ser transferidos a una fructana en crecimiento, hasta que el complejo enzima-fructana se disocia. Se ha propuesto que la elongación de fructanas sucede bajo dos esquemas de elongación: la (i) vía no procesiva, se caracteriza por la disociación del complejo fructansacarasa-fructana después de cada ciclo de adición de un residuo fructosilo, lo que genera principalmente FOS con diversos grados de polimerización (Figura 8, panel



**Figura 8. Cromatografía en capa fina de productos a tiempos finales de reacción de una inulosacarasa.** En el panel izquierdo se aprecia el perfil de productos características de la vía de elongación de polisacáridos no procesiva, mientras que a la derecha se muestra el perfil de productos de una levansacarasa procesiva [Ozimek et al., 2006].

izquierdo). En la (ii) vía procesiva se transfieren residuos fructosilo de manera consecutiva, hasta que la fructana sintetizada alcanza un peso molecular de aproximadamente 2,300 kDa, lo que culmina con la disociación del complejo enzima-producto, revelando un perfil de productos en el que únicamente se observan los iniciadores de la elongación del polímero en la

vía procesiva y los productos finales de alto peso molecular (Figura 8, panel derecho.) [Ozimek et al., 2006]

Se ha documentado que el tamaño de las fructanas puede ser modulado por las condiciones de reacción enzimáticas, por ejemplo, SacB de *Bacillus subtilis* sintetiza levanas de alto peso molecular (2,300 kDa) de manera procesiva cuando se utilizan bajas concentraciones de enzima, mientras que cuando se utiliza una concentración elevada de esta levansacarasa, se producen predominantemente FOS, bajo la vía no procesiva y polímeros de bajo peso molecular que alcanzan los 7.2 kDa [Raga-Carbajal et al., 2015].

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 La levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F

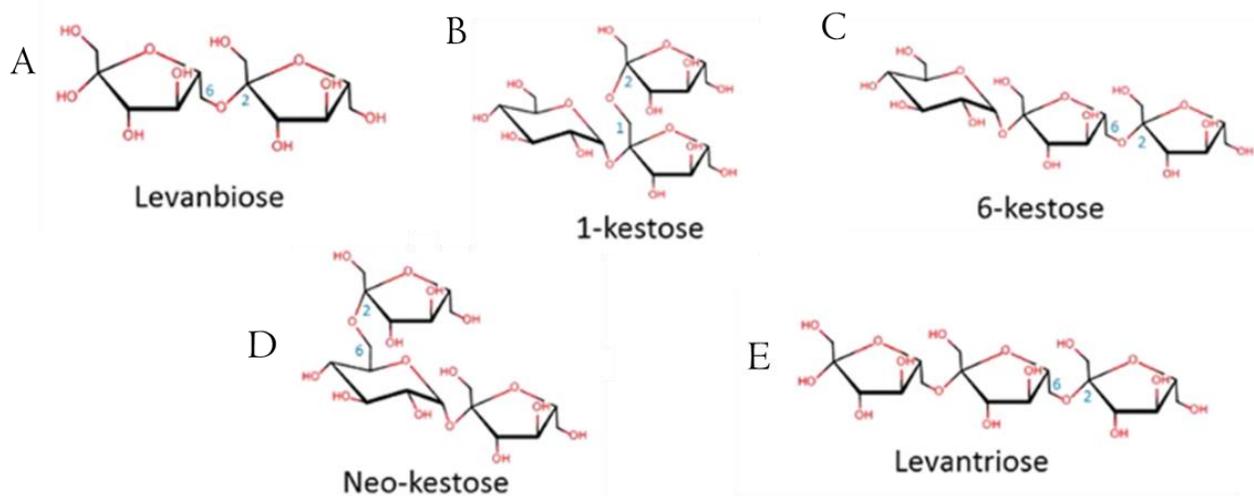
Robyt y Walseth en 1979, reportaron que la cepa industrial productora de dextrana, *L. mesenteroides* NRRL-B512 era capaz de producir una levansacarasa. Esta levansacarasa, denominada LevS, fue identificada y caracterizada por Morales Arrieta et al, 2006. LevS es un enzima que cuenta con 4 dominios: (i) una región N- terminal de 155 residuos que alberga un péptido-señal formado por 30 residuos, (ii) un dominio catalítico de 445 residuos conservados entre las fructansacarasa de la familia GH68, (iii) una región de transición de 138 residuos que se encuentra dentro de la región (iv) C-terminal que cuenta con 254 residuos (Figura 9).



**Figura 9. Dominios que conforman a LevS.** (I) Región N-terminal compuesta por 155 residuos que alberga un péptido-señal de 30 residuos, (II) dominio catalítico compuesto por 445 residuos, (III) región de transición compuesta por 138 residuos y (IV) región C-terminal compuesta por 254 residuos. [García-Paz, 2019].

Esta enzima multidominio tiene un pH óptimo de 6 y el rango de temperatura optima oscila entre los 30 y 35°C. En cuanto a sus propiedades cinéticas, LevS exhibe un comportamiento tipo Michaelis-Menten, con una constante de afinidad (Km) de  $36.7 \pm 5.4$  mM, y una velocidad máxima (Vmax) de  $7.5 \pm 2.56$  U/mg. LevS es una fructansacarasa que presenta

predominantemente actividad transferasa, ya que su relación de hidrolisis/transferencia (H/T) es de 10/90% respectivamente. Adicionalmente, LevS es principalmente polimerasa, ya que al determinar el porcentaje de fructosa que LevS destina a síntesis de levana, FOS e hidrolisis, se aprecian los valores de 71%, 21% y 8% respectivamente. La levana sintetizada por LevS es de alto peso molecular (HM<sub>w</sub>L), con una masa aproximada de 2,200 kDa [Morales-Arrieta et al., 2006]. El repertorio de FOS sintetizados por LevS incluye el disacárido levanobiosa, los trisacáridos 1-kestosa, 6-kestosa, neo-kestosa y levantriosa (Figura 10). Con grados de polimerización de hasta 8 se encuentran los FOS de la serie 1-kestosa y 6-kestosa, que corresponde a la adición de residuos fructosilo sobre los iniciadores correspondientes (Figura 10B y C), siendo los FOS de la serie 6-kestosa los que presentan mayor acumulación [García-Paz et al., 2022].



**Figura 10. FOS sintetizados por LevS.** Estructura química de los FOS sintetizados por LevS de *L. mesenteroides* a 30°C, en buffer de acetatos pH 6 y 350 rpm. [Tomado y modificado de Raga-Carbajal, 2018].

## 2.2 Estudios de relación estructura-función de las regiones adicionales de LevS

García-Paz, et al 2019, con el objetivo de entender la participación de las regiones adicionales al dominio catalítico de LevS en la síntesis de levanas, construyeron y caracterizaron versiones truncadas, en las cuales fueron eliminadas las diferentes regiones (Figura 11).



**Figura 11. Esquema de las versiones truncadas de LevS construidas.** Representación de la secuencia primaria de las versiones truncadas, incluyendo el número de residuo donde inicia y termina cada región, así como su peso molecular teórico basado en la secuencia de aminoácidos.

Los dominios adicionales de LevS están implicados en sus propiedades bioquímicas, como en el pH óptimo, ya que la eliminación tanto de los extremos N- y C-terminal produce un cambio. Por otra parte, la temperatura óptima se ve drásticamente reducida en 10 °C al remover la región N-terminal, y este mismo efecto es observado cuando se elimina la región de transición junto con la región N-terminal, esta última, implicada directamente a través de la estabilización de la enzima.

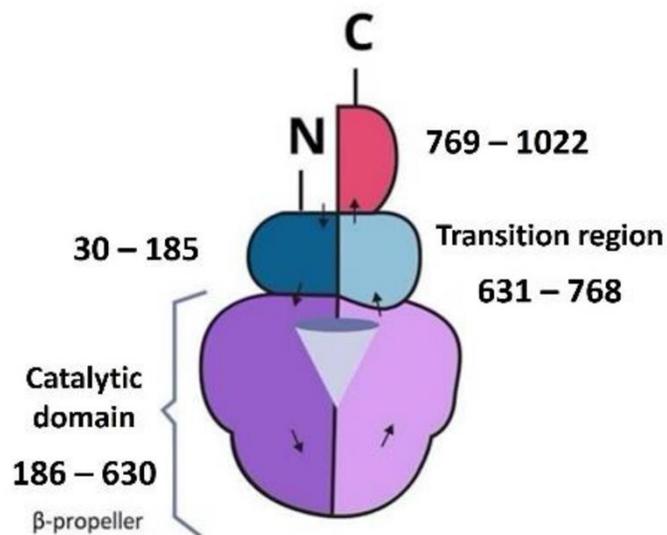
Por otro lado, el estudio de los productos de reacción de las versiones truncadas de LevS permitió observar que la remoción de la región N- y C-terminal (LevS  $\Delta$ NC) afecta drásticamente la síntesis de HM<sub>w</sub>L, hecho que también se aprecia al eliminar las regiones adicionales (LevS Cat), dejando únicamente al dominio catalítico (Tabla I).

**Tabla I. Porcentaje de fructosa destinada a la síntesis de levana de alto peso molecular, FOS e hidrolisis de las versiones truncadas de LevS.** Los valores obtenidos en la tabla provienen de reacciones con 0.29M de sacarosa al inicio de reacción, buffer acetatos pH 6, 30°C y 350 rpm. \*Estas enzimas solo alcanzaron un 20% de conversión.

Versión de LevS	Polímero de alto peso molecular [~2200 kDa]	Productos de bajo peso molecular [~0.5 a 1.4 kDa]	Hidrolisis
LevS (WT)	71.32 ± 0.02	21.32 ± 1.81	7.37 ± 0.02
$\Delta$ C	68.9 ± 1.82	2.0 ± 0.33	29.1 ± 1.74
$\Delta$ TnC	5.7 ± 0.08	9.3 ± 0.03	85 ± 0.10
$\Delta$ N	73.1 ± 2.21	1.2 ± 0.32	25.7 ± 0.23
$\Delta$ NC*	0	0	100
LevS Cat*	0	0	100

Estos estudios de estructura-función de los dominios adicionales de la levansacarasa LevS indican que las regiones de transición y N-terminal están implicadas en la transferencia de residuos fructosilo dirigido a la

síntesis de HM<sub>w</sub>L. Esto apoya la hipótesis de que los 155 residuos de la región N-terminal y los 138 residuos de la región de transición podrían estar interactuando con el dominio catalítico, formando un dominio que podría albergar subsitios de unión a carbohidrato, lo que podría favorecer la capacidad de síntesis de HM<sub>w</sub>L, mientras que la región C-terminal podría estar por encima (Figura 12) formando otro dominio totalmente independiente que sirve de apoyo tanto para el dominio formado por las regiones N- y C-terminal, así como en la síntesis de HM<sub>w</sub>L [García-Paz et al., 2022].



**Figura 12. Representación del plegamiento hipotético de la levansacarasa multidominio propuesto por García-Paz y colaboradores en 2021.**

## 2.3 Función de la región N-terminal de LevS en la síntesis de levanas de alto peso molecular

Como describimos anteriormente las regiones adicionales al dominio catalítico en LevS de *Leuconostoc mesenteroides* están implicadas en las propiedades bioquímicas, estabilidad y la síntesis de HM<sub>w</sub>L. Específicamente, la región N-terminal participa tanto en la estabilización de la enzima como en la síntesis de FOS y HM<sub>w</sub>L. Por consiguiente, Martínez-Bahena., 2020 decidió estudiar a profundidad el efecto de la región N-terminal en la síntesis de HM<sub>w</sub>L y FOS en LevS.

Los primeros estudios sugieren que los 155 residuos pertenecientes a la región N-terminal de LevS son una región peptídica intrínsecamente desordenada, tanto por el servidor IUPRED (<https://iupred2a.elte.hu/>), así como por su contenido rico en residuos hidrofílicos [Dyson & Wright, 2005]. Dentro de esta región N-terminal desordenada se encontraron 5 sitios de unión desordenados (SUD). En general, se ha sugerido que los SUD podrían pasar de un estado desordenado a uno estructurado, con ayuda de un “partner”, que puede ser una proteína globular [Mészáros et al., 2009]. En el caso de los SUD del N-terminal de LevS, podría estructurarse por interacción con la región de transición, con el dominio catalítico o con ambos [Martínez-Bahena., 2019].

**Tabla II. Porcentaje de fructosa destinada a la síntesis de levana de alto peso molecular, FOS e hidrolisis de las versiones truncadas en la región N-terminal de LevS.** Los valores obtenidos en la tabla provienen de reacciones con 0.29M de sacarosa al inicio de reacción, buffer acetatos pH 6, 30°C y 350 rpm. \*Estas enzimas solo alcanzaron un 20% de conversión.

<b>Versión de LevS</b>	<b>Polímero de alto peso molecular [~2200 kDa]</b>	<b>Productos de bajo peso molecular [~0.5 a 1.4 kDa]</b>	<b>Hidrolisis</b>
LevS (WT)	71.32 ± 0.02	21.32 ± 1.81	7.37 ± 0.02
ΔC	68.9 ± 1.82	2.0 ± 0.33	29.1 ± 1.74
ΔN45C	36.6 ± 1.6	38.3 ± 0.2	25 ± 0.06
ΔN85C	68.4 ± 2.2	11.5 ± 1.8	20 ± 0.01
ΔN135C	78.4 ± 2.4	2.1 ± 1.3	19.5 ± 0.43
ΔNC*	0	0	100
LevS Cat*	0	0	100

Al evaluar la síntesis de FOS, hidrolisis y síntesis de HM<sub>w</sub>L en versiones truncadas en el extremo N-terminal (Figura 13), se demostró que la eliminación de 45 residuos (un SUD) (LevS ΔN45C) afecta el porcentaje de fructosilos que se destinan a la síntesis de HM<sub>w</sub>L, aumentando la transferencia hacia FOS y generando una versión bimodal.

LevS ΔN85C, en la que se removieron 85 residuos de la región N-terminal (tres SUD), es capaz de sintetizar HM<sub>w</sub>L y FOS con valores cercanos a LevS WT. Eliminar 135 residuos (4 SUD) de la región N-terminal (LevS ΔN135C), permite que la enzima restituya la capacidad de sintetizar HM<sub>w</sub>L como LevS WT (Tabla II) [Martinez-Bahena., 2019]. Interesantemente, cuando eliminamos completamente la región N-terminal que incluye todos los SUDs

convertimos a la enzima en una hidrolasa. Estos resultados sugieren que los 20 residuos de la región N-terminal (solamente un SUD), presentes en la enzima LevS  $\Delta$ N135C (Figura 14) contienen las determinantes estructurales implicadas en la capacidad de sintetizar levanas de alto peso molecular.



**Figura 13. Esquema de las versiones truncadas en la región N-terminal de LevS construidas.** Representación de la secuencia primaria de las versiones truncadas, incluyendo el número de residuo donde inicia y termina cada región, así como su peso molecular teórico basado en la secuencia de aminoácidos.

Resulta interesante estudiar que residuo o conjunto de residuos, dentro de esta zona de 20 aminoácidos, participa directamente en la síntesis de H<sub>W</sub>ML con esta propiedad, sin embargo, mutagenizar cada residuo en un scanning clásico de alaninas, resulta exhaustivo, ya que se requeriría la construcción de 20 mutantes puntuales, más su caracterización. Ante esta problemática, en este trabajo, se propone el estudio de estos veinte residuos a través de la construcción de bancos de triples mutantes continuas en esta zona de la región N-terminal de LevS, empleando primers degenerados, junto con la implementación de un método de selección que permita identificar a

mutantes afectadas en la síntesis de HM<sub>w</sub>L, que nos revelarían información acerca de que residuos participan directamente en esta propiedad.

86-TSTTAVAETKTAVNTSESESGSNNEQLAETATDNAKVNDASSQKQSTPSVEKLDDSVSKDLNSKTTVVTK-155

***Figura 14. Los veinte residuos presentes en la región N-terminal de la versión truncada LevS  $\Delta$ N135C.***

### 3 HIPÓTESIS

Es posible generar y seleccionar bancos de mutantes afectadas en la síntesis de levana de alto peso molecular a través de un método de mutagénesis semi-razional de la zona de veinte residuos acoplado a un método de screening basado en la capacidad que tienen las variantes de LevS en la región N-terminal de producir HM<sub>w</sub>L de las que no, a través de la apreciación de dos fenotipos totalmente distinguibles

### 4 OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Generar y seleccionar mutantes afectadas en la síntesis de HM<sub>w</sub>L a través de un método mutagénesis semi-razional de la región de 20 residuos acoplado a un método de selección basado en dos fenotipos que permiten distinguir variantes de LevS productoras de HM<sub>w</sub>L de las que no.

#### 4.2 Objetivos específicos

- I. Diseño y construcción de un banco mutantes de los residuos de los residuos de la región N-terminal implicados en la síntesis de polímero en LevS.
- II. Implementación de un método de selección de mutantes afectadas en la síntesis de levanas de alto peso molecular.
- III. Cribado de los bancos de mutantes de la zona de veinte residuos en la región N-terminal de LevS.

IV. Análisis de la enzima silvestre y las mutantes de la región N-terminal de LevS seleccionadas.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Construcción de las librerías por mutagénesis combinatoria basada en alanina

Para cada librería, se llevó a cabo una reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) utilizando como templado el plásmido pLSΔN85C (40 ng), 0.5 μM de cada uno de los primers, la DNA polimerasa Q5 (0.02 U) y los cuatro dNTP (0.2 mM cada uno) en un volumen final de 40 μL. Las condiciones de PCR se realizaron de dos formas distintas: el protocolo en dos pasos: 98°C durante 10 minutos (1 ciclo), 98°C durante 1 minuto, 72°C durante 7.5 minutos (25 ciclos), 72°C durante 10 minutos (1 ciclo); y el protocolo en tres pasos: 98°C durante 10 minutos (1 ciclo), 98°C durante 1 minuto, (68°C para la librería <sup>138</sup>DDS<sub>140</sub>; 70°C para la librería <sup>141</sup>VSK<sub>143</sub> y 66°C para la librería <sup>144</sup>DLN<sub>146</sub>) durante 1 minuto, 72°C durante 7.5 minutos (25 ciclos), 72°C durante 10 minutos (1 ciclo). El crudo de reacción fue sometido a una digestión con la enzima DpnI (2U) a 37 °C durante una hora para eliminar el DNA parental. Posteriormente se realizó una purificación del amplicón utilizando una extracción líquido-líquido con cloroformo. El amplicón se sometió a una ligación SLiCE a 37°C durante una hora y se purificó con cloroformo.

Los codones sometidos a degeneración se muestran en letras negritas y subrayados, donde **R** es (G+A), **S** es (G+C), **K** es (G+T), **Y** es (T+C), **M** es (A+C), **H** es (A+C+T) y **D** es (G+A+T).

### 5.1.1 Librería <sup>135</sup>EKL<sub>137</sub>

La reacción de PCR para construir este banco se realizó con los primers: Fw\_EKL (5'- TCT GTA GMA RMA SYA GAT GAT AGT GTT TCA AAA GAT TTG-3') y Rv\_EKL (5'-ATC TRS TKY TKC TAC AGA TGG AGT TGA TTG CTT C-3') con el protocolo de dos pasos para la reacción de PCR.

### 5.1.2 Librería <sup>138</sup>DDS<sub>140</sub>

La reacción de PCR para construir este banco se realizó con los primers: Fw\_DDS (5'-CTA GMT KMT RST GTT TCA AAA GAT TTG AAT TC-3') y Rv\_DDS (5'-AAC ASY AKM AKC TAG TTT TTC TAC AGA TGG AG-3').

### 5.1.3 Librería <sup>141</sup>VSK<sub>143</sub>

La reacción de PCR para construir este banco se realizó con los primers: Fw\_VSK (5'- GT GYT KHA RMA GAT TTG AAT TCA AAA ACA ACC G-3') y Rv\_VSK (5'-C TKY TDM ARC ACT ATC ATC TAG TTT TTC TAC AGA TGG-3').

### 5.1.4 Librería <sup>144</sup>DLN<sub>146</sub>

La reacción de PCR para construir este banco se realizó con los primers: Fw\_DLN (5'- GMT KYG RMT TCA AAA ACA ACC GTT GTC AC-3') y Rv\_DLN (5'- GA AKY CRM AKC TTT TGA AAC ACT ATC AT CTAG-3').

Las librerías fueron transformadas en células de *E. coli* BL21 (DE3) por electroporación y fueron sometidas inmediatamente al método de screening.

## 5.2 Screening de las mutantes de LevS en la región N-terminal afectadas en la síntesis de levanas de alto peso molecular

El screening de las mutantes afectadas en la síntesis de levanas de alto peso molecular se realizó en medio LB sólido (10 g/L de bacto triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de cloruro de sodio) en presencia de sacarosa (5% p/v) y ampicilina (200 µg/mL), en cajas Petri de 22.5 x 22.5 cm. El medio fue enriquecido con IPTG (1.5 mM) para permitir la expresión de LevS y sus variantes y poder observar el fenotipo. Se incubaron durante 72 horas a 30°C. Las clonas de interés fueron resembradas en medio LB sólido para su análisis posterior.

## 5.3 Ligación SLiCE

### 5.3.1 Preparación del extracto SLiCE a partir de la cepa *E. coli* DH5α

Se preparó un preinóculo de 5 mL de *E. coli* DH5α en medio LB en un tubo de ensaye, fue incubado a 37°C durante 12 horas. Se transfirió 1 mL del preinóculo a 50 mL de medio YT2x en un matraz de 250 mL y fue incubado a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. de 3.0 (fase exponencial tardía; ~3.5 horas). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 10,000rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con 50 mL de agua fría esterilizada (10,000rpm a 4°C). La pastilla celular fue resuspendida y lisada en 1.2 mL de una solución compuesta por Triton X-

100 al 3% (p/v) y Tris-HCl pH 8.0 a 50 mM. Las lisis fueron incubadas durante 10 minutos a 25°C con agitación moderada (250 rpm). Los lisados fueron separados en la fracción soluble e insoluble por centrifugación (12,000rpm a 4°C). Los siguientes pasos fueron realizados manteniendo la cadena de frío en hielo. El extracto de *E. coli* DH5α (sobrenadante) fue transferido a tubos de 1.5 mL (3 mg/mL) y se adicionó un volumen igual de glicerol frío (~4°C) al 80% (p/v), fueron mezclados y congelados en un baño refrigerante compuesto por acetona y hielo seco. Los extractos SLiCE fueron almacenados a -80°C.

### 5.3.2 Preparación del SLiCE buffer (10X)

Se preparó una solución de volumen final de 200 µL con la siguiente composición: Tris-HCl a pH 7.5 (500 mM), MgCl<sub>2</sub> (100 mM), ATP (10 mM) y ditiotreititol (10 mM). El SLiCE buffer esterilizado con un filtro con corte de 0.22 µm y se almaceno como alícuotas con un volumen de 40 µL a -20°C.

### 5.3.3 Reacción de ligación SLiCE para los bancos de mutantes

Los productos de PCR provenientes de la construcción de cada uno de los bancos se sometían a la reacción de ligación SLiCE a un volumen final de 10 µL con las siguientes condiciones: Amplicones provenientes de cada banco (~2 µg), buffer SLiCE 1X, extracto SLiCE (1 µL), durante una hora, 37°C y sin agitación, posteriormente el producto de ligación se purificó con una extracción con cloroformo.

## 5.4 Cultivos de las clonas candidatas

Se preparó un precultivo de 5 mL de cada una de las clonas candidatas en medio LB y 200 µg/mL de ampicilina en tubos de ensaye, fue incubado a 37°C y 200 rpm durante 12 horas. Se transfirió 1 mL del preinóculo a 50 mL de medio LB y 200 µg/mL de ampicilina en un matraz de 250 mL, fue incubado a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. de entre 0.5 y 0.6 (~2 horas). Alcanzada esta D.O. se adiciono IPTG 1.5 mM (concentración final) y se incubaron a 18°C y 120 rpm durante 16 horas. Las células fueron cosechadas a 10,000 rpm y 4°C durante 10 minutos, la pastilla celular fue lavada con buffer de acetatos pH 6, 1 mM CaCl<sub>2</sub> y centrifugadas a 10,000 rpm y 4°C durante 10 minutos. La pastilla celular obtenida fue resuspendida en 10 mL de buffer de acetatos y se llevó a cabo la preparación de los extractos de acuerdo al protocolo de la sección 5.5.2.

## 5.5 Purificación de LevS ΔN85C

### 5.5.1 Amortiguadores

La lisis de los paquetes celulares (pellets) se llevó a cabo con buffer salino de fosfatos (PBS), que presenta la siguiente composición (g/L de agua tetradestilada): NaCl (80.6 g), KCl (2.2 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (11.5 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g). El pH final fue ajustado a 7.4.

La purificación se realizó con dos buffers, uno de ellos denominado “Binding Buffer” (amortiguador de unión) que presenta la siguiente composición (g/L de agua tetradestilada): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.92 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.88g), NaCl (29.22 g), imidazol (0.3404 g). El pH final fue ajustado a 7.4. El segundo buffer,

“Elution Buffer” (amortiguador de elución) presenta la siguiente composición (g/L de agua tetradestilada):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.92 g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1.8 8g),  $\text{NaCl}$  (29.22 g), imidazol (34.04 g). El pH final fue ajustado a 7.4.

### 5.5.2 Preparación de los extractos

Paquetes celulares provenientes de 1L de cultivo bacteriano realizado en matraces fernbach, se resuspendieron en 15 mL de amortiguador PBS pH 7.4, a 4°C. Estos paquetes celulares se sometieron a dos pasos de lisis, el primero consistió en 3 ciclos de congelación/descongelación en un sistema acetona: $\text{CO}_2$  (hielo seco) para la congelación, y agua a 4°C para el descongelamiento. Posteriormente, el extracto se expuso a sonicación en un volumen final de 15 mL, en un ultrasonicador Thermo Scientific, con las siguientes indicaciones:

Pulse ON: 10 segundos; Pulse OFF: 30 segundos; Amplitud: 70%; Time: 1 minuto.

La ultrasonicación se realizó por periodos de diez segundos activos con un descanso de treinta segundos, resultando en un tiempo total un minuto activo. La muestra fue colocada en hielo mientras se sometía a ultrasonicación para evitar la transferencia de calor generada por el equipo a la muestra. El extracto resultante se centrifugó durante 40 minutos a 4°C y 10,000 rpm, para separar la fracción soluble de los restos celulares. Obtenidas las dos fracciones, se centrifugó la fracción soluble durante 10 minutos, a 4°C y 10,000 rpm, esto para evitar la presencia de partículas

suspendidas, que pudieran causar estragos en la columna y durante la purificación.

### 5.5.3 Cromatografía IMAC de LevS $\Delta$ N85C

El extracto obtenido se aforó con amortiguador PBS a 20 mL. La muestra obtenida se circuló a través de una columna (Ge HealthCare) de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC), la cual fue funcionalizada circulando a través de ella cinco volúmenes de una solución de  $\text{NiSO}_4$  con ayuda de una bomba peristáltica, permitiendo así la coordinación del ion  $\text{Ni}^{2+}$ . Posteriormente, con la asistencia de un FPLC (Ge HealthCare) con detector UV a 280nm, adaptado a los amortiguadores de unión y de elución, se equilibró la columna. El extracto fue cargado a la columna, se eluyeron las proteínas que no presentaron afinidad y se inició un gradiente continuo con el buffer de elución de 0 a 500 mM, para las pruebas de purificación exploratorias, de las cuales se obtuvo como resultado la elución de la enzima de interés a la concentración de 200 mM de imidazol.

Las muestras fueron dializadas en una membrana con corte de 50kDa a 4°C durante 12 horas, con cambios recurrentes del sistema (amortiguador de fosfatos 50 mM), esto para remover el imidazol de la muestra y trasladar a la enzima al buffer de trabajo. Posteriormente, la fracción soluble dializada, se filtró con asistencia de centrifugación a 4°C y 6,000 rpm, utilizando membranas de celulosa (Amicon Ultra-15) con corte de 30 kDa. Esto generó dos muestras, el concentrado (influyente) y el efluente, los cuales fueron analizados para la detección de actividad enzimática y concentración de proteína total.

## 5.6 Ensayos de purificación de LevS WT

### 5.6.1 Soluciones

La lisis de los paquetes celulares se llevó a cabo con buffer salino de fosfatos (para los ensayos de purificación en cromatografía IMAC), que presenta la siguiente composición (g/L de agua tetradestilada): NaCl (80.6 g), KCl (2.2 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (11.5 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g). El pH final fue ajustado a 7.4. Mientras que, para los ensayos de purificación por cromatografía de intercambio iónico, la lisis de los paquetes celulares se llevó a cabo en una solución de fosfatos que está compuesta por 52.2 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. El pH final fue ajustado a 6.

### 5.6.2 Preparación de los extractos

Los extractos crudos se sometieron al proceso lisado que consta de tres pasos abordado en la sección 5.5.2, con la diferencia que para los paquetes celulares que contienen la enzima LevS *WT* fueron resuspendidos en 15 mL de una solución de fosfatos 10 mM preparada por dilución de la solución madre de fosfatos.

### 5.6.3 Cromatografía IMAC de LevS WT

Este procedimiento fue realizado de la misma manera como se detalla en la sección 5.5.3.

#### 5.6.4 Cromatografía de intercambio iónico de LevS WT

El extracto crudo obtenido fue aforado a 35 mL con la solución de fosfatos 10 mM, la muestra fue cargada y recirculada a través de una columna empacada con una resina de dietilaminoetil-celulosa (DEAE<sup>+</sup>) de intercambio aniónico débil, la cual fue previamente empacada y tratada con la solución de fosfatos 10 mM. La columna fue equilibrada con la asistencia de un equipo FPLC (Ge HealthCare) con detector UV a 280nm, adaptado a las soluciones de fosfatos de 10 mM y 1 M. El extracto fue cargado a la columna, se eluyeron las proteínas que no presentaron afinidad en el flow-through y se inició un gradiente escalonado con la solución 1 M de fosfatos, partiendo de 0 a 20%, después un aumento a 25%, otro a 30%, y para finalizar un último aumento hasta alcanzar el 100% v/v (10 mM a 200, 250, 300 y 100 mM respectivamente), esto con base a un protocolo desarrollado que se aborda en la sección 8.1 Las muestras fueron filtradas en el momento exacto de su obtención con centrifugación a 4°C y 6,000 rpm, utilizando membranas de celulosa (Amicon Ultra-15) con corte de 30 kDa utilizando buffer de acetatos pH 6 que contiene 136 g/L de acetato de sodio trihidratado y 2 mL de ácido acético glacial. Esto último, funcionó como un cambio de buffer *in situ*.

#### 5.7 Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó a través del poder reductor liberado al incubar las enzimas con 100 g/L de sacarosa en amortiguador de acetatos 50 mM (pH 6) y 1 mM de CaCl<sub>2</sub> a 30°, usando el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Una unidad de actividad enzimática “levansacarasa” se

define como la cantidad de enzima requerida para producir 1  $\mu\text{mol}$  de azúcares reductores equivalentes (glucosa y fructosa) por minuto. Por tanto, corresponde a la actividad global (hidrólisis y transferencia).

## 5.8 Determinación de la concentración de proteína

Se cuantificó la concentración de enzima purificada presente en las alícuotas purificadas de cada una de las levansacarosas a partir del método espectrofotométrico de Bradford [1976].

## 5.9 Determinación de los parámetros cinéticos de LevS $\Delta\text{N85C}$

Los parámetros cinéticos de la versión truncada LevS  $\Delta\text{N85C}$  fueron obtenidos a partir de la reacción enzimática global, es decir considerando las dos reacciones que se encuentran en competencia en el seno de la reacción: la transferencia y la hidrólisis. Se realizaron los ensayos utilizando amortiguador de acetatos 50 mM pH 6, 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  y la levansacarasa LevS  $\Delta\text{N85C}$  purificada en un volumen de reacción de 0.6 mL, variando la concentración de sacarosa, desde 600 hasta 10 mM. La velocidad inicial de reacción fue determinada midiendo la liberación de azúcares reductores a lo largo del tiempo de reacción empleando el ensayo colorimétrico que involucra el uso de ácido 3,5- dinitrosalicílico.

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

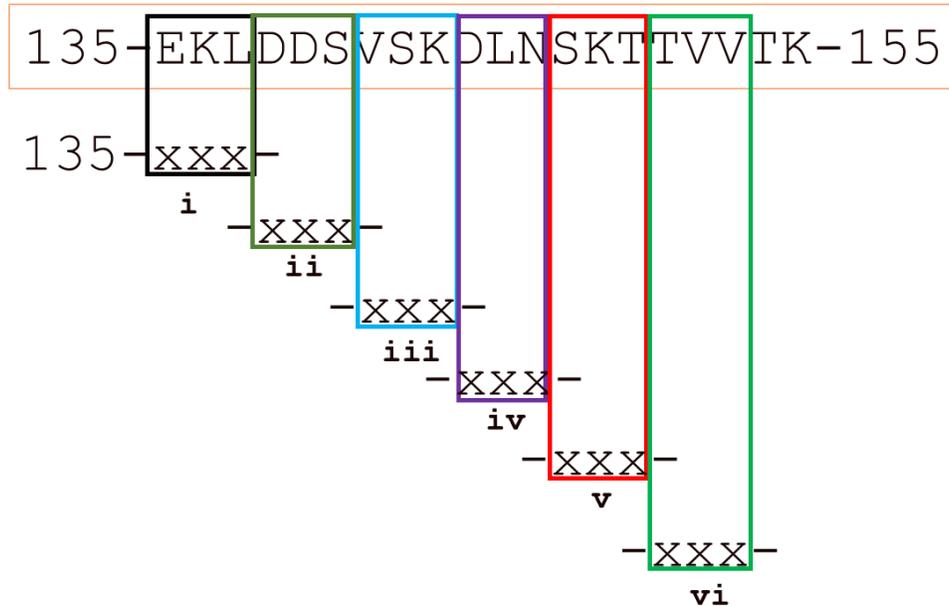
### 6.1 Diseño y construcción de los bancos de mutantes en la zona de veinte residuos del N-terminal de LevS

Los estudios realizados empleando las versiones truncadas en la región N-terminal de LevS y sin la región C-terminal permitieron apreciar que existen 20 residuos involucrados en la síntesis de HM<sub>W</sub>L en la región N-terminal. Con esto en mente, se propone el estudio de esta región a través de mutagénesis combinatoria, utilizando la metodología que denominamos “*mutagénesis combinatoria basada en alanina*” que está fundamentada en el tradicional scanning de alanina, técnica que a través de sustituciones de los residuos de interés por alanina, elimina todos los átomos más allá de la cadena lateral del carbono  $\beta$ , de esta manera, el papel de los grupos funcionales puede ser inferido de acuerdo a la posición en la que se encuentran [Morrison & Weiss, 2001].

Específicamente, para desarrollar esta metodología, se seleccionaron tres posiciones continuas en la secuencia de aminoácidos, para construir seis bancos, y los codones de los residuos seleccionados fueron modificados de tal manera que existe acceso a alanina y al residuo silvestre (Figura 15). Sin embargo, debido a la degeneración y estructura del código genético, existe la posibilidad de acceder a combinatorias que involucran otros residuos.

En la tabla III, se ejemplifica el diseño del banco de mutantes para los primeros tres residuos, el banco  ${}_{136}\text{EKL}_{138}$  que, a partir de los codones silvestres, se diseñaron primers que permitieron acceder al residuo alanina y al residuo silvestre, como es el caso del residuo E136.

Sin embargo, debido a la degeneración del código genético, los otros residuos como K137 y L138 proveen acceso a otros residuos además del silvestre y alanina. Esto permite condensar el scanning de alanina, así como la mutagénesis combinatoria.



**Figura 15. Representación de los veinte residuos de la región N- terminal de LevS objetos de estudio.** La ilustración muestra la agrupación en bancos de triples mutantes continuas, con la cobertura de los 20 residuos de la región N-terminal de LevS, lo que tiene como consecuencia el diseño de siete bancos de mutantes.

**Tabla III. Representación del método “Mutagénesis Combinatoria Basado en Alanina”.** Ejemplificación de la mutagénesis combinatoria aplicada al banco de mutantes  ${}_{136}EKL_{138}$ , se muestra el codón silvestre, codón de alanina y los aminoácidos a lo que se tiene acceso al degenerar el codón (M= A/C, R=G/A, S=G/C e Y=T/C).

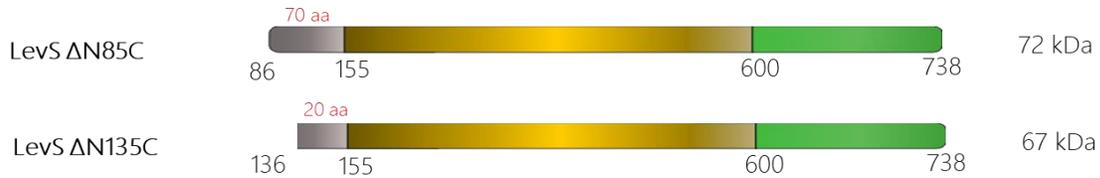
Residuo silvestre	Codón silvestre /codón modificado	Residuos sustitutos
E	GAA/ GMA	Ala, Glu.
K	AAA/ RMA	Ala, Glu, Lys, Thr.
L	CTA/ SYA	Ala, Leu, Pro, Val.

En paralelo, esta técnica permite generar bancos de mutantes manejables con una diversidad controlada, es decir, es necesario analizar al menos 200 clonas (tamaño de librería) para obtener una cobertura del 95% del banco de mutantes  ${}_{136}\text{EKL}_{138}$ , que se refiere al número de clonas analizadas para cubrir todas las posibles variantes de aminoácidos generadas. Este primer banco tiene tres codones variables con la posibilidad de 32 versiones distintas de la proteína (Tabla III) a nivel secuencia (2x4x4).

**Tabla IV. Bancos de mutantes de los 20 residuos de la región N-terminal de LevS.** Se muestran los residuos a mutagenizar, el tamaño de la librería ideal para alcanzar una cobertura del 95% y el número de combinaciones de residuos que se esperan al degenerar los codones correspondientes.

BANCO	RESIDUOS	TAMAÑO DE LIBRERÍA	NO. DE COMBINACIONES
1	${}_{136}\text{EKL}_{138}$	200	32
2	${}_{139}\text{DDS}_{141}$	200	32
3	${}_{142}\text{VSK}_{144}$	200	48
4	${}_{145}\text{DLN}_{147}$	200	32
5	${}_{148}\text{SKT}_{150}$	300	48
6	${}_{151}\text{TVV}_{153}$	200	24
7	${}_{154}\text{TK}_{155}$	100	16

La construcción de siete bancos de mutantes (Tabla IV) que, sumado al método de screening de mutantes afectadas en la capacidad de sintetizar HM<sub>w</sub>L, ayudaría a identificar a los residuos clave en la zona de veinte residuos de la región N-terminal de LevS involucrados en la síntesis de HM<sub>w</sub>L.



**Figura 16. Representación esquemática de LevS ΔN85C y de LevS ΔN135C.** LevS ΔN135C se caracteriza por tener únicamente 20 residuos de la región N-terminal, que resultan claves para la síntesis de levanas de alto peso molecular, a diferencia de LevS ΔN85C, que posee 70 residuos de esta región.

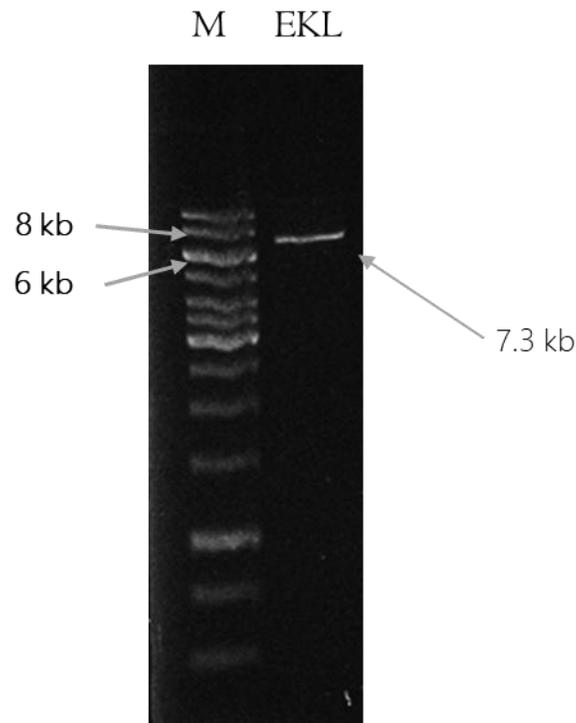
Sin embargo, esta metodología se desarrolló utilizando a LevS ΔN85C (70 residuos de la región N-terminal), ya que LevS ΔN135C (veinte residuos de la región N-terminal) (Figura 16) no puede ser sobreexpresada, y por consecuencia, se obtiene poca enzima para realizar los ensayos pertinentes en este trabajo.

## 6.2 Construcción del banco 136EKL138

Con el objetivo de mutagenizar los tres primeros residuos dentro de los veinte que componen la zona de estudio de la región N-terminal de LevS, se construyó el banco  $_{136}\text{EKL}_{138}$ , para lo cual se diseñaron oligonucleótidos degenerando el codón silvestre de cada residuo (Tabla III) con el codón preferencial de alanina (GCA), para *E. coli*, cepa huésped que expresará las mutantes, dando acceso a 32 variantes de LevS en términos de aminoácidos. La librería de mutantes  $_{136}\text{EKL}_{138}$  fue construida con la metodología de mutagénesis *quick-change*.

Este banco fue exitosamente amplificado, ya que, como se observa en la Figura 17, se obtiene una única banda en el peso esperado (7.3 kb) para la

amplificación de la construcción entera (pLS $\Delta$ N85C) con los codones degenerados.



**Figura 17. Electroforesis de ácidos nucleicos del producto de PCR para el banco de mutantes 136EKL138.** El carril M contiene el marcador de peso molecular, el carril EKL muestra el producto de PCR en el peso esperado.

Construida la librería, se eliminó el DNA parental con una digestión del DNA metilado con la nucleasa *DpnI*, para evitar que el DNA parental interfiera en el número efectivo del tamaño de librería, sesgando el resultado. Se utilizaron 1000 ng totales de los amplicones provenientes de la PCR para transformar células de *E. coli* BL21 DE3, se sometieron al cribado de mutantes afectadas en la síntesis de HM<sub>w</sub>L y se obtuvo una librería

conformada por 89 clonas, sin embargo, no se obtuvieron clonas con el fenotipo típico de *E. coli* y la cobertura del banco de mutantes con este tamaño de librería es del 15%. La baja eficiencia de clonación puede ser un cuello de botella para el desarrollo de las librerías de bancos de mutantes, por lo tanto, decidimos buscar estrategias para mejorar la eficiencia de ligación.

Con el objetivo de mejorar la eficiencia de ligación, para poder tener un tamaño de librería más grande y, por tanto, una cobertura más amplia de este banco de mutantes, se implementó un paso extra, antes de transformar a las células de *E. coli* BL21 DE3, la técnica de ligación denominada SLiCE ligation por sus siglas del inglés **S**eamless **L**igation **C**loning **E**xtract. Esta técnica de ligación es capaz de ensamblar fragmentos de DNA en un vector o ligar fragmentos homólogos, utilizando la actividad de recombinación homóloga de lisados de células de *E. coli* [Okegawa & Motohashi, 2015]. Se ha demostrado que los lisados de cepas provenientes de *E. coli* con mutaciones en el gen *recA*, incrementan la estabilidad de los insertos y son capaces de ligar fragmentos de DNA de manera eficiente, como la cepa DH5 $\alpha$  [Okegawa et al., 2015].

Con esta información, se preparó tanto el extracto de SLiCE de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , así como el SLiCE buffer para llevar a cabo la reacción de ligación (materiales y métodos). Al protocolo de construcción de este banco se adicionó la reacción de ligación SLiCE, con lo que se mejoró notablemente la eficiencia de transformación, pasando de una cobertura del 15% a una cobertura de la librería de un 90% (Tabla V).

**Tabla V. Cambios en el tamaño de la librería 136EKL138 antes y después de implementar la ligación SLiCE.**

Ligación SLiCE	Tamaño de la Librería	Cobertura
No	89	15%
Si	182	90%

Con esta nueva técnica incorporada, se marca el protocolo de trabajo desde el diseño de los bancos de mutantes, hasta su construcción y obtención, alcanzando porcentajes de cobertura cercanos al ideal.

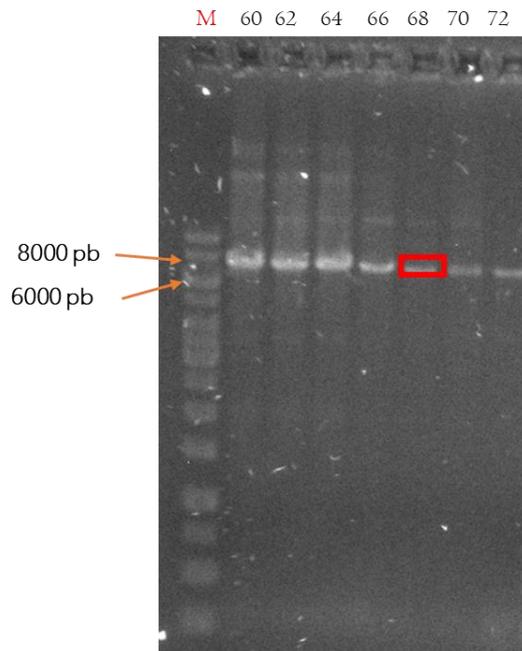
### 6.3 Construcción del banco 139DDS141

El segundo banco diseñado corresponde al par de aspárticos en las posiciones 139 y 140, y a la serina en la posición 141. Este banco fue diseñado bajo el mismo raciocinio que el banco  ${}_{136}\text{EKL}_{138}$ , generando acceso a diversos residuos además de alanina y el silvestre (Tabla VI).

**Tabla VI. Representación de los residuos y los codones que fueron degenerados para la construcción del banco 139DDS141.** *Mutagénesis combinatoria aplicada al banco de mutantes  ${}_{139}\text{DDS}_{141}$ , se muestra el codón silvestre, codón de alanina y los aminoácidos a lo que se tiene acceso al degenerar el codón ( $K=G/T$ ,  $M=A/C$ ,  $R=G/A$  y  $S=G/C$ ).*

Aminoácido silvestre	Codón silvestre /codón modificado	Aminoácidos sustitutos
D	GAT/ GMT	A, D.
D	GAT/ KMT	A, D, S Y.
S	AGT/ RST	A, S, G, T.

La degeneración de estos tres codones da acceso a una combinatoria de 32 variantes de LevS en términos de la secuencia de aminoácidos, ya que ofrece acceso en la primera posición a los residuos silvestre y alanina, y en las dos posiciones restantes a dos residuos adicionales (Tabla VI), generando la combinatoria  $2 \times 4 \times 4 = 32$ . Este banco alcanzará más de un 90% de cobertura si se construye una librería de 200 clonas. Dado que los dos residuos iniciales son idénticos (D138 y D139), y que, además, a nivel de secuencia de DNA los codones que los codifican son iguales, se decidió expandir la degeneración en el codón del residuo D139 para generar diversidad similar a la del banco anterior, esto dió como resultado la obtención de 32 variantes en términos de aminoácidos de LevS, en lugar de 16 si se hubieran utilizado los codones degenerados GMT-GMT-RST.



**Figura 18. Electroforesis de ácidos nucleicos del producto de PCR para el banco de mutantes 139DDS141.** El carril M contiene el marcador de peso molecular, mientras que los carriles 60 al 72 corresponden a cada una de las temperaturas de alineamiento ensayadas para la construcción de este banco.

Diseñados los oligonucleótidos, se llevó a cabo la amplificación del banco con un barrido en las condiciones térmicas para la temperatura de alineamiento, desde 60°C hasta los 72°C. Los resultados muestran que el banco es amplificado en cualquiera de las temperaturas analizadas, aunque es en 68°C donde se muestran menos especificidades (Figura 18), por lo tanto, esta es la condición que se utilizará para la construcción de este banco en particular.

Posteriormente, se realizó la digestión con DpnI para eliminar el DNA parental y la ligación SLiCE. La transformación del banco de mutantes se llevó a cabo utilizando 1000 ng de DNA. Después de 72 horas de incubación a 30°C se realizó el conteo de clonas. El tamaño de librería alcanzado para este banco fue de 146 clonas, esto ofrece una cobertura del 73%.

#### 6.4 Construcción del banco 142VSK144

El tercer banco diseñado comprende los residuos valina 142, serina 143 y lisina 144. Este banco fue diseñado bajo el mismo raciocinio dando acceso a los residuos que se muestran en la Tabla. Sin embargo, este banco genera acceso a un codón de paro en el residuo S142.

**Tabla VII. Representación de los residuos y los codones que fueron degenerados para la construcción del banco 142VSK144.** *Mutagénesis combinatoria aplicada al banco de mutantes  $_{142}VSK_{144}$ , se muestra el codón silvestre, codón de alanina y los aminoácidos a lo que se tiene acceso al degenerar el codón (K=G/T, M= A/C, R=G/A y H=A/C/T).*

Aminoácido silvestre	Codón silvestre /codón modificado	Aminoácidos sustitutos
V	GTT/ GYT	A, V.
S	TCA/ KHA	A, E, L, S,V, stop.
K	AAA/RMA	A, E, K, T.

Este banco fue amplificado exitosamente como en el caso de los anteriores, posterior al tratamiento de digestión del DNA parental y la ligación pertinente, se transformó en células de *E. coli* BL21 DE3, obteniendo una librería de 132 clonas, lo que equivale a tener una cobertura del banco del 93%.

## 6.5 Construcción del banco 145DLN147

El cuarto banco diseñado y construido comprende a los residuos 144D, 145L y 146N, que fueron degenerados como se muestra en la Tabla. El banco se logró construir sin ninguna problemática y al transformarlo se obtuvieron 178 clonas, que permite una cobertura del 99%.

**Tabla VIII. Representación de los residuos y los codones que fueron degenerados para la construcción del banco 145DLN147.** *Mutagénesis combinatoria aplicada al banco de mutantes  $_{145}DLN_{147}$ , se muestra el codón silvestre, codón de alanina y los aminoácidos a lo que se tiene acceso al degenerar el codón (K=G/T, M= A/C, R=G/A e Y=T/C).*

<b>Aminoácido silvestre</b>	<b>Codón silvestre /codón modificado</b>	<b>Aminoácidos sustitutos</b>
D	GAT/ GMT	A, D.
L	TTG/ KYG	A, L, S,V.
N	AAT/RMT	A, D, N, T.

La construcción de estos cuatro bancos de triples mutantes representa una cobertura del 60% de los 20 residuos que componen la región N-terminal en la que hipotetizamos se encuentran los residuos clave en la síntesis de HM<sub>w</sub>L.

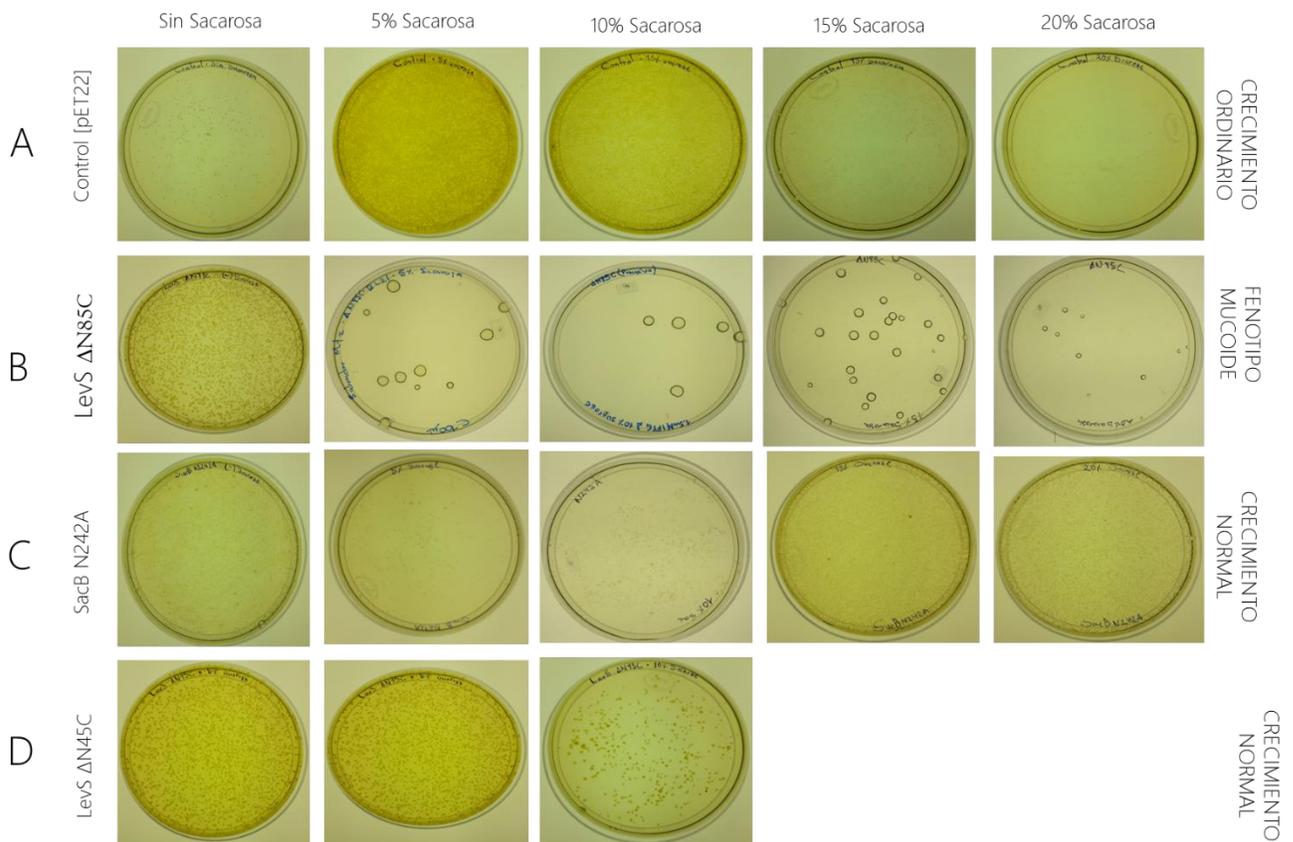
## 7 IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE SCREENING DE MUTANTES AFECTADAS EN LA SÍNTESIS DE LEVANAS DE ALTO PESO MOLECULAR.

La literatura alberga reportes que destacan la letalidad que reside en la expresión heteróloga del gen *sacB* de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, que codifica para la levansacarasa SacB en microorganismos gram negativos, en presencia de 10% de sacarosa [Bramucci & Nagarajon, 1996; Gao, Yao, Hart and An, 2017]. Este fenómeno se debe a que cuando la levansacarasa SacB de *B. subtilis* es producida de forma heteróloga, en organismos gram-negativos en presencia de sacarosa, la síntesis de HM<sub>w</sub>L, llevada a cabo por esta enzima genera en la célula microbiana una disrupción de sus funciones, por lo tanto, se inhibe el crecimiento [Gay et al., 1985]. Estos reportes, nos permitieron proponer y desarrollar un método de selección positiva en células de *E. coli*, que expresen mutantes que no sintetizan HM<sub>w</sub>L de LevS en presencia de su sustrato, bajo la premisa de que las células que expresen los genes que codifiquen para enzimas de LevS, capaces de sintetizar HM<sub>w</sub>L, no podrán crecer en presencia de sacarosa al 10%; mientras que, se espera que las células hospederas de las mutantes incapaces de producir HM<sub>w</sub>L, que son aquellas incapaces de sintetizar levana de alto peso molecular (mutantes de interés central), crezcan de manera normal en 10% de sacarosa.

Para estandarizar el método de selección se desarrolló un ensayo utilizando células de *E. coli* BL21-DE3 expresando, en presencia de sacarosa, dos levansacarasas con distintos perfiles de producto, una capaz de producir

HM<sub>w</sub>L y una productora únicamente de FOS. Para esta implementación se utilizaron: (i) células expresando la enzima LevS  $\Delta$ N85C, que destina un

68% de sacarosa consumida a la síntesis de HM<sub>w</sub>L, además de ser la enzima modelo de estudio en este trabajo y (ii) células de *E. coli* expresando la levansacarasa mutante unidominio SacB N242A, que se caracteriza por sintetizar FOS de hasta un DP 4, efecto de la mutación puntual. Adicionalmente, se decidió analizar células de *E. coli* expresando la levansacarasa LevS ΔN45C, que tiene la capacidad de sintetizar ambos: HM<sub>w</sub>L y FOS en proporciones similares (36%/ 38% de la sacarosa consumida).



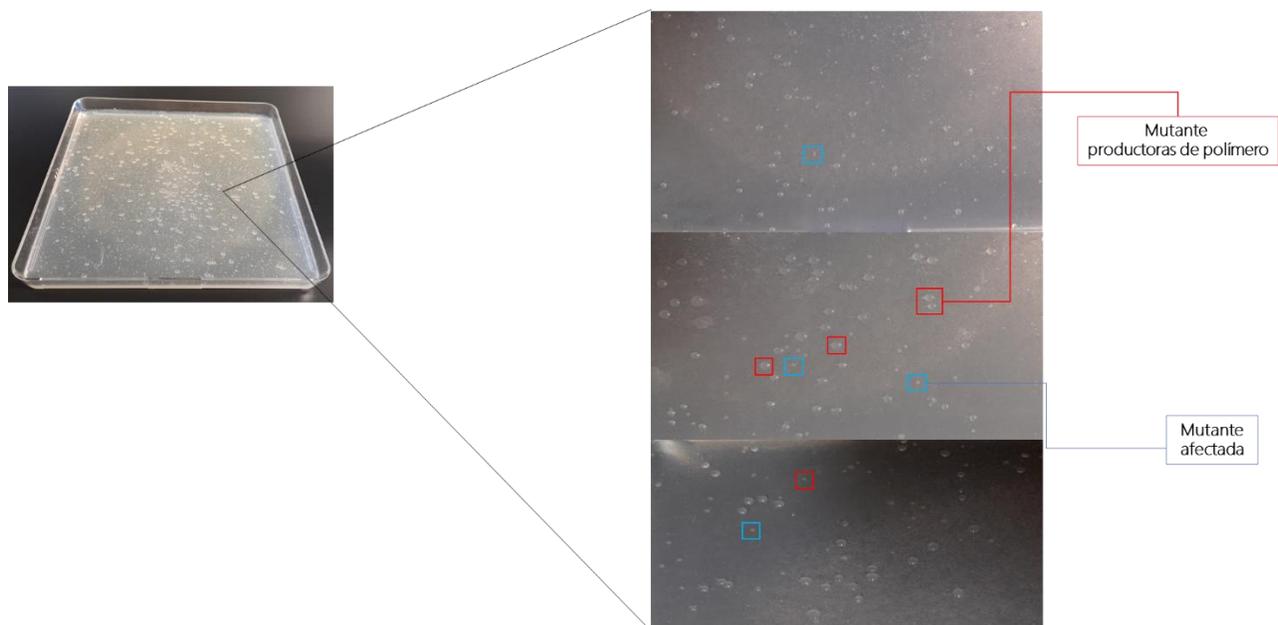
**Figura 19. Células de *E. coli* BL21 DE3 sembradas en medio de selección.** En la sección A se muestran las placas utilizando como control el vector de expresión vacío (pET22), en la sección B se muestran las placas de LevS ΔN85C, en la sección C se muestran las placas de SacB N242A y en la sección D se muestran las placas de LevS ΔN45C.

El método fue desarrollado utilizando los plásmidos que contienen los genes que codifican para las versiones truncadas anteriormente descritas de la levansacarasa LevS: LevS  $\Delta$ N85C, LevS  $\Delta$ N45C y la levansacarasa unidominio SacB N242A como controles negativo, intermedio y positivo respectivamente. Los plásmidos fueron transformados en células de *Escherichia coli* BL21 (DE3), posteriormente fueron sembrados en placas con medio LB sólido en presencia de sacarosa al 5, 10, 15 y 20% (p/v) y 1.5 mM del inductor isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) e incubados aproximadamente 48 horas a 30°C. La aparición de fenotipos en las placas pudo ser apreciado dentro de las primeras 24 horas después de la incubación, a las 48 horas el fenotipo es totalmente distinguible.

Las células de *E. coli* expresando la levansacarasa LevS  $\Delta$ N85C que sintetiza HM<sub>w</sub>L mostraron un fenotipo mucoide que a simple vista luce como una gota traslúcida (Figura 19B) que se trata de levana sintetizada sobre el medio en presencia de sacarosa (como control se cultivaron células de *E. coli* sin sacarosa, las cuales crecen de manera normal (Figura 19A). Asimismo, las células de *E. coli* que expresan la levansacarasa LevS  $\Delta$ N45C que sintetiza tanto FOS como polímero, crecieron de manera ordinaria (Figura 19D). Sin embargo, las células que expresan la levansacarasa SacB N242A que sintetiza únicamente FOS fueron capaces de crecer de manera ordinaria, sin formación de mucosidad en presencia de sacarosa (Figura 19C).

Los resultados anteriores demuestran que no fue posible inducir la letalidad de células de *E. coli* expresando ya sea enzimas productoras de HM<sub>w</sub>L, como productoras de FOS, incluso las que producen ambos tipos de productos. Sin embargo, observamos un fenotipo mucoide que claramente

nos permite diferenciar las células que poseen genes que codifican para levansacarosas capaces de sintetizar HM<sub>w</sub>L, de las que no los producen. Estos resultados a pesar de ser distintos a lo esperado, son totalmente funcionales, ya que se ha logrado obtener dos fenotipos distinguibles entre sí que permiten seleccionar las mutantes de interés (afectadas en la producción de HM<sub>w</sub>L; crecimiento ordinario) de las que necesitan ser cribadas (productoras de HM<sub>w</sub>L; fenotipo mucoso).



**Figura 20. Células de *E. coli* BL21 DE3 transformadas y sembradas en medio de selección con las mutantes productoras y no productoras de HM<sub>w</sub>L (*LevS*  $\Delta$ N85C y *SacB* N242A respectivamente).**

Para evaluar la funcionalidad de este método de screening desarrollado, se realizó un ensayo preliminar que consistió en la transformación de células de *E. coli* BL21 DE3 con los plásmidos que contienen las construcciones

LevS  $\Delta$ N85C y SacB N242A, y se sembraron en conjunto en una placa bajo las mismas condiciones de crecimiento (medio LB, sacarosa 5% w/v; 1.5 mM IPTG, 30°C durante 48 horas). La placa mostró los dos fenotipos previamente descritos, tanto el mucoide como el ordinario con un distanciamiento apropiado que permite la distinción entre las mutantes productoras de HM<sub>w</sub>L de las que son de interés central (Figura 20), lo que permitirá una selección adecuada en nuestro estudio. Con estos resultados consideramos que implementamos un método adecuado para la selección de las mutantes afectadas en la síntesis de HM<sub>w</sub>L y distinguirlas de las enzimas que están afectadas en la síntesis de levana de alto peso molecular.

El ensayo desarrollado para la selección de mutantes de LevS  $\Delta$ N85C afectadas en la síntesis de HM<sub>w</sub>L obedece estrictamente a un método de screening y no de selección, sin embargo, el método es totalmente funcional y permite la selección de las mutantes de interés.

El interés científico por desarrollar e implementar técnicas novedosas y de grano grueso, que nos permitan realizar ingeniería de proteínas enfocada a las levansacarosas, nos condujo a estudiar la posibilidad de refinar el método de screening, migrando hacia un método de selección.

Con el fin de alcanzar la inhibición del crecimiento y obtener únicamente el fenotipo afectado en la producción de HM<sub>w</sub>L, se utilizó de una mayor concentración de sacarosa, para inducir la expresión del fenotipo que corresponde a las levansacarosas productoras HM<sub>w</sub>L, desapareciendo el fenotipo afectado en la síntesis de HM<sub>w</sub>L. Para tal efecto, se estudió el crecimiento de las células de *E. coli* BL21(DE3) expresando a LevS  $\Delta$ N85C a diferentes concentraciones de sacarosa (5, 10, 15 y 20%).

No se observó inhibición del crecimiento, sino que sigue presentándose el fenotipo mucoide a todas las concentraciones de sacarosa analizadas. Sin embargo, a medida que la concentración de sacarosa aumenta, la burbuja de HM<sub>w</sub>L parece disminuir de tamaño, sugiriendo que el aumento de la concentración afecta la construcción de la burbuja de HM<sub>w</sub>L. Esto podría deberse a que la producción de HM<sub>w</sub>L sobre el medio de cultivo sólido a estas concentraciones de sacarosa se vuelve una tarea más complicada para la levansacarasa, o por que el crecimiento de las células que portan a LevS  $\Delta$ N85C se ve afectado, causando una menor producción de HM<sub>w</sub>L.

El aumento en la concentración de sacarosa por encima de 20% p/v no es recomendable, debido a que, al ser un medio hiperosmótico, por la concentración de sacarosa, genera un shock osmótico en las células, lo que conlleva a permeabilizar la membrana externa, y causa la secreción de los contenidos del periplasma, liberando moléculas citoplasmáticas, incluidos iones, metabolitos y ciertas proteínas [Jacobson, Takacs & Rosenbusch, 1976; Schleyer et al., 1993].

Estudios previos de inducción de letalidad por sacarosa en *Escherichia coli* BL21(DE3), utilizaron dos variantes del gen de *sacB* de *Bacillus amyloliquefaciens*: (i) SacB con péptido-señal nativo, que, al ser expresada en presencia de sacarosa, inhibe el crecimiento bacteriano, mientras que (ii) SacB sin péptido-señal (enzima madura), exhibe un fenotipo mucoide (similar al de LevS  $\Delta$ N85C), que se trata de HM<sub>w</sub>L.

Estos resultados sugieren que, la expresión de levansacarasa con péptido-señal en presencia de sacarosa, utilizando como hospederos a organismos gram-negativos resulta letal, con la consecuente inhibición del crecimiento bacteriano; mientras que, si se expresa una levansacarasa madura, se

puede apreciar un fenotipo mucoso [Gao, Yao, Hart and An, 2017]. Este fenómeno indica que es necesario contar con la vía de secreción a espacio periplásmico dependiente de péptido-sígnal, en levansacarosas productoras de HM<sub>w</sub>L, para inducir la inhibición del crecimiento, fenómeno no observado en LevS  $\Delta$ N85C, ya que esta enzima no cuenta con péptido-sígnal.

Las bases bioquímicas de este fenómeno son aún desconocidas, pero se sugiere que, una vez que la levansacarasa ha sido translocada al espacio periplásmico, la síntesis HM<sub>w</sub>L bloquea los procesos de transporte y afecta el periplasma, lo que resulta en la inhibición del crecimiento [Jäger et al., 1992]. Mientras que, si la levansacarasa no posee péptido-sígnal, no puede ser transportada al periplasma, permaneciendo en el citoplasma, con la consecuente síntesis de levanas, que resulta en la acumulación de las mismas, causando lisis celular y liberando las enzimas, manteniéndose estables, con la continua síntesis de levanas [Gao, Yao, Hart and An, 2017].

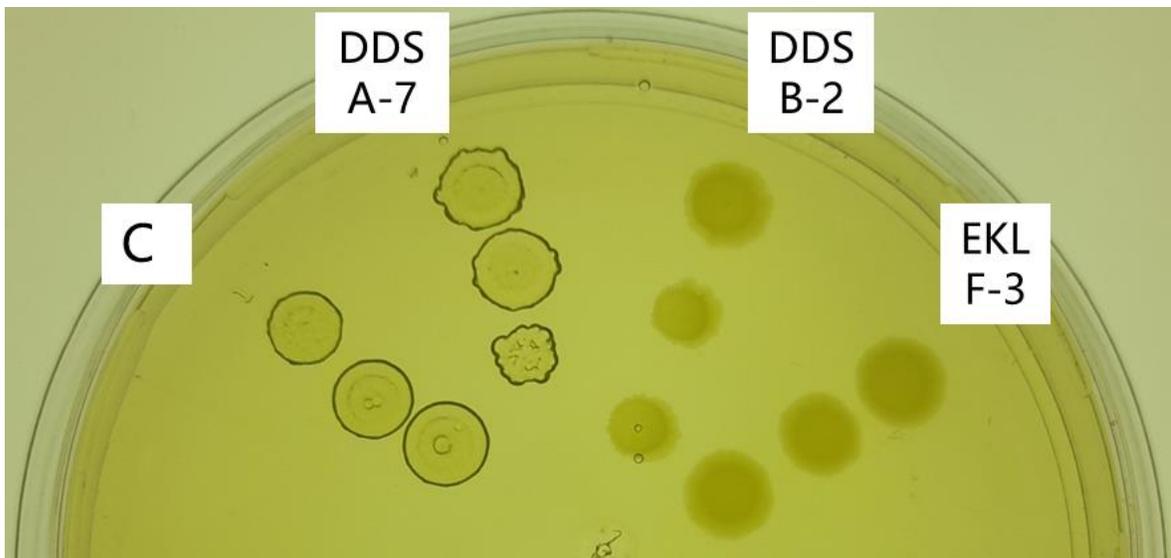


**Figura 21. Fenotipo mucoso con forma de burbuja de LevS  $\Delta$ N85C.** La placa Petri que se muestra a continuación se guardó dos semanas después de ser sembrada e incubada, se puede apreciar el crecimiento de la burbuja de polímero a través del tiempo.



## 8 CRIBADO DE LOS BANCOS DE MUTANTES EN LA REGIÓN N-TERMINAL DE LEVS.

El análisis de los cuatro bancos empleando el método de screening por fenotipo no mucoso nos llevó a la obtención de dos clonas candidatas para el banco <sup>138</sup>DDS<sub>140</sub> y una clona candidata del banco <sup>135</sup>EKL<sub>137</sub>. Cabe resaltar que, dentro del diseño de los siete bancos, se espera que el número de clonas candidatas sea especialmente pequeño, ya que es posible que solo sean unos cuantos residuos los que están implicados en la síntesis de HM<sub>w</sub>L.



**Figura 23.** Células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas y sembradas en medio de selección. El panel C representa el control (*LevS*  $\Delta$ N85C), mientras que los demás paneles muestran el fenotipo de las clonas candidatas de los bancos <sup>135</sup>EKL<sub>137</sub> y <sup>138</sup>DDS<sub>140</sub>

Las clonas candidatas fueron analizadas nuevamente para confirmar el fenotipo no mucoso utilizando ensayos de dropping en placa Petri con medio de selección.

La clona candidata DDS A-7 exhibe un fenotipo mucoide después de su confirmación, por lo que se descartó inmediatamente, mientras que las clonas DDS B-2 y EKL F-3 mostraron el fenotipo esperado (Figura 23).

Confirmado el fenotipo, se corroboró la presencia del gen que porta las mutaciones a través de PCR de colonia a las variantes positivas DDS B-2 y EKL F-3. Las mutantes fueron secuenciadas, EKL F-3 resultó no contener ninguna mutación en la zona de interés, que comprende los residuos E136, K137 y L138, mientras que la mutante DDS B-2 portaba el conjunto de mutaciones  $^{139}\text{DDS}_{141}\rightarrow^{139}\text{ASG}_{141}$ ; sin embargo, algo muy interesante sucedió con las dos mutantes, ambas presentaban una transversión de G→T, 129 pares de bases upstream del primer conjunto de codones que comprenden al banco  $^{136}\text{EKL}_{138}$ . Esta es una mutación puntual sin sentido que cae en el residuo E123, dicha transversión origina el codón de paro TAA, por lo que, en ambas secuencias se presenta el cambio de codón GAA→TAA.

Al ser una mutación que origina un codón de paro en la zona de la región N-terminal de LevS, produce un péptido de apenas 122 residuos que no posee el dominio catalítico, lo que genera falsos positivos con fenotipo no mucoide.

Cuando las mutaciones se concentran en ciertas regiones de los ácidos nucleicos estas son denominadas “hotspots” [Benzer, 1961]. Algunos hotspots dependen de la naturaleza de la secuencia nucleotídica, a los cuales se les denomina “hotspots intrínsecos” [Rogozin, Kondrashov, & Glazko, 2001].

El nucleótido G en el codón GAA del residuo E123 podría ser un sitio en el que la frecuencia de mutación, específicamente la transversión G→T sea

sujeta a aparecer más de lo normal, ya que la observamos en cada una de las mutantes candidatas, por lo que podríamos sugerir que, en la secuencia de LevS, podría tratarse de un hotspot de mutación sin sentido. Hasta la fecha no se ha reportado ningún caso similar en estudios de estructura-función de levansacarosas, donde al realizar campañas de mutagénesis o mutagénesis sitio dirigida, se observe la presencia de hotspots de mutación sin sentido.

Este posible hotspot puede generar problemáticas para la construcción de los bancos de mutantes en los veinte residuos de la región N-terminal de LevS, ya que conlleva a la generación de falsos positivos. Esta problemática se puede abordar desde el punto de vista de la mutagénesis, en el cual, podemos modificar este codón que actúa como hotspot, a través de una transición, de **GAA** a **GAG**. Así, solo se cambiaría un nucleótido sin alterar el aminoácido para el que codifica.

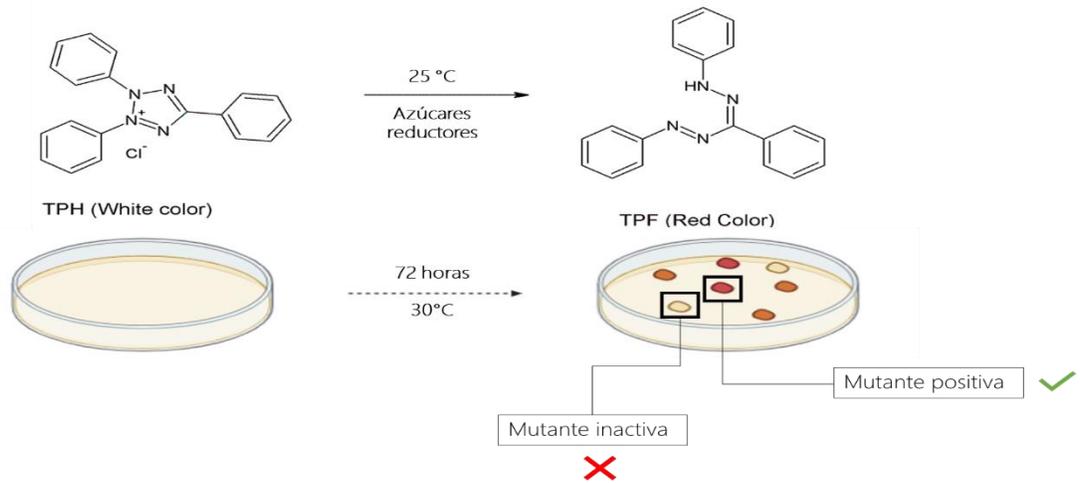
Similar a esta problemática del hotspot de mutación sin sentido, existe otra problemática con la construcción de los bancos <sup>142</sup>VSK<sub>144</sub> y <sup>148</sup>SKT<sub>150</sub>, ya que podrían incluir codones de paro, consecuencia de la combinatoria de codones que se utilizó. Por sí solos, estos bancos tienen acceso a combinatorias muy reducidas. Los codones de los residuos 142V y 143S al ser degenerados por el codón que codifica para Ala, únicamente dan acceso al residuo silvestre y a alanina, reduciendo drásticamente la diversidad de esta biblioteca a 16 variantes en la secuencia de aminoácidos de LevS, mientras que en el banco <sup>148</sup>SKT<sub>150</sub> ocurre un fenómeno similar, ya que los tres codones de los residuos 148S, 149K y 150T al ser degenerados por el codón que codifica para Ala, únicamente dan acceso a alanina y al residuo

silvestre, reduciendo la diversidad a 16 variantes en la secuencia de aminoácidos.

Para abordar esta situación, en el banco  ${}_{142}\text{VSK}_{144}$  se degeneró el codón de 143S (TCA/ KHA; donde K=G/T y H=A, C o T), mientras que para el banco  ${}_{148}\text{SKT}_{150}$  se degeneró también el codón de serina (148S) de manera idéntica a 143S. Esto permitirá expandir la diversidad de las dos bibliotecas a un total de 48 variantes en secuencia de aminoácidos, sin embargo, ocho de estas presentan codones de paro.

Por consecuencia, la introducción de codones de paro en la secuencia blanco generará proteínas truncadas sin actividad enzimática, que no sintetizarán levana de alto peso molecular, y, por tanto, escaparán del cribado como falsos positivos, al igual que las variantes de LevS que presenten el codón TAA en el posible hotspot.

Para esto, se propone el desarrollo un método basado en colorimetría, utilizando cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (2,3,5-TTC), en presencia de azúcares reductores (tales como la fructosa y glucosa) ya que a temperatura ambiente pasa de ser una sustancia incolora o levemente amarilla (en dependencia de su concentración) a color rojo, al ser reducida a su sal trifenilformazan (Figura 24).



**Figura 24. Reacción del 2,3,5-TTC en presencia de azúcares reductores.**

Este ensayo permitiría eliminar los falsos positivos, sin embargo, si la G en el codón GAA del residuo E123 es realmente un hotspot, tendría que ser mutagenizado.

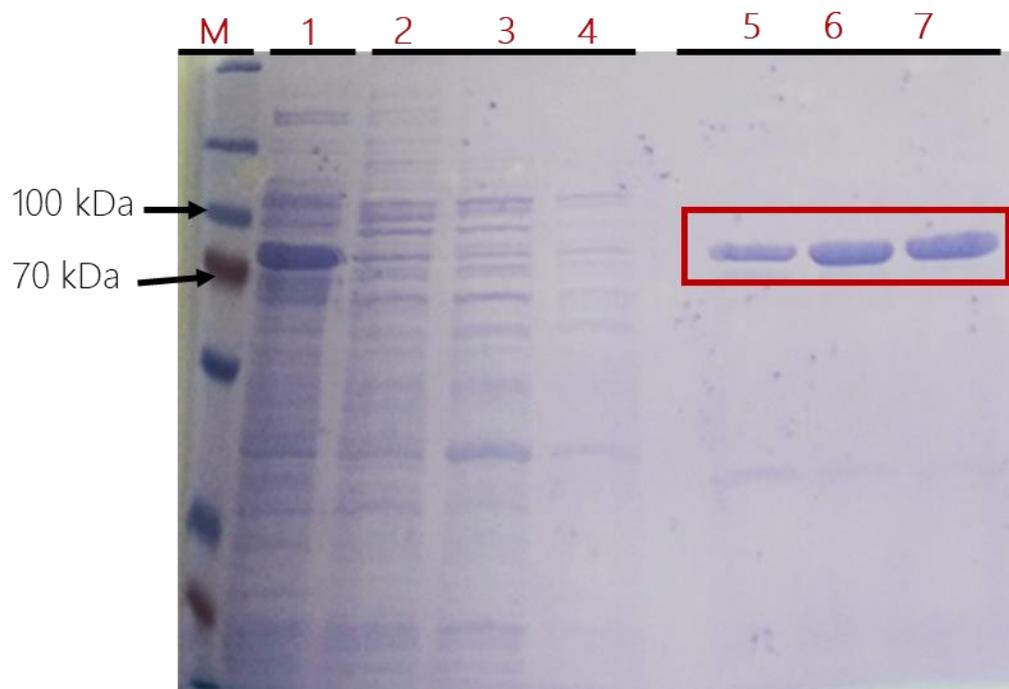
## 9 ANÁLISIS DE LA ENZIMA SILVESTRE Y LAS MUTANTES DE LA REGIÓN N-TERMINAL DE LEVS

### 9.1 Purificación de LevS $\Delta$ N85C

Analizar y comparar tanto a LevS  $\Delta$ N85C como las variantes de esta en los veinte residuos de la región N-terminal es de vital importancia, ya que así, podremos apreciar diferencias en estabilidad, velocidades de reacción y especificidad de productos. Para esto es importante establecer un método de purificación, especialmente para la caracterización cinética, es por esto que se realizó la purificación de LevS  $\Delta$ N85C.

La purificación de LevS  $\Delta$ N85C se llevó a cabo por cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC), debido a que, esta enzima tiene fusionada una etiqueta de histidinas (6xHisTag) en el extremo C-terminal. La fase exploratoria de la purificación se llevó a cabo con un gradiente continuo de elución, con amortiguador de elución de imidazol 500 mM, con lo que se obtuvo un perfil de purificación (Figura 25) en el que podemos observar la elución de una fracción de proteínas inespecíficas al 10% de amortiguador de elución (Figura 21, carriles 2, 3 y 4). Por otra parte, cuando se alcanza el 40% v/v del amortiguador de elución, eluyen tres fracciones de proteínas (Figura 21, carriles 5, 6 y 7) que contienen únicamente una banda que coincide con el peso esperado para LevS  $\Delta$ N85C (72kDa). Además, en comparación con el carril 2, en donde observamos el extracto crudo sin purificar, podemos observar una banda sobrerrepresentada con el mismo perfil de migración electroforética, indicativo que sugiere, podría tratarse de la misma proteína. A estas tres fracciones se les realizó una

prueba de liberación de azúcares reductores con 3,5-DNS (por actividad enzimática), la cual resultó positiva, indicando que estas fracciones contenían a la enzima. Estos resultados indican que al exponer la columna cargada a un 40% v/v de amortiguador de elución, la enzima de interés eluye, pero al 10% de amortiguador de unión, eluyen proteínas inespecíficas. Por lo tanto, el método de purificación para LevS  $\Delta$ N85C consta de un gradiente escalonado, que va de 0 a 10, 10 a 40 y de 40 a 100% del buffer de elución.

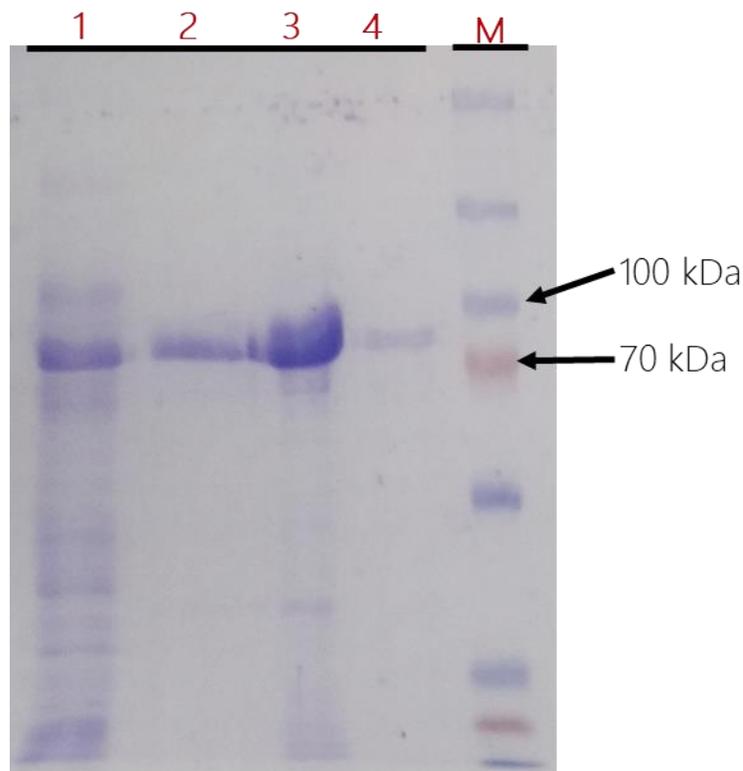


**Figura 25. Electroforesis de proteínas SDS-PAGE proveniente del ensayo de purificación de LevS N85C.** El carril M corresponde al marcador de peso molecular, el carril 1 al extracto crudo de proteínas antes de purificar, los carriles 2, 3 y 4 corresponden a las fracciones obtenidas al 10% v/v de amortiguador de elución y los carriles 5,6 y 7 muestran las fracciones que corresponden a la elución con 40% v/v de amortiguador de elución. El peso pronosticado para la enzima es de 72 kDa.

Finalizada la cromatografía IMAC, las fracciones de interés se dializaron en membranas con corte de 50 kDa contra buffer 50mM de acetatos, como paso de remoción de imidazol y cambio de amortiguador. Posteriormente, se determinó la concentración de la enzima, mediante filtración en membrana de celulosa con corte de 10 kDa (sección 4.6.3). En la figura 26, podemos apreciar en el carril 1, el extracto crudo antes de la purificación, en el carril 2 a las fracciones correspondientes a LevS  $\Delta$ N85C después de la purificación, en el carril 3 la fracción concentrada por filtración de la enzima y en el carril 4 el efluente. La enzima purificada y concentrada tiene aproximadamente 90% de pureza electroforética, que fue determinada por análisis de imagen; lo que permitirá llevar a cabo la caracterización bioquímica y cinética satisfactoriamente.

## 9.2 Determinación de los parámetros cinéticos de LevS $\Delta$ N85C.

LevS  $\Delta$ N85C exhibió un comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten (Figura 27). La  $V_{max}$  calculada es de  $119.99 \pm 5.34$  U/mg, que para esta versión truncada de LevS se encuentra 16 veces por encima de la calculada

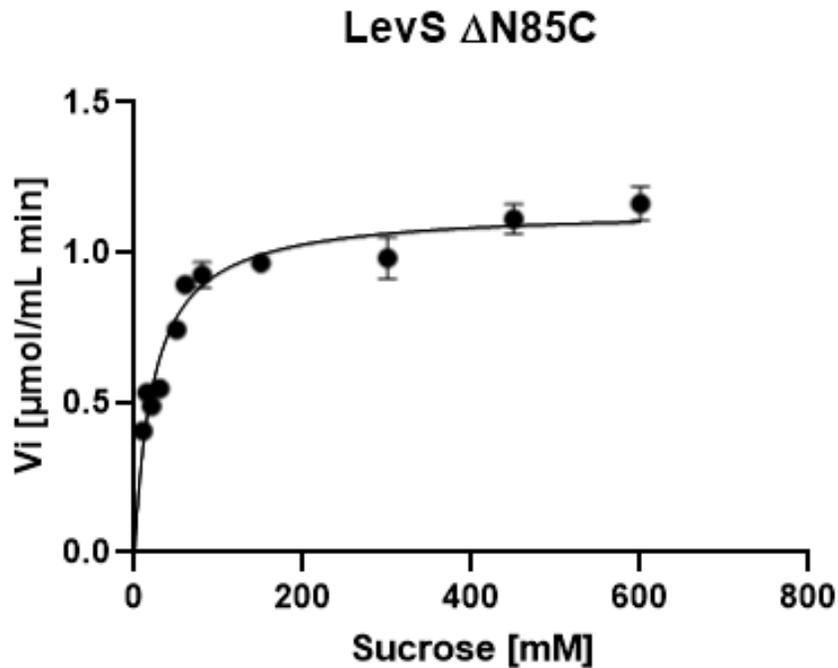


**Figura 26. Electroforesis de proteínas SDS-PAGE proveniente del ensayo de purificación de LevS  $\Delta$ N85C.** El carril M corresponde al marcador de peso molecular, el carril 1 al extracto crudo de proteínas antes de purificar, los carriles 2, 3 y 4 corresponden a las fracciones obtenidas al 10% v/v de amortiguador de elución y los carriles 5,6 y 7 muestran las fracciones que corresponden a la elución con 40% v/v de amortiguador de elución. El peso pronosticado para la enzima es de 72 kDa.

para LevS WT, que muestra un valor de  $7.5 \pm 2.56$  U/mg [Morales-Arrieta et al., 2006]. LevS se intentó purificar para la determinación de sus parámetros cinéticos y poder compararla directamente con esta versión truncada, sin embargo, no fue posible obtenerla aislada (Anexo). El incremento en la  $V_{MAX}$

entre estas dos enzimas podría deberse principalmente a la eliminación de 85 residuos en la región N-terminal de LevS.

La  $K_m$  calculada para LevS  $\Delta N85C$  es de  $22.89 \pm 4.13$  mM, un valor muy similar al que se encuentra reportado para otras levansacararas multidominio como la de los microorganismos: *Lactobacillus panis* (29.9 mM) [Waldher et al., 2008], *Leuconostoc mesenteroides* FMC (26.6 mM) [Kang et al., 2005], LvnS de *Leuconostoc mesenteroides* (24 mM) [Ishida et al., 2016], y LevC de *Leuconostoc mesenteroides* (27.3 mM) [Olvera et al., 2006]. Sin embargo, otras levansacararas multidominio presentan mayor afinidad por su sustrato que LevS  $\Delta N85C$  como es el caso de las enzimas de los microorganismos: la versión truncada Lev $\Delta 773$ His de la levansacarasa de *Lactobacillus reuteri* 121 (9.7 mM) [van Hijum et al., 2004], las versiones truncadas Lev $\Delta$ His y LevCD $\Delta$ His de la levansacarasa multidominio de *Lactobacillus sanfranciscencis* (13.1 y 14.5 mM respectivamente) [Tieking et al., 2004], y LevG de *Lactobacillus gasseri* (6.7 mM) [Anwar et al., 2010].



**Figura 27. Gráfica de velocidad versus concentración de sustrato de LevS  $\Delta$ N85C.** Esta enzima obedece un comportamiento cinético de tipo Michaelis-Menten.

La constante de velocidad de reacción  $K_{\text{cat}}$  obtenida para LevS  $\Delta$ N85C es de  $146.6 \pm 6.5 \text{ s}^{-1}$ , comparable con la obtenida para las levansacararas Lev $\Delta$ 773His de *L. reuteri* 121, que es de  $147 \text{ s}^{-1}$  [van Hijum et al., 2004], LvnS, que es de  $136 \text{ s}^{-1}$ , LevG ( $250 \text{ s}^{-1}$ ) y LevC que es de  $282.9 \text{ s}^{-1}$  [Ishida et al., 2016; Anwar et al., 2010; Olvera et al., 2006].

La eficiencia catalítica de LevS  $\Delta$ N85C es  $6.40 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , una de las más bajas hasta ahora reportada, comparada con la reportada para otras levansacararas multidominio, como LevC de *L. mesenteroides* ( $10.36 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) (Olvera et al., 2006) y LevG de *L. gasseri* ( $37.31 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [Anwar et al., 2010].

**Tabla IX. Parámetros cinéticos de levansacarosas uni- y multidominio.**

Enzima/ Microorganismo		$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
MULTIDOMINIO	LevS $\Delta$ N85C	22.89±4.13	146.6±6.5	6.40
	LevS WT	36.7	NR	NR
	LevC <i>L. mesenteroides</i>	27.3	282.9	10.36
	LvnS <i>L. mesenteroides</i>	24	136	5.6
	Lev <i>L. reuteri</i> 121 ( $\Delta$ 773His)	9.7	147	15.1
	LevG <i>L. gasseri</i>	6.7	250	37.31
UNI	SacB <i>B. megaterium</i>	10.8	197.9	18.3
	SacB <i>B. subtilis</i>	9	236.7	26.3

A pesar de que LevS  $\Delta$ N85C tiene un comportamiento similar a otras levansacarosas multidominio de la familia *Leuconostocaceae*, existe una ligera diferencia en las  $K_m$  con las reportadas para las levansacarosas de la familia *Lactobacillus*, esto podría deberse a que, como reporta García-Paz et al., (2020), las levansacarosas multidominio de estas dos familias pertenecen a clados distintos, por lo que, mientras que para las levansacarosas multidominio de la familia *Lactobacillaceae* los dominios adicionales no contribuyen de manera importante en la síntesis de levanas, en las levansacarosas del género *Leuconostocaceae* son de suma importancia.

## 10 CONCLUSIONES

En este trabajo se diseñó un método novedoso para la construcción de bancos de triples mutantes continuas en los veinte aminoácidos de la región N-terminal que probablemente están implicados en la síntesis de HM<sub>W</sub>L de LevS, denominado “mutagénesis combinatoria basada en alanina”, que consiste en la modificación del codón silvestre por el de alanina, para generar bancos de mutantes con diversidad controlada y una cantidad mínima de clonas (~200 clonas por banco) a analizar para cubrir todas las variantes posibles en esta región.

Así mismo, se implementó un método de cribado de mutantes de LevS afectadas en la síntesis de HM<sub>W</sub>L, a través de la apreciación de un fenotipo no mucoide.

Se construyeron y cribaron cuatro bancos de mutantes (<sup>136</sup>EKL<sub>138</sub>, <sup>139</sup>DDS<sub>141</sub>, <sup>142</sup>VSK<sub>144</sub> y <sup>145</sup>DLN<sub>147</sub>), identificando clonas con el fenotipo no mucoide en los bancos <sup>136</sup>EKL<sub>138</sub> y <sup>139</sup>DDS<sub>141</sub>, sin embargo, todas las clonas de los bancos construidos poseen una transversión de G→T que ocasiona la aparición de un codón de paro en el residuo E123, sugiriendo la presencia de un hotspot en la secuencia codificante de este residuo (GAA).

Se llevo a cabo la purificación y caracterización cinética de la enzima modelo LevS N85C, mostrando los siguientes parámetros: una K<sub>m</sub> de 22.89 mM, k<sub>cat</sub> 146.6 s<sup>-1</sup> y una eficiencia catalítica de 6.4 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Con base en los parámetros cinéticos de esta enzima se puede concluir que es similar a otras levansacarasas multidominio de *Leuconostoc mesenteroides*, mientras que la eficiencia catalítica es inferior tanto para levansacarasas multidominio del género *Lactobacillus*, así como para las unidominio.

En conclusión, el estudio de la región N-terminal implicada en la síntesis de HMWL de LevS nos permitió desarrollar e implementar técnicas novedosas y robustas que comprenden la generación de variabilidad controlada y bancos de mutantes racionalmente pequeños para el estudio de regiones que comprenden más de un residuo en enzimas fructansacarasas, implicadas en la síntesis de fructanas de alto peso molecular.

## 11 PROSPECTIVAS

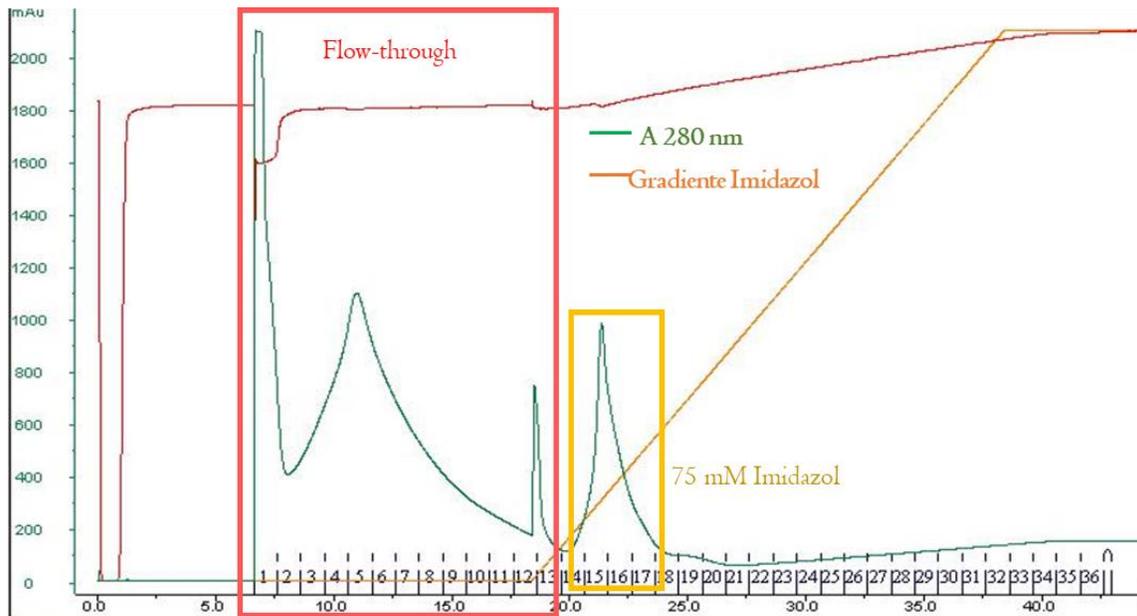
- Construir y cribar los bancos de mutantes restantes ( $_{148}\text{SKT}_{150}$ ,  $_{151}\text{TVV}_{153}$ , y  $_{154}\text{TK}_{155}$ ).
- Explorar el posible refinamiento del método de cribado basado en fenotipos mucoide y no mucoide a método de selección construyendo a LevS  $\Delta\text{N85C-SP}$  con el péptido señal PelB Leader fusionado en el extremo N-terminal.
- Montar el método de cribado para mutantes con actividad enzimática a través de liberación de azúcares reductores en placa y su detección con 2,3,5-TTC.
- Mutagenizar el hotspot en la región N-terminal por un nucleótido que no provoque un cambio en el aminoácido silvestre (E).

## 12 ANEXO

### A Ensayos de purificación de LevS WT

La caracterización cinética de la levansacarasa LevS  $\Delta$ N85C provee información enriquecedora en el campo de las fructansacarosas multidominio, como pudimos comparar y discutir en el apartado anterior (6.4.2). Sin embargo, la comparación directa más contrastante resultaría ser aquella entre la enzima parental, LevS WT y la versión truncada central de este trabajo: LevS  $\Delta$ N85C. Esto debido a que LevS  $\Delta$ N85C es una enzima con un comportamiento similar a la silvestre, en términos del porcentaje de fructosa destinado a las reacciones de hidrólisis y transferencia, así, como su capacidad casi igual de sintetizar levana de alto peso molecular, pero, con la ausencia de la región C-terminal, el péptido-síñal y 85 residuos pertenecientes a la región N-terminal.

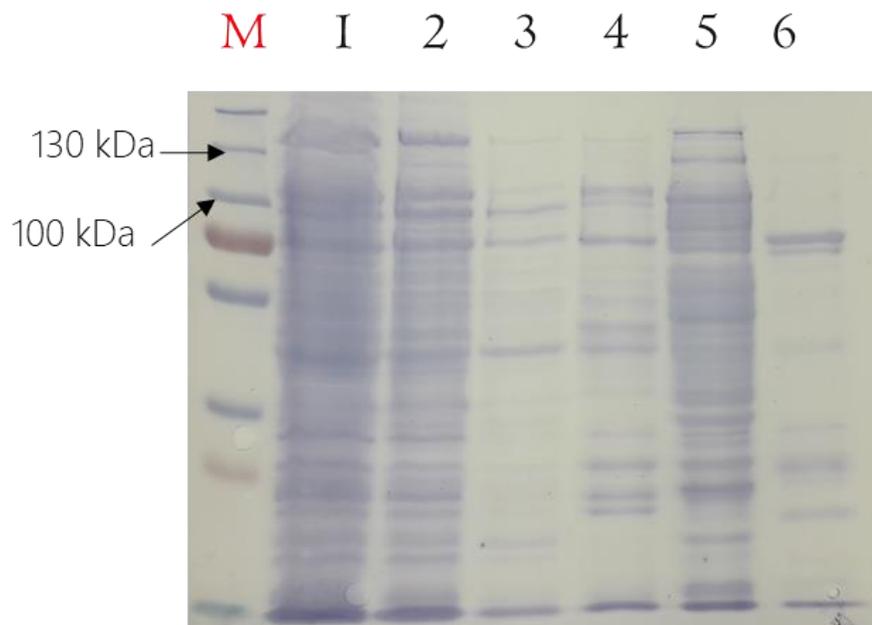
Con este objetivo, la primera estrategia de purificación de LevS WT fue utilizar la etiqueta de histidinas (6xHisTag) que tiene fusionada en el extremo C-terminal. El ensayo de purificación se realizó empleando un gradiente continuo de elución, con amortiguador de elución desde 0 hasta 100%. Derivado de este procedimiento se obtuvo un cromatograma, en el que podemos observar una señal bastante grande para el flow-through, seguido de una señal de elución final que corresponde al 10% v/v de amortiguador de elución (Figura A1).



**Figura A1. Cromatograma del ensayo de purificación de LevS WT por IMAC.** Las barras negras en el eje de las x con numero representa cada una de las fracciones recuperadas, cada una con volumen de 5 mL.

Las fracciones obtenidas en estas señales, así como el extracto crudo después de haber sido cargado en la columna fueron analizados. La electroforesis de proteínas (Figura A2) muestra que la composición del extracto crudo después de haber sido cargado en la columna es idéntica al extracto crudo sin tratamiento (carriles 1 y 2), mientras que, el flow-through y las fracciones correspondientes a los componentes del extracto eluidos al 75 mM de imidazol del amortiguador de elución son totalmente heterogéneas (carriles 4,5 y 6).

La construcción de una tabla de purificación (Tabla A1) permitió observar que la cola de histidinas presente en LevS WT no es capaz de coordinarse con los iones níquel de la columna de afinidad, ya que la actividad enzimática detectada se encuentra tanto en el flow-through, así como en el extracto recirculado, además se pierde la mitad de la actividad enzimática total ( $\sim 10$  U), esto, probablemente por la poca estabilidad que presenta.



**Figura A2. SDS-PAGE del ensayo de purificación de LevS WT.** El carril M muestra el marcador de peso molecular; carril 1 el extracto antes de purificar; carril 2 fracción recirculada; carril 3 fracción dos; carril 4 fracción seis; carril 5 fracción trece; carril 6 elución a 75 mM de imidazol.

La falta de éxito en la purificación de LevS WT por cromatografía IMAC nos condujo al planteamiento de una nueva estrategia de purificación, para esto, se recurrió a un protocolo de purificación previamente desarrollado para otras fructansacarosas multidominio truncadas, que consiste en la utilización de una columna empacada con resina de dietilaminoetil-celulosa (DEAE+) y una fase móvil compuesta de amortiguador de fosfatos que se alimenta con un gradiente de concentración desde 10 mM hasta 1000 mM, a pH 6.

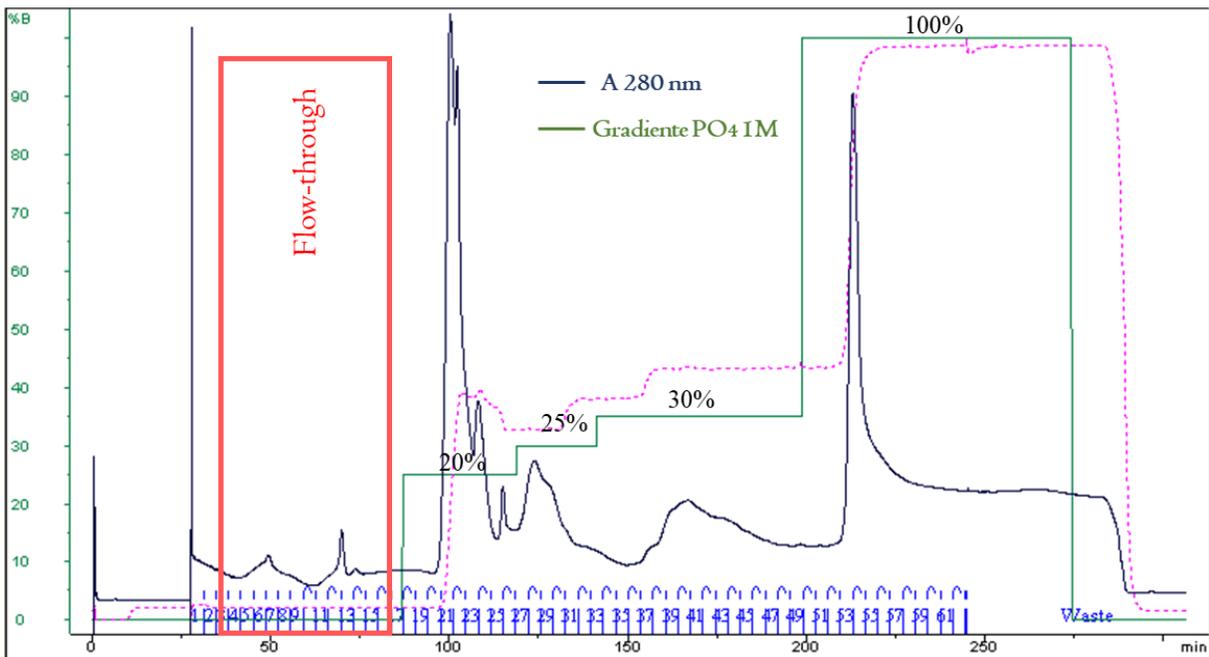
Esta metodología está basada en el punto isoeléctrico teórico de LevS WT, que es 4.79, ya que, en el pH del amortiguador de la fase móvil, la enzima podría tener mayor abundancia de cargas negativas, lo que podría garantizar la interacción con la resina de carga opuesta.

**Tabla A1 Ensayo de purificación de LevS por IMAC.** *La actividad específica se obtuvo dividiendo la actividad volumétrica contra la concentración de proteína; las unidades totales se obtuvieron multiplicando la actividad volumétrica por el volumen de la muestra; el factor de purificación se obtuvo dividiendo la actividad específica del paso de purificación contra la actividad específica inicial, mientras que el rendimiento se calculó con base en las unidades totales obtenidas al inicio (antes de purificar).*

Muestra	Volumen [mL]	Actividad Volumétrica [U/mL]	Proteína Total [mg/mL]	Actividad Específica [U/mg]	Unidades Totales [U]	Factor de Purificación	Rendimiento
Extracto Crudo	20	1	10.78	0.09	20	1	100%
Cromatografía IMAC (Recirculado)	20	0.1037	9.07	0.01	2.07	ND	ND
Cromatografía IMAC (Flow-Through)	50	0.1462	1.03	0.14	7.31	ND	ND

Cargada y equilibrada la columna, se eluyó el flow-through con ayuda del amortiguador de fosfatos 10 mM, posteriormente se inició el gradiente escalonado con las concentraciones 200, 250, 300 y 1000 mM. Esto generó

distintas señales en el cromatograma (Figura A3), específicas para cada



**Figura A3. Cromatograma del ensayo de purificación de LevS WT por intercambio aniónico.** Las barras azules en el eje de las x con numero representa cada una de las fracciones recuperadas, cada una con volumen de 5 mL.

escalón del gradiente.

El análisis de las fracciones representativas de cada una de las señales de elución (Figura A3) permite observar que en ninguna de las fracciones se encuentra una banda enriquecida en el peso molecular esperado para LevS WT (110 kDa). Paralelo a este análisis se midió actividad enzimática en cada una de las fracciones obtenidas, además del extracto recirculado, y, se construyó una tabla de purificación (Tabla A2), en la que se observa que de las 27 unidades de actividad enzimática cargadas a la columna, no se logra recuperar ninguna, y solo se detectaron trazas de actividad enzimática en el flow-through, por lo que se hipotetiza que la enzima es capaz de interactuar con la resina, pero el amortiguador de fosfatos en las concentraciones de

200 a 1000 mM la desestabiliza, lo que genera la pérdida de la actividad enzimática.

**Tabla A2 Ensayo de purificación de LevS por cromatografía de intercambio iónico.** *La actividad específica se obtuvo dividiendo la actividad volumétrica contra la concentración de proteína; las unidades totales se obtuvieron multiplicando la actividad volumétrica por el volumen de la muestra; el factor de purificación se obtuvo dividiendo la actividad específica del paso de purificación contra la actividad específica inicial, mientras que el rendimiento se calculó con base en las unidades*

Muestra	Volumen [mL]	Actividad Volumétrica [U/mL]	Proteína Total [mg/mL]	Actividad Específica [U/mg]	Unidades Totales [U]	Factor de Purificación	Rendimiento
Extracto Crudo	20	1.37	2.62	0.52	27.4	1	100%
Cromatografía IE (DEAE+)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Flow-Through (Concentrado)	5	ND	1.23	ND	ND	ND	ND
Flow-Through (Efluente)	50	ND	0,013	ND	ND	ND	ND
Elución 200 mM	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Elución 250 mM	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Elución 300 mM	40	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Con esto en mente, se realizó otro ensayo de purificación con el mismo método, variando únicamente la recolección de las muestras, que, en este caso, una vez eluidas y captadas en los tubos de ensayo, se cambiaron inmediatamente de amortiguador con ayuda de filtración en una membrana con corte de 30 kDa. El amortiguador de acetatos pH 6 fue utilizado como amortiguador de trabajo en este cambio, ya que es en el que la enzima cataliza sus reacciones de manera eficiente. Sin embargo, después de haber realizado este cambio en el protocolo, tampoco se pudo detectar

actividad enzimática en ninguna de las fracciones con el nuevo amortiguador.

El aislamiento de LevS ha resultado ser complicada, ya que a través de los dos métodos ensayados y descritos no fue posible purificarla. Esto probablemente se debe a su naturaleza proteolítica y poco estable [García-Paz., 2019], al ser una enzima de 110 kDa y 1022 residuos divididos en cuatro regiones: región N-terminal, dominio catalítico y la región C-terminal que alberga la región de transición. Este fenómeno podría deberse también a la escasa cantidad de enzima que se obtiene, ya que esta oscila entre las 20 y 25 U/L, conjugado a esto, no se observa sobreexpresión, lo que complica aún más la purificación, e incluso, el simple hecho de analizarla. Por otro lado, existe un método que podría ser utilizado para purificar esta enzima, que es el replegamiento de proteínas por cuerpos de inclusión, en caso de que alguna parte de LevS WT expresada se fuera a la fracción insoluble, e incluso utilizar este método requiere una validación con la enzima nativa en términos de los parámetros cinéticos y bioquímicos que se midan. No obstante, existe una variada lista de resinas y técnicas de purificación que pueden ser utilizadas para generar fracciones enriquecidas de LevS WT. Un caso más complejo para abordar la problemática que representa la purificación de esta enzima, podría ser las condiciones y los sistemas de expresión, e incluso optimizar la construcción en términos de la secuencia nucleotídica.

## 13 BIBLIOGRAFÍA

- Anwar, M., Kralj, S., Pique, A., Leemhuis, H., van der Maarel, M. and 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), pp.1264-1274.
- Anwar, M., Kralj, S., van der Maarel, M. and Dijkhuizen, L. (2008). The Probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 Produces High-Molecular-Mass Inulin from Sucrose by Using an Inulosucrase Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), pp.3426-3433.
- Banguela, A., & Hernandez, L. E. (2006). Fructans: from natural sources to transgenic plants. Recuperado de <https://www.semanticscholar.org/paper/Fructans-%3A-fromnatural-sources-totransgenicBanguelaHernandez/4a3a184112b125f7a26d88e37eae211dd4835e1>
- Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, U., Pankova, L. and Danilevics, A. (2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, 38(5), pp.701-706.
- Benzer, S. (1961). On the topography of the genetic fine structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 47(3), 403-415. doi:10.1073/pnas.47.3.403
- Bradford MM (1976): *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*. 72: 248-254.
- Bramucci, M., & Nagarajan, V. (1996). Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality. *Applied And Environmental Microbiology*, 62(11), 3948-3953. doi: 10.1128/aem.62.11.3948-3953.1996
- CHAMBERT, R., & GONZY-TREBOUL, G. (1976). Levansucrase of *Bacillus subtilis*. Characterization of a Stabilized Fructosyl-Enzyme Complex and Identification of an Aspartyl Residue as the Binding Site of the

- Fructosyl Group. *European Journal Of Biochemistry*, 71(2), 493-508.  
Doi: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb11138.x
- Chambert, R., Treboul, G., & Dedonder, R. (1974). Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal Of Biochemistry*, 41(2), 285-300. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03269.x
- DAVIES, G., WILSON, K., & HENRISSAT, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321(2), 557-559. Doi: 10.1042/bj3210557
- Del Moral, S., Olvera, C., Rodriguez, M. and Munguia, A. (2008). Functional role of the additional domains in inulosucrase (IslA) from *Leuconostoc citreum* CW28. *BMC Biochemistry*, 9(1), p.6.
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., & Crow, J. F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 148(4), 1667-1686. doi:10.1093/genetics/148.4.1667
- Gao, S., Yao, S., Hart, D. J., & An, Y. (2017). Signal peptide-dependent protein translocation pathway is crucial for the sucrose sensitivity of SACB-expressing *Escherichia coli*. *Biochemical Engineering Journal*, 122, 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.03.002>
- García-Paz F., (2019). Estudio de la relación estructura/función de la fructosiltransferasa multidominio LevS de *Leuconostoc mesenteroides*. Instituto de Biotecnología, U.N.A.M.
- García-Paz, F. de, Martínez-Bahena, S., & Olvera, C. (2022). Structure–function relationship studies of multidomain Levansucrases from *Leuconostocaceae* family. *Microorganisms*, 10(5), 889. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050889>
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T. and Kado, C., 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 164(2), pp.918-921.
- 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. *Biotechnology Letters*, 38(4), 681-687. doi: 10.1007/s10529-015-2024-9
- Jacobson, G. R., Takacs, B. J., & Rosenbusch, J. P. (1976). Properties of a major protein released from *Escherichia coli* by osmotic shock. *Biochemistry*, 15(11), 2297-2303.
- Jadaun, J., Narnoliya, L., Agarwal, N., & Singh, S. (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. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.070
- Jäger, W., Schäfer, A., Pühler, A., Labes, G., & Wohlleben, W. (1992). Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *Journal of bacteriology*, 174(16), 5462-5465.
- Jiménez-Sánchez, M., Pérez-Morales, R., Goycoolea, F., Mueller, M., Praznik, W., & Loeppert, R. et al. (2019). Self-assembled high molecular weight inulin nanoparticles: Enzymatic synthesis, physicochemical and biological properties. *Carbohydrate Polymers*, 215, 160-169. Doi: 10.1016/j.carbpol.2019.03.060
- Kang, H. K., Seo, M. Y., Seo, E. S., Kim, D., Chung, S. Y., Kimura, A., Day, D. F., & Robyt, J. F. (2005). Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1727(1), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.10.012>
- Lee, S., Pancholi, V., & Fischetti, V. (2002). Characterization of a Unique Glycosylated Anchor Endopeptidase That Cleaves the LPXTG Sequence Motif of Cell Surface Proteins of Gram-positive Bacteria. *Journal Of Biological Chemistry*, 277(49), 46912-46922.
- Lehman, T. A., Greenblatt, M., Bennett, W. P., & Harris, C. C. (1994). Mutational spectrum of the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and Molecular Pathogenesis. *Drug Metabolism Reviews*, 26(1-2), 221-235. doi:10.3109/03602539409029793

- Lovett, S., Hurley, R., Sutura, V., Aubuchon, R., & Lebedeva, M. (2002). Crossing Over Between Regions of Limited Homology in *Escherichia coli*: RecA-Dependent and RecA-Independent Pathways. *Genetics*, *160*(3), 851-859. doi: 10.1093/genetics/160.3.851
- Malik, A., Hapsari, M., Ohtsu, I., Ishikawa, S., & Takagi, H. (2015). Cloning and heterologous expression of the ftfCNC-2(1) gene from *Weissella confusa* MBFCNC-2(1) as an extracellular active fructansucrase in *Bacillus subtilis*. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, *119*(5), 515-520. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.09.024
- Martinez-Bahena, S., (2019). Delimitando la región N-terminal involucrada en la procesividad de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*. Instituto de Biotecnología, U.N.A.M.
- Martínez-Fleites, C., Ortíz-Lombardía, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E., & Arrieta, J. et al. (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochemical Journal*, *390*(1), 19-27.
- McGaughey, G., Gagné, M., & Rappé, A. (1998).  $\pi$ -Stacking Interactions. *Journal Of Biological Chemistry*, *273*(25), 15458-15463.
- McIntosh, L., Hand, G., Johnson, P., Joshi, M., Körner, M., & Plesniak, L. et al. (1996). The pKa of the General Acid/Base Carboxyl Group of a Glycosidase Cycles during Catalysis: A  $^{13}\text{C}$ -NMR Study of *Bacillus circulans* Xylanase†. *Biochemistry*, *35*(31), 9958-9966.
- Meng, G., & Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural & Molecular Biology*, *10*(11), 935-941.
- Meng, X., Dobruchowska, J., Pijning, T., López, C., Kamerling, J. and Dijkhuizen, L. (2014). Residue Leu940 Has a Crucial Role in the Linkage and Reaction Specificity of the Glucansucrase GTF180 of the Probiotic Bacterium *Lactobacillus reuteri* 180. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(47), pp.32773-32782.
- Mészáros, B., Simon, I. and Dosztányi, Z. (2009). Prediction of Protein Binding Regions in Disordered Proteins. *PLoS Computational Biology*, *5*(5), p.e1000376.

Molina, M., Moulis, C., Monties, N., Pizzut-Serin, S., Guieysse, D., Morel, S., Cioci, G. and Remaud-Siméon, M. (2019). Deciphering an Undecided Enzyme: Investigations of the Structural Determinants Involved in the Linkage Specificity of Alternansucrase. *ACS Catalysis*, 9(3), pp.2222-2237.

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. doi: 10.1016/j.gene.2006.02.007

Morrison, K. L., & Weiss, G. A. (2001). Combinatorial Alanine-scanning. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(3), 302–307. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(00\)00206-4](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(00)00206-4)

Nakatsu, C., Barabote, R., Thompson, S., Bruce, D., Detter, C., & Brettin, T. et al. (2013). Complete genome sequence of *Arthrobacter* sp. strain FB24. *Standards In Genomic Sciences*, 9(1), 106-116. doi: 10.4056/sigs.4438185

Okegawa, Y., & Motohashi, K. (2015). A simple and ultra-low cost homemade seamless ligation cloning extract (SLiCE) as an alternative to a commercially available seamless DNA cloning kit. Retrieved 14 June 2021.

Olivares-Illana, V., Lopez-Munguia, A. and Olvera, C. (2003). Molecular Characterization of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a Fructosyltransferase within a Glucosyltransferase. *Journal of Bacteriology*, 185(12), pp.3606-3612

Olvera, C., Castillo, E., & López-Munguía, A. (2007). Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Biotecnología*, 14, 327-345. Obtenido de [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro\\_25\\_aniv/capitulo\\_29.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_29.pdf)

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. doi: 10.1007/s10482-006-9128-0

- Ozimek, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology*, 152(4), pp.1187-1196.
- Pelacic, V., Reyrat, J. and Gicquel, B., 1996. Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *Journal of bacteriology*, 178(4), pp.1197-1199.
- Pijning, T., Anwar, M., Böger, M., Dobruchowska, J., Leemhuis, H., & Kralj, S. et al. (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.
- Raga-Carbajal, E., Carrillo-Nava, E., Costas, M., Porrás-Dominguez, J., López-Munguía, A. and Olvera, C. (2015). Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Glycobiology*, 26(4), pp.377-385.
- Raga-Carbajal, E., Díaz-Vilchis, A., Rojas-Trejo, S. P., Rudiño-Piñera, E., & Olvera, C. (2021). The molecular basis of the nonprocessive elongation mechanism in levansucrases. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100178. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra120.015853>
- Roberfroid, M., & Slavin, J. (2000). Nondigestible Oligosaccharides. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 40(6), 461-480. doi: 10.1080/10408690091189239
- Rogozin, I. B., & Pavlov, Y. I. (2003). Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(1), 65-85. doi:10.1016/s1383-5742(03)00032-2
- Rogozin, I. B., Kondrashov, F. A., & Glazko, G. V. (2001). Use of mutation Spectra Analysis Software. *Human Mutation*, 17(2), 83-102. doi:10.1002/1098-1004(200102)17:2<83::aid-humu1>3.0.co;2-e
- Rozen, R., Bachrach, G., & Steinberg, D. (2004). Effect of carbohydrates on fructosyltransferase expression and distribution in *Streptococcus mutans* GS-5 biofilms. *Carbohydrate Research*, 339(18), 2883-2888. doi: 10.1016/j.carres.2004.07.028

- Sato, S., & Kuramitsu, H. (1986). Isolation and characterization of a fructosyltransferase gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Infection And Immunity*, 52(1), 166-170. doi: 10.1128/iai.52.1.166-170.1986
- Schleyer, M., Schmid, R., & Bakker, E. P. (1993). Transient, specific and extremely rapid release of osmolytes from growing cells of *Escherichia coli* K-12 exposed to hypoosmotic shock. *Archives of Microbiology*, 160(6), 424-431.
- Schwab, C., & Gänzle, M. (2006). Effect of membrane lateral pressure on the expression of fructosyltransferases in *Lactobacillus reuteri*. *Systematic And Applied Microbiology*, 29(2), 89-99. doi: 10.1016/j.syapm.2005.09.005
- Strube, C., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J. and Heinz, D. (2011). Polysaccharide Synthesis of the Levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* Is Controlled by Distinct Surface Motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), pp.17593-17600.
- Taylan, O., Yilmaz, M., & Dertli, E. (2019). Partial characterization of a levan type exopolysaccharide (EPS) produced by *Leuconostoc mesenteroides* showing immunostimulatory and antioxidant activities. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 136, 436-444. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.078
- Tieking, M., Kühnl, W., & Gänzle, M. G. (2005). Evidence for formation of heterooligosaccharides by *Lactobacillus sanfranciscensis* during growth in wheat sourdough. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(7), 2456-2461.
- Tonozuka, T., Tamaki, A., Yokoi, G., Miyazaki, T., Ichikawa, M., Nishikawa, A., Ohta, Y., Hidaka, Y., Katayama, K., Hatada, Y., Ito, T. and Fujita, K. (2012). Crystal structure of a lactosucrose-producing enzyme, *Arthrobacter* sp. K-1  $\beta$ -fructofuranosidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 51(6-7), pp.359-365.
- 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), 157-17
- 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. doi:  
10.1099/mic.0.26671-0

Waldherr, F., Meissner, D., & Vogel, R. (2008). Genetic and functional characterization of *Lactobacillus panis* levansucrase. *Archives Of Microbiology*, 190(4), 497-505. doi: 10.1007/s00203-008-0404-4

Wuerges, J., Caputi, L., Cianci, M., Boivin, S., Meijers, R. and Benini, S. (2015). The crystal structure of *Erwinia amylovora* levansucrase provides a snapshot of the products of sucrose hydrolysis trapped into the active site. *Journal of Structural Biology*, 191(3), pp.290-298.

Zavolan, M., & Kepler, T. B. (2001). Statistical inference of sequence-dependent mutation rates. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(6), 612-615. doi:10.1016/s0959-437x(00)00242-2