



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA INULOSACARASA DE
Leuconostoc citreum Y DOS VERSIONES TRUNCADAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P r e s e n t a:

Rebeca Pérez Morales

Directora de tesis:

Dra. Clarita Olvera Carranza



MAYO 2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Rebeca Pérez Morales
FECHA: 11 mayo 2004
FIRMA: [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Expresión heteróloga de la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* y dos versiones truncadas"

realizado por Rebeca Pérez Morales

con número de cuenta 09519885-7 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Clarita Olvera Carranza

Propietario Dr. Agustín López-Munguía Canales

Propietario Dra. Laura del Carmen Vargas Parada

Suplente M. en B. María Elena Rodríguez Alegría *Ma Elena Rodríguez Alegría*

Suplente M. en C. Renato León Rodríguez *Renato León Rodríguez*

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Tecnología Enzimática del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Clarita Olvera Carranza y la supervisión técnica de la M. en B. Ma. Elena Rodríguez Alegría.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto 40609-Z, "Aislamiento, caracterización, modificación estructural y aplicación de las glicosiltransferasas para la síntesis de polisacáridos de interés industrial"

El Comité Técnico del programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del proyecto IN238202-3 "Producción de inulina y fructooligosacáridos por síntesis enzimática"

A MIS PAPÁS Y A DANY CON MUCHÍSIMO AMOR

Dedico el esfuerzo y la satisfacción de este trabajo a mis padres, gracias por tanto amor, apoyo y comprensión.

A mi hijo Juan Daniel quien representa el amor y la fuerza para seguir adelante y tomar nuevos retos.

A mis hermanas Ana y Lupis porque han sido un ejemplo de lucha y perseverancia, gracias por estar siempre unidas .

Agradecimientos

A Dios por no permitirme desistir de mi fé y mis sueños.

A la UNAM, la máxima casa de estudios que nos brinda tantos beneficios para poder ser profesionales y enriquecer así el conocimiento en nuestro país.

A mis papás y mis hermanas por apoyar siempre mis decisiones e impulsarme a seguir adelante. Por las enseñanzas de toda la vida y por compartir los momentos más importantes juntos.

A mi pequeño Dany, porque con el aprendí a salir adelante y a ver la vida de otra manera.

A José Luis por el gran apoyo que ha significado para la familia, para Dany y para mi.

Al Dr. Agustín López-Munguía por darme la oportunidad de integrarme a su grupo, gracias por las lecciones, por su interés y dedicación en la realización de esta tesis.

A la Dra. Clarita Olvera por la biología molecular, por confiar en mí y por enseñarme que en el camino tenemos tropiezos y que a pesar de ello tenemos que continuar. Gracias por todo el apoyo incondicional y por el cariño siempre mostrado.

A la M. en B. Ma. Elena Rodríguez por todo el apoyo brindado, por los consejos, por la cinética enzimática, pero sobre todo por su valiosa amistad.

A la Dra. Laura Vargas y el M. en C. Renato León por enriquecer con sus comentarios el contenido de esta tesis.

A los T.L. Fernando González y Aurelia Ocampo por el apoyo técnico.

A Verónica Aldama por los procedimientos administrativos.

A todos los (as) López: Sandra, Angela, Clarita, Male, Sandrita, Alex, Edmundo, Fer, Ruben, Arlette, Xochitl, Chelo, Alina, Mary, y a los ex López, José Luis, Marce, Vanesa, Gina y Lolita, por hacer más agradable el trabajo en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos de siempre.

A Nancy y a Miriam por su amistad, porque hemos compartido sueños y metas.

A Margaro por su amistad, por los consejos, por los momentos divertidos y también por los Western Blot.

A Alberto por el cariño y la paciencia, por escucharme cuando lo he necesitado.

A mis amigos de siempre Elizabeth, Isabel, Lucy, Alfredo, Alberto, Minerva, Alex, Nancy, Margaro, Miriam, Elizabeth R., Marisol y Arturo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1 GENERALIDADES	
1.1 Fructanas.....	5
1.1.1 Levana.....	5
1.1.2 Inulina y fructooligosacáridos.....	6
1.1.3 Aplicación de las fructanas.....	7
1.2 Fructosiltransferasas	
1.2.1 FTF's de plantas.....	10
1.2.2 FTF's de hongos.....	11
1.2.3 FTF's bacterianas.....	12
1.2.4 Mecanismo de reacción.....	13
1.2.5 Estructura.....	15
1.3 Inulosacarasa bacterianas.....	18
1.3.1 Inulosacarasa de <i>Leuconostoc citreum</i>	19
OBJETIVOS.....	23
2 MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	24
2.2 Manipulación del DNA	
2.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
2.2.2 Subclonación del gen <i>islA</i> y una versión truncada (E3).....	27
2.2.3 Purificación y digestión de plásmidos.....	28
2.3 Expresión y producción de las inulosacarasa recombinantes	
2.3.1 Perfil de expresión.....	28
2.3.2 Producción de la EIS recombinante y sus formas truncadas.....	28
2.4 Extracción de las enzimas.....	29
2.5 Determinación de la actividad enzimática.....	30
2.6 Cuantificación de proteínas.....	30
2.7 Electroforesis de proteínas.....	30
2.8 Purificación	
2.8.1 Purificación por afinidad en columnas de níquel.....	31
2.8.2 Purificación bajo condiciones desnaturizantes.....	32
2.8.3 Wester Blot.....	33
2.9 Determinación de constantes cinéticas.....	33
2.10 Determinación de hidrólisis-transferencia.....	35

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1	Subclonación del gen <i>isIA</i> y la forma truncada E3 en el vector pBAD Thio/TOPO.....	36
3.2	Producción de las inulosacararas recombinantes (EIS's)	
3.2.1	Expresión óptima de las EIS's.....	38
3.2.2	Efecto de la temperatura en la producción de las EIS's.....	40
3.2.3	Cinéticas de producción.....	41
3.2.4	Extracción de las enzimas.....	45
3.3	Purificación	
3.3.1	Purificación por afinidad en columnas de níquel.....	46
3.3.2	Purificación bajo condiciones desnaturalizantes.....	47
3.4	Caracterización bioquímica	
3.4.1	Constantes cinéticas.....	48
3.4.2	Relación Hidrólisis-Transferencia.....	52
4.	CONCLUSIONES	55
5.	PERSPECTIVAS	56
6.	BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Representación de la estructura de la levana.....	5
Figura 1.2	Representación de la estructura de la inulina.....	6
Figura 1.3	Reacciones catalizadas por las fructosiltransferasas.....	8
Figura 1.4	Esquema del mecanismo de reacción.....	13
Figura 1.5	Estructura de la levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i>	16
Figura 1.6	Estructura cristalográfica de la LS enlazada al sustrato.....	17
Figura 1.7	Representación esquemática de glucosiltransferasas.....	20
Figura 1.8	Representación esquemática de la inulosacarasa de <i>Leuconostoc citreum</i>	21
Figura 1.9	Representación esquemática de las EIS's truncadas.....	22
Figura 3.1	Fragmentos amplificados por PCR.....	37
Figura 3.2	Zimograma de las EIS's.....	37
Figura 3.3	Geles teñidos con azul de coomassie. Concentración óptima de inductor.....	39
Figura 3.4	Cinéticas de crecimiento de las EIS` s.....	42
Figura 3.5	Western Blot enzima EIS2.....	46
Figura 3.6	Comportamiento cinético de las EIS's.....	51
Figura 3.7	Porcentaje de Hidrólisis-Transferencia de las EIS's.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Clasificación de las fructosiltransferasas.....	9
Tabla 2.1	Cepas utilizadas en este estudio.....	24
Tabla 2.2	Oligonucleótidos utilizados.....	26
Tabla 2.3	Pasos para la amplificación de los fragmentos de ADN.....	26
Tabla 3.1	Expresión óptima de las EIS's.....	38
Tabla 3.2	Velocidades específicas de crecimiento.....	43
Tabla 3.3	Sobreexpresión de las cepas EISR.....	44
Tabla 3.4	Valores de las constantes de Michaelis-Menten obtenidos para las EIS'.....	48
Tabla 3.5	Valores de las constantes de M-M obtenidos en las reacciones H-T.....	49

RESUMEN

Las inulosacarasas son enzimas que transfieren el residuo fructosilo de la sacarosa a un polímero en crecimiento llamado inulina. Los polímeros sintetizados por estas enzimas presentan enlaces β 2-1 y pueden presentar diversos grados de polimerización. Las cadenas que presentan de 3-30 residuos de fructosa se denominan fructooligosacáridos y cadenas mas largas se denominan inulinas de bajo y alto peso molecular, dependiendo del grado de polimerización.

Debido a la importancia biológica de los polímeros de inulina en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, así como su beneficio a la salud humana, es de gran interés el conocimiento acerca de las inulosacarasas; sus propiedades cinéticas y mecanismos de reacción, ya que poco se conoce acerca de estas enzimas.

En el presente trabajo se realizó la expresión de la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* y dos versiones truncadas del gen, bajo un promotor inducible, con la finalidad de aumentar la producción de las enzimas y así proceder a su purificación y caracterización bioquímica.

Se determinaron las condiciones de crecimiento para producir las enzimas. La temperatura óptima resulto ser a 23°C y las concentraciones óptimas de inductor para las cepas EISR1 y EISR2 fueron de 0.02% de arabinosa y para EISR3 0.2% de arabinosa.

La purificación de las enzimas por afinidad de las etiquetas de histidina a los iones de níquel no tuvo éxito, ya que no se logró la retención de las proteínas, aún en condiciones desnaturalizantes.

Se determinaron las constantes cinéticas para las tres formas enzimáticas y en todos los casos se observó que las inulosacarases son más eficientes para transferir el residuo fructosilo hacia el agua. No obstante se logró dirigir la especificidad de las enzimas hacia la síntesis de polímero aumentando la concentración de sustrato.

Aunque las tres versiones de la inulosacarasa son capaces de aumentar la transferencia del residuo fructosilo al polímero, presentan diferencias entre sí. Los valores máximos de síntesis de polímero fueron: para la enzima EIS1 70%, EIS2 60% y EIS3 30%.

INTRODUCCIÓN

Las glicosiltransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un residuo glicosilo de una molécula donadora hacia una aceptora. Entre estas enzimas se encuentran las glucosiltransferasas (GTF's) y las fructosiltransferasas (FTF's). Las primeras transfieren un residuo de glucosa a partir de la sacarosa hacia un polímero en crecimiento llamado glucano, liberando fructosa al medio de reacción. Las fructosiltransferasas en cambio, transfieren un residuo fructosilo de la sacarosa hacia un polímero en crecimiento llamado fructana, por lo que en este caso la glucosa libre es la que se acumula en el medio de reacción. La acumulación de la fructosa en el medio de reacción para el primer caso, o de la glucosa para el segundo, es lo que permite la medición de actividad, ya que estos dos azúcares a diferencia de la sacarosa son reductores, por lo que son fácilmente medibles. La energía requerida para la formación del enlace glicosilo es tomada de la ruptura del enlace de la sacarosa por lo que no requieren de cofactores o intermediarios fosforilados de alta energía.

Ambas enzimas son capaces de sintetizar oligosacáridos de diferentes grados de polimerización si además de sacarosa se adiciona a la mezcla de reacción otra molécula aceptora como maltosa o lactosa. A pesar de las similitudes que existen entre estas enzimas, sus secuencias y organización estructural son muy diferentes y se han propuesto mecanismos de acción diferentes para cada una.

Previamente, en el laboratorio de biocatálisis del Instituto de Biotecnología UNAM, se aisló el gen *is/A* que codifica para la inulosacarasa (IS) de *Leuconostoc citreum*. (Olivares y col. 2003). Esta enzima presenta características de FTF's y GTF's, lo que permitió identificar tres dominios; un dominio catalítico que abarca la secuencia completa de algunas FTF's y dos dominios homólogos a los dominios variables y de unión a polímero de la alternansacarasa (ASR) de *L. mesenteroides*.

Se expresó heterológamente el gen que codifica para la enzima y dos formas truncadas, para lo cual se realizaron dos deleciones en el extremo C-terminal; en la primera se eliminó la región de alta identidad con la ASR y en la segunda se eliminó la misma región mas la zona de transición. Las enzimas resultantes se denominaron EIS2 y EIS3 respectivamente. La caracterización previa de estas enzimas muestra que al eliminar el C-terminal la enzima pierde estabilidad térmica e incrementa su actividad hidrolítica (Olivares y col. 2003)

En el presente trabajo se reporta la sobreexpresión de la inulosacarasa recombinante y sus formas truncadas bajo un promotor inducible, con la finalidad de aumentar la producción enzimática, para así proceder a su purificación y caracterización bioquímica.

1. GENERALIDADES

1.1. Fructanas

Las fructanas (inulina o levana) son polímeros solubles de β -D-fructofuranosa los cuales son sintetizados por algunos géneros bacterianos, hongos, y por alrededor del 15% de las plantas superiores, en las que se almacenan en concentraciones elevadas como carbohidrato alternativo al almidón. La síntesis ocurre a partir de sacarosa como sustrato.

1.1.1 Levana

La levana está constituida por moléculas de fructosa unidas mediante enlaces β 2-6, con ramificaciones en β 2-1 (Fig. 1.1), cuyo peso molecular varía dependiendo de la fuente de producción.

Las enzimas que catalizan la síntesis del polímero son conocidas como fructosiltransferasas (FTF's) en plantas y como levansacarasas (LS) en el caso de bacterias.

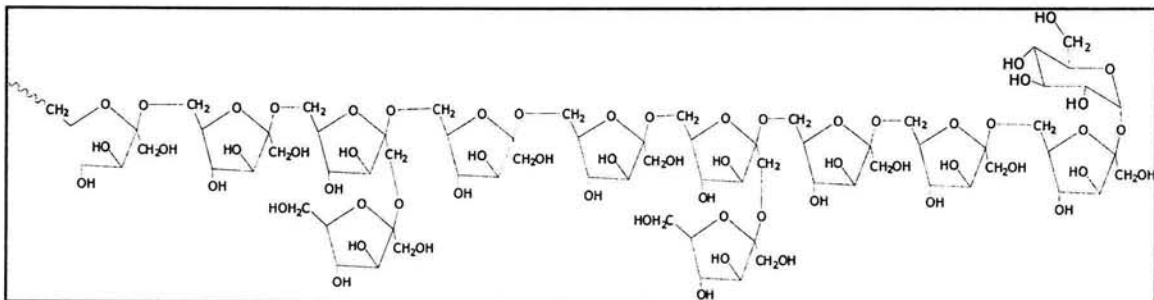


Figura 1.1 Representación de la estructura de la levana. Las unidades de fructosa son unidas por enlaces β 2-6 y pueden presentar ramificaciones en β 2-1.

1.1.2 Inulina y fructooligosacáridos.

Los residuos fructosilo también pueden estar unidos mediante enlaces β 2-1 en la cadena principal presentando o no ramificaciones en β 2-6, en este caso se les denomina inulinas (Fig. 1.2) y presentan diversos grados de polimerización. Las enzimas responsables de la síntesis de estos polímeros en bacterias y hongos son conocidas como inulosacarasas (IS), en plantas se les conoce con el nombre genérico de fructosiltransferasas. Ambas enzimas son capaces de producir fructooligosacáridos dependiendo de la fuente de la enzima y de las condiciones de reacción.

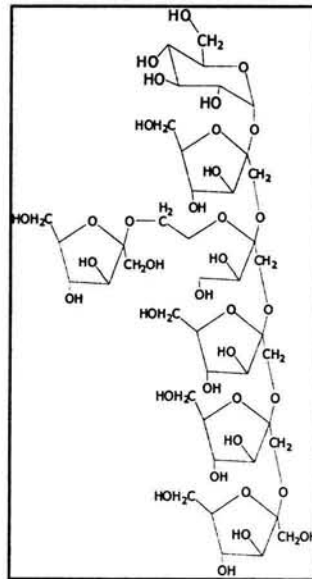


Figura 1.2 Representación de la estructura de la inulina. Las unidades de fructosa son unidas por enlaces β 2-1 y pueden presentar ramificaciones en β 2-6.

Los fructooligosacáridos (FOS) son cadenas de fructosa generalmente de un grado de polimerización menor a 10 unidades, pueden ser obtenidos por hidrólisis controlada del polímero de inulina extraído a partir de plantas (Van Loo y col, 1995), por síntesis enzimática utilizando fructosiltransferasas (Clevenger y col, 1988), o bien si además de sacarosa se adiciona a la mezcla de reacción otra molécula aceptora como maltosa o lactosa (Tanaka y col, 1981).

1.1.3 Aplicación de las Fructanas

Las fructanas tienen diversas aplicaciones, en el caso de la levadura ofrece una gran variedad de aplicaciones en las industrias de cosméticos, alimentos y fármacos (Song y col. 1996), como agente hipocolesterolémico y como agente antitumoral (Liepa y col. 1993).

La inulina y los fructooligosacáridos (FOS) son considerados nutraceuticos y son empleados en alimentos funcionales, los cuales ofrecen una combinación única de propiedades nutricionales e importantes beneficios tecnológicos (Frank 2002). Además son clasificados como fibra dietética ya que no son digeridos por las enzimas digestivas, por lo que se han realizado numerosos estudios acerca de su beneficio a la salud humana (Roberfroid 1999). Se ha reportado un efecto bifidogénico y se ha demostrado la influencia de la inulina y FOS sobre la absorción de minerales, específicamente calcio y magnesio (Roberfroid 2000).

En la industria alimentaria la inulina y los FOS se emplean como sustitutos de azúcar, de grasas (solo inulina), como texturizante y estabilizante además de que mejora la consistencia de algunos productos lácteos fermentados, postres como gelatinas, helados, galletas, pasteles y formulas para bebés (Roberfroid 2000).

1.2 Fructosiltransferasas

Las fructosiltransferasas (FTF's) transfieren un residuo fructosilo de una molécula donadora a una molécula aceptora, formando así un polímero de fructosa. En general los polímeros producidos por las FTF's se denominan fructanas y en función del tipo de la enzima que la sintetiza (levansacarasa ó inulosacarasa), adquiere diferentes estructuras (levana o inulina).

Las FTF's ejecutan tres tipos de reacciones con la sacarosa (Fig. 1.3)

- Polimerización, en la cual las unidades de fructosa se transfieren a un polímero de fructosa aumentando así en un residuo el tamaño del polímero.
- La transferencia al agua, en donde la molécula de fructosa es transferida al agua obteniendo como productos de reacción fructosa y glucosa libre.
- La transferencia de la fructosa hacia un aceptor como maltosa o lactosa para formar oligosacáridos.

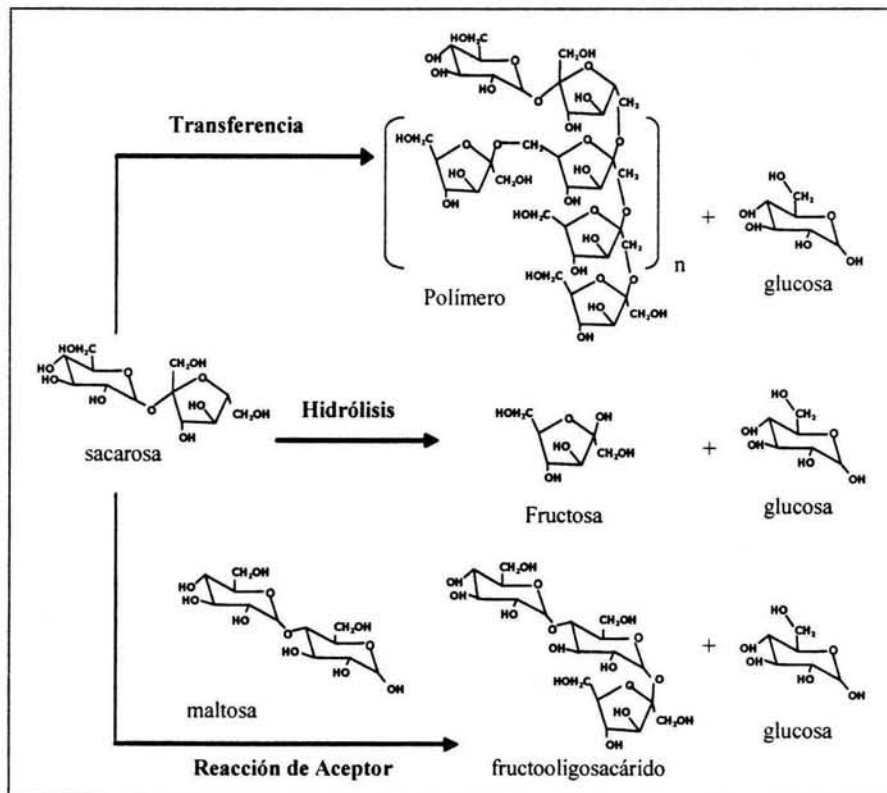


Fig. 1.3 Reacciones catalizadas por las fructosiltransferasas (Ritsema 2003)

Dependiendo de la fuente de la enzima y de las condiciones de reacción los polisacáridos alcanzan diferentes longitudes de cadena. El grado de polimerización (DP) de la inulina varía dependiendo de su origen. Cuando las cadenas de fructosa presentan un DP de 2 a 10 unidades reciben el nombre de fructooligosacáridos (FOS).

Las enzimas responsables de la síntesis de levana son las levansacarasas y de la inulina las inulosacarasas, en plantas las fructanas son producidas por al menos dos enzimas diferentes (1-SST y 1-FFT) (Chambert y Petit Glatrón 1991) que reciben el nombre genérico de fructosiltransferasas (Tabla 1.1).

Las fructanas son sintetizadas por una amplia gama de organismos, se han reportado en plantas, hongos y bacterias tanto gram positivas, como gram negativas.

Tabla 1.1 Clasificación de las fructosiltransferasas

Fructosiltransferasa	Polímero	Enlaces
Inulosacarasa (IS)	Inulina y FOS	β 2-1 y ramificaciones en β 2-6
Levansacarasa (LS)	Levana	β 2-6 y ramificaciones en β 2-1
1-SST, 1-FFT	Inulina y FOS	β 2-1

1.2.1 FTF's de plantas

Las fructanas son sintetizadas por cerca del 15% de plantas con flores, éstas almacenan fructanas como reserva de carbohidratos , que pueden contribuir a la protección de la planta contra la desecación y el frío (Sprenger y col. 1995). Las fructanas son sintetizadas y almacenadas en las vacuolas, también son utilizadas por la planta después de la defoliación y como protección para soportar las condiciones severas del ambiente (Ritsema 2003).

Las fructanas son producidas por la acción concertada de al menos dos FTF's diferentes. En un primer paso, la sacarosa-sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) cataliza la formación del trisacárido 1-kestosa, a partir de dos moléculas de sacarosa liberando glucosa. Posteriormente la fructana-fructana 1-fructosiltransferasa (1-FFT) media la transferencia reversible de los residuos fructosilo hacía la cadena de polímero en crecimiento (Edelman y Jefford, 1968).

En general los polisacáridos producidos por plantas son mucho mas cortos que los producidos por las fructosiltransferasas bacterianas, el grado de polimerización es de 30 a 50 residuos aunque ocasionalmente pueden exceder los 200 residuos. Entre las plantas que almacenan fructanas están los cereales como trigo, cebada y avena, vegetales como la chicoria, agave, lechuga, alcachofa de Jerusalem y cebolla, así como en plantas ornamentales como la dalia y el tulipán (Vijn y Smeekens, 1999).

1.2.2 FTF's de hongos

Aunque no se ha establecido la importancia fisiológica de la síntesis de fructanas en estos microorganismos, algunas cepas fungales han sido identificadas como productoras de fructanas de bajo y alto peso molecular. Rehms y col. en 1998 reportaron la clonación y expresión heteróloga de la sacarosa-sacarosa fructosiltransferasa (1-SST) de *Aspergillus foetidus*, productora del trisacárido 1-kestosa. Hirayama y col., en 1989 reportaron la producción de fructooligosacáridos por *Aspergillus niger*; en 1993, Olah y col. reportaron la síntesis de inulina de alto peso molecular en *Penicillium chrysogenum*; al igual que Kawai y col (1973) en conidios de *Aspergillus sydowi*.

Heyer y Wendenburg (2001), lograron la expresión heteróloga de la fructosiltransferasa de *Aspergillus sydowy* en *S. cerevisiae*, *E. coli* y en plantas de papa. El peso molecular de los polímeros es distinto en cada hospedero; en *S. cerevisiae* y *E. coli* solamente se producen FOS y en las plantas de papa polímeros de 40 unidades de hexosa. Sin embargo, los productos de la síntesis *in vivo* con conidios fungales fueron de pesos moleculares mayores a 1×10^7 .

Una explicación de los autores sobre esta diferencia en pesos moleculares es que quizá un factor adicional este presente en los conidios y es necesario para la producción de inulina de alto peso molecular, lo que sugiere un mecanismo que involucra más de una enzima como en el caso de la síntesis de inulina en plantas.

1.2.3 *FTF's bacterianas*

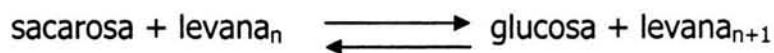
Se han reportado un gran número de bacterias productoras de fructanas, en las que se incluyen patógenos de plantas, bacterias presentes en la microbiota oral e intestinal de animales y humanos (Vijn y Smeekens, 1999). La mayoría pertenece a los géneros: *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Acetobacter*, *Phytobacterium*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Azotobacter* y *Actinomyces* (Hendry y Wallace, 1993).

El papel fisiológico que juegan las fructanas en algunos de estos microorganismos esta bien establecido. Tal es el caso de *Streptococcus* y *Actinomyces*, los cuales están implicados en la formación de la placa dentobacteriana, donde los polímeros tanto de fructosa como de glucosa participan en la adhesión de las bacterias a la superficie del diente (Rozen y col., 2001). En el caso de *Pseudomonas* que es un patógeno de plantas, la levana tiene una función antes o durante el proceso de infección como factor de virulencia (Hettwer y col., 1998). Para el caso de *Acetobacter* se ha sugerido que la presencia de exopolisacáridos como la levana puede ser una señal de reconocimiento en la interacción microorganismo-planta (James y col., 1994).

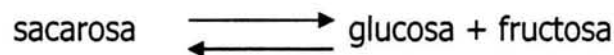
En *Leuconostoc* se desconoce la función de los exopolisacáridos producidos (tanto dextranas como fructanas), aunque podrían estar implicados como en el caso de *Streptococcus*, en funciones de la adhesión a su ambiente o servir como reserva de carbohidratos para lo cual requerirían de la producción de enzimas que los degraden.

1.2.4 Mecanismo de reacción

La determinación del mecanismo de reacción de las FTF's bacterianas ha sido difícil entre otras causas debido a que en presencia de sacarosa son capaces de realizar varias reacciones al mismo tiempo. La enzima más estudiada es la levansacarasa de *B. subtilis*, que puede transferir la fructosa hacia diversos aceptores, con la liberación de glucosa (Canedo y col.,1999) mediante dos tipos de reacción: de transferencia o de polimerización



o bien, la reacción de hidrólisis:



Se ha demostrado que la proporción de estas dos reacciones puede ser modulada en función de las condiciones y composición del medio de reacción.

Una propuesta sobre el mecanismo cinético de estas enzimas fue planteada por Chambert y Dedonder que a partir de los datos obtenidos, en una serie de experimentos concluyeron que el comportamiento cinético de la enzima se ajusta a un modelo básico de tipo Ping-Pong Bi-Bi (figura 1.4)

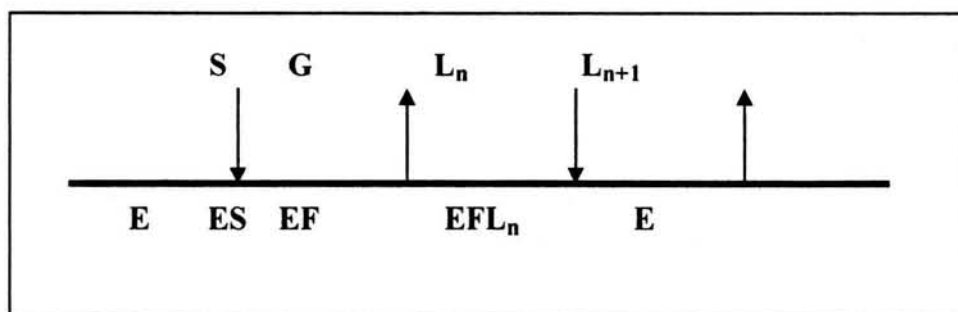


Figura 1.4 Esquema del mecanismo Ping- Pong Bi-Bi propuesto para la LS, donde E es la enzima; S es la sacarosa; G es la glucosa; F, es la fructosa y L_n es la levana con n residuos de fructosa.

Como se observa, en el mecanismo se plantea la unión de la enzima a la sacarosa formando un intermediario enzima-sacarosa, que después de liberar a la glucosa da origen al complejo enzima-fructosa. A partir de este último, la fructosa es transferida a la cadena de levana aumentando así en un residuo el tamaño del polímero. Nótese que el aceptor y el producto son prácticamente el mismo compuesto, solo que el producto es un residuo fructosilo más grande.

Existen algunas explicaciones para la formación del enlace covalente entre la enzima y la fructosa. La primera es desde el punto de vista de la estereoquímica, planteando que este enlace ayuda a la inversión intermedia de la configuración y así poder retenerla en el producto. Por otro lado, este intermediario provee probablemente una función catalítica, ya que el grupo carboxilo del aspártico actúa como mejor grupo atrayente que el agua (u otro aceptor) y mejor grupo liberador de la glucosa. Desde el punto de vista químico, se sabe que un grupo carboxilo desprotonado es mejor nucleófilo que el agua y que un enlace éster glicosídico es más reactivo que el glicosídico de la sacarosa.

Para la inulosacarasa no se ha propuesto un mecanismo de reacción, ya que existen pocos reportes acerca de estas enzimas, de las cuales aún se desconocen sus propiedades cinéticas.

1.2.5 Estructura

La estructura cristalográfica de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* ha sido resuelta recientemente por Meng y Fütterer 2003, quienes lograron la cristalización de la enzima con y sin sustrato, a una resolución de 1.5 y 2.1 Å respectivamente. Los autores reportaron que la estructura secundaria basada en la superposición de la levansacarasa (LS) con la α -L-arabinanasa A43 de *Cellvibrio japonicus* (Arb43A), indica una relación cercana entre la familia 68 y la 43 de las glicosil-hidrolasas. Se plantea que lo anterior, asociado a que dichas familias mostraron regiones conservadas, sugiere que provienen de un ancestro común.

Meng y Fütterer (2003), reportan que el dominio sencillo de la LS exhibe el plegamiento de una β -propela de 5 hojas con la topología clásica de "W", formada por cuatro hebras β antiparalelas, esta estructura encierra una cavidad central en "forma de embudo" (Fig. 1.5).

Del análisis la estructura se desprende que la LS no exhibe el "velcro molecular" típico de las β -propelas, es decir, la estructura no se cierra por la unión de ambos extremos en la misma hoja β . La explicación de los autores a la ausencia del velcro molecular radica en que la LS es una enzima extracelular, por lo que necesita desplegarse parcialmente para ser exportada. Dicho mecanismo implica la liberación del N-terminal que permita la estabilización reversible de la β -propela.

Respecto al sitio activo, el complejo estructural enzima-sacarosa les permitió ubicar a los probables residuos involucrados en el mecanismo molecular de reacción propuesto por Chambert y Gonzy-Treboul (1974).

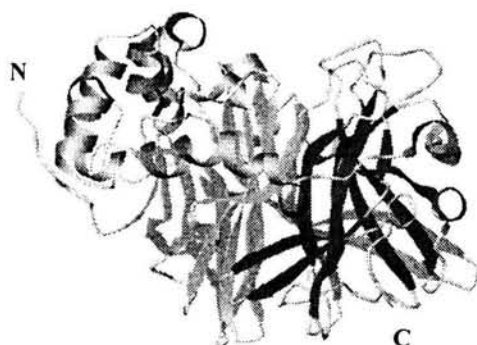


Fig. 1.5 Estructura tridimensional de la levansacarasa de *Bacillus subtilis*

La estructura cristalográfica sugiere que el aspártico 86 y el glutámico 342 son los residuos involucrados en el mecanismo catalítico que conlleva al rompimiento del enlace glicosídico de la sacarosa. Respecto al otro residuo aspártico (Asp247) que se encuentra cercano al sitio activo, se concluye que aún cuando interviene en la catálisis no se encuentra relacionado con el mecanismo químico de la reacción. Las deducciones previas derivan del análisis de las distancias entre los tres residuos de aminoácidos y los átomos de la molécula de sacarosa implicados en el mecanismo propuesto, así como de las mutaciones individuales de estos tres aminoácidos por alanina.

Como se observa en la figura 1.6, el grupo carboxilato del Asp86 se encuentra a 3.4 Å del C2 anomérico del residuo fructosilo y el oxígeno del enlace glicosídico se localiza a 2.5 Å del Glu342. Sin embargo, el Asp247 se ubica a más de 4.5 Å del C2 de la fructosa, y aún cuando forma puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo 3 y 4 de dicha molécula, se infiere que el aspártico relacionado directamente con el mecanismo molecular es el Asp86. Después de la hidrólisis de la sacarosa, el fructosilo terminal del aceptor podría ocupar el sitio dejado por la glucosa y su grupo 6'-hidroxilo estaría en condiciones de ser activado por el Glu 342, para realizar un ataque nucleofílico sobre el enlace covalente enzima-fructosilo.

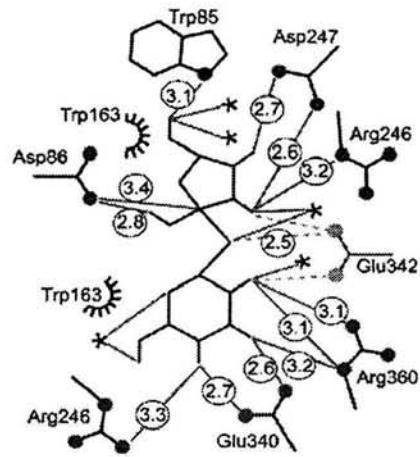


Figura 1.6 Distancias y contactos entre la enzima y la sacarosa basados en la estructura cristalográfica de la levansacarasa enlazada al sustrato (Meng y Fütterer, 2003).

1.3 Inulosacararas bacterianas

Existen pocos reportes acerca de inulosacararas (IS) bacterianas y poco se conoce acerca de sus propiedades cinéticas y mecanismos de reacción.

En 1974, Rossel y col., reportan en *Streptococcus mutans* una IS extracelular con un peso molecular de 86 kDa y se ha determinado que el polisacárido está implicado en la adhesión de la bacteria a la superficie de los dientes (Rozen y col., 2001).

Wada T. y col. 2003, reportan en *Bacillus sp* una IS de 45 kDa que produce un polímero de inulina con un DP de 10-30 unidades, y el fructooligosacárido 1-Kestosa en concentraciones muy bajas, esta enzima no produce inulina de alto grado de polimerización y tampoco realiza reacciones de aceptor.

Van Hijum (2002), reporta en *Lactobacillus reuteri* una IS de 86 kDa, en este caso la enzima se encuentra asociada a células, produce inulina de alto peso molecular y fructooligosacáridos 1-Kestosa y Nystosa. Van Hijum y col, 2002 aislaron el gen de la IS de *L. reuteri* y lo expresaron en *E. coli*; así mismo realizaron dos construcciones, una con el gen completo (InuHis) y otra en la cual deletaron 100 aminoácidos del carboxilo terminal (Inu Δ 699His). La síntesis de FOS se detectó en el sobrenadante del medio de cultivo, sin embargo la síntesis de inulina solo se observó en la enzima recombinante y no en la cepa 121 de *L. reuteri*. Una explicación de los autores es que la enzima Inu solo sintetiza FOS debido a las condiciones experimentales en el hospedero natural ó, que el polímero de inulina es degradado antes de ser colectado. Los autores concluyen que la delección en el C-terminal no afecta la formación de productos, ya que en ambas recombinantes se sintetiza un polímero de alto peso molecular y 1- kestosa.

Recientemente Van Hijum, Maarel y Dijkhuizen, 2003 reportaron las propiedades cinéticas de la enzima Inu Δ 699His, en la cual describen la cinética de la reacción de transferencia por la ecuación de Hill y en la reacción de hidrólisis muestran una inhibición por sustrato. Además reportan el incremento de la actividad IS (127 %) al adicionar cloruro de calcio al medio de reacción.

1.3.1 Inulosacarasa de *Leuconostoc citreum*

Olivares I. y col. 2002, reportan la actividad de una inulosacarasa en *Leuconostoc citreum* CW28. La enzima se encuentra asociada a células y presenta un peso molecular de 165 KDa, el mas alto reportado para las FTF's. La caracterización físico-química de la enzima muestra que la actividad óptima es a 30°C y pH 6.5. Olivares y col. 2003, reportaron el aislamiento del gen *is/A*, que en el análisis de la secuencia nucleotídica muestra grandes similitudes con las GTF's y las FTF's. Debido a la similitud de la secuencia del gen *is/A* con ambos grupos de enzimas es necesario resaltar algunas características de GTF's y FTF's importantes para entender la estructura de la IS de *L. citreum*.

Las glucosiltransferasas (GTF's) transfieren un residuo de glucosa a partir de la sacarosa hacía un polímero en crecimiento llamado glucano, liberando fructosa al medio de reacción. Las GTF's de *L. mesenteroides* y de algunas especies de *Sptreptococcus* presentan pesos moleculares elevados de entre 150 y 200 KDa (Remaud-Simeón y col., 2000). A partir del análisis de la estructura primaria de estas enzimas se observa que las GTF's están organizadas en multidominios (Fig. 1.7). Se han identificado cuatro regiones : un péptido señal, un dominio variable en la región N-terminal, seguido de un dominio catalítico y en la región C-terminal un dominio denominado de unión a glucano (GBD) (Jacques, 1995).



Fig. 1.7 Representación esquemática de las glucosiltransferasas. Se identificaron cuatro dominios estructurales, un péptido señal, un dominio variable, un dominio catalítico y un dominio de unión a glucano.

Por otro lado las FTF's bacterianas secuenciadas a la fecha muestran en sus estructuras primarias altas similitudes entre ellas. Aunque las enzimas provenientes de microorganismos Gram positivos son más similares entre ellas que las de Gram negativos (Pons y col., 2000). Los pesos moleculares reportados para estas enzimas son del orden de los 50-80 KDa, a diferencia de las glucosiltransferasas estas enzimas no presentan dominios estructurales.

La inulosacarasa (IS) de *L. citreum* es una FTF que es considerada una quimera natural ya que exhibe características de GTF's Y FTF's (Fig. 1.8), por lo que fue posible identificar tres dominios; un dominio catalítico que abarca la secuencia completa de algunas FTF's y dos dominios homólogos a los dominios variables y de unión a polímero de la alternansacarasa (ASR) de *L. mesenteroides*. Su naturaleza quimérica explica el alto peso molecular de la IS (165 KDa). En este contexto la IS puede ser una alternansacarasa en la cual el dominio catalítico fue reemplazado con una FTF completa ó bien se trata de una FTF que se adicionó naturalmente los dominios N y C-terminal de la alternansacarasa (Olivares I. y col. 2003).

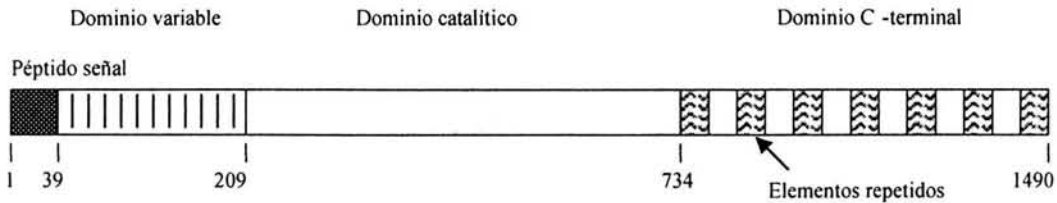


Fig. 1.8 Representación esquemática de la inulosacarasa de *L. citreum*. Se identificarán cuatro dominios estructurales, un péptido señal, 2 dominios variables (N y C terminal) que presentan alta identidad con la ASR de *L. mesenteroides* y un dominio catalítico común entre FTF's.

Olivares I y col. 2003 expresaron heterológamente el gen *isIA* y dos formas truncadas en *E. coli*. En una primera construcción se deletó la región del gen que presenta alta identidad con la alternansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 y en la segunda se deletó totalmente el C-terminal, esto para tratar de explicar la función del C-terminal en esta fructosiltransferasa (Fig. 1.9)

Se encontró que ambas versiones del gen producen polímeros de inulina, sin embargo, la estabilidad térmica de la enzima se ve afectada ya que las versiones truncadas disminuyeron su vida media a 40°C y aumentaron la relación hidrólisis-transferencia por lo que los autores concluyen que la presencia de dominios adicionales incrementa la estabilidad y reduce la actividad hidrolítica, favoreciendo así la síntesis de inulina.

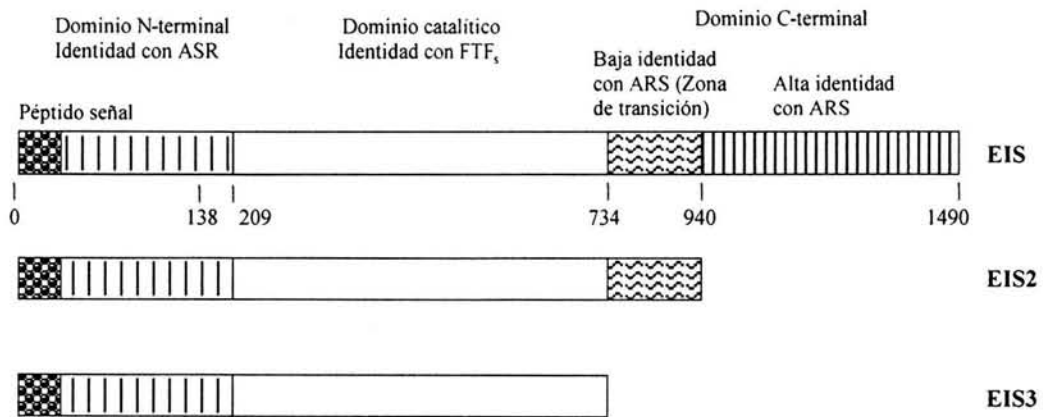


Fig. 1.9 Representación esquemática de la IS de *L. citreum* y sus formas truncadas. EIS1 (la enzima completa), EIS2 (delección parcial del dominio C-terminal) y EIS3 (delección total del dominio C-terminal).

Debido a la baja expresión de estas enzimas (con su propio promotor) es necesario sobreexpresarlas para realizar estudios mas profundos, ya que existen pocos reportes acerca de estas enzimas, así como de sus propiedades cinéticas.

OBJETIVO GENERAL

Sobreexpresar, purificar y caracterizar bioquímicamente la inulosacarasa recombinante de *Leuconostoc citreum* y dos formas truncadas del gen.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Subclonar el gen *isIA* de la inulosacarasa de *L. citreum* y la forma truncada del gen (E3) en un vector inducible.
- ❖ Sobreexpresar la inulosacarasa recombinante de *Leuconostoc citreum* y sus formas truncadas.
- ❖ Purificar las inulosacarasa recombinantes.
- ❖ Caracterizar bioquímicamente la inulosacarasa recombinante de *Leuconostoc citreum* y sus formas truncadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo.

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α , como hospedero de las construcciones realizadas, pBADE1 (el gen *islA* completo), pBADE2 (delección parcial del C-terminal) y pBAD3 (delección total del C-terminal) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Cepas utilizadas

Construcción	Cepa
pBADE1	EISR1
pBADE2	EISR2
pBADE3	EISR3

Las cepas fueron cultivadas en el medio Luria Bertani (LB).

Medio de Cultivo LB

Reactivos	Concentración g/l
Extracto de levadura	5
Peptona de Caseína	10
Cloruro de Sodio	10

El medio LB fue suplementado con 15 g/l de agar para preparar medio sólido; como presión selectiva de los cultivos se utilizaron 100 μ g de ampicilina/ml de medio de cultivo.

Se utilizó el medio SOC para la recuperación de las células después de la electroporación.

Medio de recuperación SOC

Reactivo	Concentración g/L
Extracto de levadura	5
Triptona	20
Cloruro de sodio	0.5

Se adicionan al medio de cultivo: glucosa 2 M, cloruro de potasio 0.25 M, cloruro de magnesio 2 M.

2.2 Manipulación del DNA

2.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para obtener la amplificación de los fragmentos de ADN, por medio de PCR, se utilizó la enzima Elongase Enzyme Mix (Invitrogen) que deja una A necesaria para la reacción de topoisomerización. Para las reacciones de PCR en colonia se utilizó la enzima Vent DNA polymerase (New England BioLabs).

En general las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 20 μ l con 10 μ M de dntp's, 0.5X de amortiguador A y B (enzima Elongase) y 1X de amortiguador (enzima Vent), 20pM de oligonucleótidos y agua hasta alcanzar el volumen deseado.

Los oligonucleótidos utilizados en el presente estudio fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología, UNAM y se listan en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Oligo	Secuencia (5' a 3')	Longitud
IS directo	AAGCAACAAGAAAGCATGGCTCGAAAAAAC	31amero
SP directo	ACCATGGACGTGAATCAACCACTTTTAGCG	30amero
IS1 reverso	AGCTTGCAAAGCACGCTTATCAATCCA	27amero
IS3 reverso	CTATAGAGTGATCATCATCTCCCAAACCC	30amero

Las reacciones se realizaron en un aparato RoboCycler Gradient 96 Stratagene. Los ciclos de amplificación del DNA se llevaron a cabo de acuerdo con la enzima que se utilizó, la T_m de los oligonucleótidos utilizados en cada caso y el tamaño de los fragmentos a amplificar (Tabla 2.3).

Tabla 2.3 Pasos para la amplificación de los fragmentos de ADN

N. de ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	desnaturalización	30 seg.	94°C
35	desnaturalización	15 seg.	94°C
	alineamiento extensión	1 min. variable ^b	variable ^a 68 ó 72°C
1	extensión final	10 min	68 ó 72°C

Variable^a : depende de la T_m de los oligonucleótidos utilizados

Variable^b : depende del tamaño del fragmento a amplificar.

Para analizar los productos obtenidos en las PCRs, se corrieron 5 µl de cada producto en geles de agarosa al 0.8%.

2.2.2 Subclonación del gen *isIA* y una versión truncada (E3)

Para la subclonación del gen *isIA* se amplificaron dos fragmentos, uno de 4900 pb, utilizando los oligos SP directo e IS1 reverso y otro fragmento de 2300 pb utilizando los oligos IS directo e IS3 reverso. En ambos casos se utilizó como templado el plásmido pCRISE1 que contiene el gen completo bajo su propio promotor. Los productos de PCR se clonaron en el vector pBAD/TOPO utilizando el pBAD-TOPO Thio fusion Expresión Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El vector pBAD-TOPO es un sistema de expresión, el cual posee un promotor fuerte inducido con arabinosa, una proteína de fusión (Tiorredoxina) que facilita el transporte de las proteínas al espacio periplásmico de la célula y deja una etiqueta de histidina que puede facilitar la purificación de las proteínas recombinantes.

La cepa de *Escherichia coli* DH5 α fue transformada con los plásmidos obtenidos, por electroporación en un aparato Micropulser Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en las siguientes condiciones: 2.5kV, 25 μ F y 200 Ω .

Posterior a la electroporación se agregó 1 ml de medio SOC, las células se transfirieron a un tubo ependorf y fueron incubadas por una hora a 37°C y 250 rpm para su recuperación. Posteriormente se transfirieron a placas de medio LB sólido suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina.

2.2.3 Purificación y digestión de los plásmidos.

La purificación de los plásmidos que contienen las construcciones pBAD se realizaron con el "Kit Concert Rapid Plasmid Miniprep System" de Gibco BRL siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se incubaron reacciones de los plásmidos con enzimas de restricción para comprobar el patrón.

2.3 Expresión y producción de las inulosacarasa recombinantes.

2.3.1 Perfil de expresión

Se realizó el perfil de expresión de las inulosacarasa utilizando diferentes concentraciones de arabinosa (0.00002 %, 0.0002 %, 0.002 %, 0.02 % y 0.2 %) la cual es el inductor del sistema pBAD/TOPO Thiofusion, siguiendo el protocolo de la casa comercial.

2.3.2 Producción de la inulosacarasa recombinante y sus formas truncadas

Para la producción del inculo se realizaron fermentaciones en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo LB estéril a 37°C y 200 rpm, a partir de células de *E. coli* DH5 α (EIS's) almacenadas en glicerol. Posteriormente se inoculó una fermentación de 950 ml en un matraz Fernbach (2.8 L) a 23°C y 200 rpm, se adicionó al medio de cultivo ampicilina 100 μ g/ml y arabinosa como inductor (0.02% para EIS1 y EIS2, 0.2% para EIS3). Durante las fermentaciones se realizó el seguimiento del crecimiento celular midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650.

Para realizar las curvas de actividad se colectó una alícuota de 10 ml en cada medición de DO y se centrifugó hasta obtener la pastilla celular que se trató por sonicación para realizar la medición de la actividad enzimática y para la determinación de la cantidad de proteína.

Al final de la fermentación se recuperaron las células por centrifugación a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces con amortiguador de fosfatos de potasio 50mM, pH 6.5 y se resuspendieron en el mismo amortiguador.

2.4 Extracción de las enzimas

Para lograr la liberación de las enzimas se utilizó la prensa de French; ésta somete las células a un cambio de presión, produciendo una implosión que permite la liberación de las enzimas. Para la ruptura se resuspendió la pastilla celular en 10 ml de amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM a pH 6.5 y se utilizó la mini-cell con capacidad para 3 ml de volumen, aplicando una presión de 18000 psi.

Se centrifugó el volumen recuperado durante 10 min a 4°C y 10000 rpm para separar los restos celulares del sobrenadante (extracto) en el cual se determinó la actividad enzimática.

En volúmenes pequeños la extracción se realizó por sonicación. Las células se sonicaron manteniéndolas en un recipiente con hielo, utilizando un sonicador Bradson Sonifier 250, con 4 pulsos de 10 segundos e intervalos de 3 minutos entre cada pulso. Posteriormente se centrifugaron y se recuperó el sobrenadante.

2.5 Determinación de la actividad enzimática

El ensayo de la actividad inulosacarasa se realizó midiendo la liberación de azúcares reductores durante la reacción a 30°C., en presencia de 100g/L de sacarosa en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.5, se emplearon los extractos obtenidos después de la lisis celular y el poder reductor se determinó por el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) reportado por Summer y col., (1935). Una unidad de actividad enzimática se define como la liberación de un μmol de glucosa o fructosa por min^{-1} .

2.6 Cuantificación de Proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando el kit Bio-Rad (Hércules, CA) y albúmina sérica bovina (fracción V, SIGMA), como estándar. Se emplearon los extractos obtenidos a partir de las células sonicadas.

2.7 Electroforesis de proteínas

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Se utilizó una cámara Mighty small II, con geles de 1 mm de espesor, un gel concentrador al 4% y un gel de separación al 6%.

La preparación de las muestras consistió en la adición del amortiguador de carga (Tris-HCL 0.125M pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, β mercaptoetanol y azul de bromofenol 0.05%) posteriormente se concluyó la desnaturización de las proteínas incubando durante 5 minutos a 95°C.

La migración se efectuó a amperaje constante de 40 mA. Después de la migración se siguieron los siguientes tratamientos:

a) Tinción con azul de Coomassie

El gel se incubó en una solución de ácido acético (10% v/v) metanol (30% v/v) y azul de Coomassie (0.2% v/v) Posteriormente se realizaron lavados del gel en una solución de ácido acético (10% v/v), metanol (30% v/v) para eliminar el exceso de colorante.

b) Tinción con reactivo de Shift

Se lavó el gel tres veces 30 minutos en amortiguador de fosfatos pH 6.5 con tween 80 (1% v/v) a temperatura ambiente. En seguida se incubó en amortiguador de fosfatos con sacarosa 100g/L durante toda la noche a temperatura ambiente. La aparición de bandas blancas corresponde a la síntesis de polímero producido por la enzima. El polímero se fijó incubando el gel 30 minutos en etanol al 75% v/v, posteriormente 1 hora en una solución de ácido periódico 0.7% p/v y ácido acético 5% v/v . Se realizaron 3 lavados de 20 minutos con una solución de bisulfito de sodio 0.2% m/v y ácido acético 5% v/v. Finalmente se puso en contacto el gel con el reactivo de Shift hasta la aparición de color rosado.

2.8 Purificación

2.8.1 Purificación por afinidad en columnas de níquel

Para realizar la purificación de las proteínas se utilizó un equipo *AKTA prime* y columnas His Trap Chelating HP de 1 ml (Amersham Pharmacia Biotech, siguiendo el protocolo "His-tagged Protein Purification" de *AKTA prime with HiTrap*, Amersham Pharmacia Biotech)

Se obtuvieron los extractos proteicos como se describió anteriormente. La columna se lavó con 5 ml de agua, posteriormente se cargó con iones Ni^{2+}

haciéndole pasar 5 ml de una solución de sulfato de níquel 100 mM, se eliminó el exceso de iones níquel lavando la columna con 5 ml de agua y se equilibro con 5 ml de una solución 50 mM de fosfato de sodio, 0.5 M de Na Cl, pH 7.4.

Se cargo la muestra en la columna, uniéndose selectivamente a los iones Ni^{2+} aquellas proteínas que contienen histidinas expuestas en su superficie, posteriormente se lavó la columna con 5 ml de amortiguador de equilibrio y finalmente se eluyeron las proteínas His^+ con un gradiente de imidazol de 0 a 0.5 Molar.

2.8.2 Purificación por afinidad en columnas de níquel bajo condiciones desnaturalizantes.

Se utilizaron 0.85g de proteína total en el extracto enzimático, diluído en 1.5 ml de cloruro de guanidina (6 M) y se mantuvo en agitación rotatoria durante una hora. Las muestras se aplicaron en la columna His Trap Chelating HP de 1 ml previamente equilibrada con 10 ml de amortiguador 20mM Tris-HCl 0.5 M NaCl 5mM imidazol, 1mM mercaptoetanol, 6 M de hidrocloreuro de guanidina, pH 7.4.

Después de aplicar la muestra la columna se lavó con 10 ml de un amortiguador 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM de imidazol, 1 mM de mercaptoetanol, 6 M de urea pH 7.4.

Finalmente las proteínas His^+ se pliegan y eluyen con un gradiente lineal de urea de 6- 0 M e imidazol 0-0.5M (20mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazol, 1mM mercaptoetanol)

2.8.3 *Western Blot*

Se realizó una electroforesis de las proteínas como se mencionó anteriormente y se transfirieron a una membrana inmobilin-NC (Millipore) durante 1 hora a 130mA en amortiguador CAPS 1X (100mM) empleando el módulo de transferencia Mini Trans-Blot, dentro del sistema Mini PROTEAN 3 (BIORAD).

Después de la transferencia se sumergió la membrana en rojo de Ponceau para verificar la transferencia de proteínas a la membrana. Se incubó durante una hora en solución bloqueadora (PBS/0.1% tween20 y 5% de leche Carnation). Se realizaron 3 lavados con amortiguador de PBS durante 5 minutos.

Posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-His (C-term) de Invitrogen en una dilución 1:5000 durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados de 5 min con amortiguador PBS y se incubó con el anticuerpo antiratón conjugado a-peroxidasa diluído en PBS 1X-0.1 % twen 20, se realizaron nuevamente 3 lavados de 5 minutos con amortiguador PBS/0.1% tween20.

La detección de las proteínas se realizó con el sustrato para peroxidasa, Western Ligthninh, según las instrucciones del proveedor (Perkin Elmer) exponiendo la película hipersensible X- Omat (Kodak)

2.9 Determinación de las constantes cinéticas

Para determinar las constantes cinéticas de las inulosacararas recombinantes se realizaron reacciones a 30°C con diferentes concentraciones de sacarosa (29.2, 146.19, 292.39, 438.59, 584.79, 730.99 mM) . Las velocidades iniciales de la reacción se midieron mediante la liberación de azúcares reductores en amortiguador de fosfatos 50mM pH 6.5, midiendo glucosa y fructosa por HPLC en un equipo marca Waters, con un detector de índice de refracción (IR,410 Waters) y una columna aminada para análisis de carbohidratos (4.6x250mm) a 35°C. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/agua en relación 75:25%, con flujo 1 ml/min.

Las muestras inyectadas fueron filtradas previamente para retirar el polímero en filtros ACRODISC GHP 13 mm x 0.45 µm.

Dado que la enzima puede catalizar la transferencia del residuo fructosilo al agua o al polímero, la actividad se caracterizó de la siguiente manera: la fructosa de la sacarosa puede encontrarse libre después de la reacción (hidrólisis) ó haber sido transferida al polímero (transferencia), mientras que la glucosa es liberada como producto de ambas reacciones. La velocidad de aparición de la glucosa corresponde la actividad total. La fructosa transferida al polímero se obtiene por diferencia de la glucosa libre menos la fructosa libre y a partir del cambio en estas concentraciones puede determinarse la actividad correspondiente a hidrólisis o transferencia.

Según lo antes expuesto:

$$[\text{Sacarosa total}] - \text{-----} [\text{glucosa libre}] + [\text{fructosa libre}] + [\text{inulina}]$$

$$\text{Glucosa} = \text{Actividad total} \quad \frac{d[G]}{dt}$$

$$\begin{aligned} \text{Fructosa libre} = & \quad \frac{d[F]}{dt} \\ \text{Transferencia al agua} & \\ \text{(Hidrólisis)} & \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Transferencia} = & \quad \frac{d[T]}{dt} = \frac{d[G]}{dt} - \frac{d[F]}{dt} \\ \text{Glucosa - Hidrólisis} & \end{aligned}$$

Las constantes cinéticas se obtuvieron mediante la regresión lineal empleando el método de Lineweaver-Burk.

2.10 Determinación de la proporción hidrólisis-transferencia

Se analizó la especificidad enzimática hacia la hidrólisis y transferencia de las enzimas recombinantes, incubándolas a 30°C con diferentes concentraciones de sustrato (mM sacarosa). Las concentraciones de glucosa y fructosa se cuantificaron a diferentes tiempos, por HPLC, bajo las condiciones antes mencionadas. La especificidad de la reacción se determinó de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Hidrólisis} = \frac{\text{Fructosa total libre} * 100}{\text{Glucosa total libre}}$$

$$\% \text{ Transferencia} = \frac{\text{Glucosa total} - \text{Fructosa total} * 100}{\text{Glucosa total}} = 100 - \% \text{ Hidrólisis}$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Subclonación del gen *is/A* y la forma E3 en el vector pBAD Thio/TOPO.

Con la finalidad de aumentar la producción de las enzimas, se realizó la subclonación del gen *is/A* y las versiones truncadas en el vector pBAD Thio/TOPO, que posee un promotor inducible con arabinosa y deja una etiqueta de histidina para facilitar la purificación de las proteínas.

En un trabajo previo se realizó la clonación de la enzima EIS2 (delección parcial del C-terminal) en este sistema, sin embargo aún quedaba pendiente la clonación de las enzimas EIS1 (gen completo) y EIS3 (delección total de C-terminal). Para realizar las construcciones se utilizó como templado el plásmido pCRISE1, que contiene el gen *is/A* con su región promotora. En la construcción E1 se utilizaron los oligos SP directo e IS reverso, con los cuales se amplificó un fragmento de 4900 pb. Para la construcción E3 se utilizaron los oligos IS directo e IS3 reverso, con los que se amplificó un fragmento de 2300 pb (Fig. 3.1) ambos fragmentos carecen de la región promotora del gen. Los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector pBAD Thio/TOPO, resultando los plásmidos pBADE1 y pBADE3, con los cuales se transformó la cepa de *E. coli* DH5 α .

La selección de clonas positivas se realizó por PCR en colonia; de las clonas positivas se purificaron los plásmidos correspondientes y se verificaron los patrones de restricción (datos no mostrados).

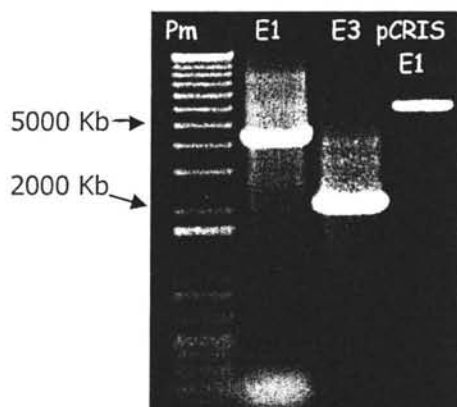


Fig. 3.1 Fragmentos amplificados por PCR. Carril 1 marcador de peso molecular 1 Kb, carril 2 fragmento E1 de 4900 pb aprox. (gen completo), carril 3 fragmento E3 de 2300 pb aprox. (gen sin el dominio C-terminal), carril 4 plásmido pCRIS que fue utilizado como templado para las amplificaciones del gen *is/A*.

Para comprobar la actividad de las enzimas se midió la producción de azúcares reductores en los extractos obtenidos a partir de las células sonicadas; además de la síntesis de polímero *in situ* por medio de zimogramas incubados con sacarosa (Fig. 3.2)

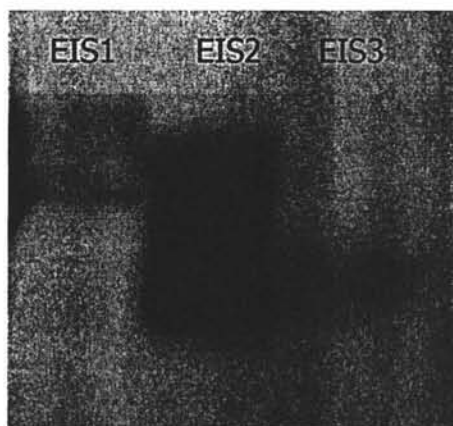


Fig. 3.2 Zimograma incubado con sacarosa. Se detectó la síntesis de polímero *in situ* con las tres formas enzimáticas. EIS1 (enzima IS de *L. citreum*), EIS2 (enzima IS de *L. citreum* que contiene una delección de 550 aminoácidos en el extremo C-terminal), EIS3 (enzima IS de *L. citreum*, que contiene una delección de 756 aminoácidos en el extremo C-terminal).

Finalmente, el inserto de las construcciones resultantes fue secuenciado. Estas secuencias fueron comparadas con el gen *isIA*, confirmando que el inserto clonado corresponde a la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum*.

3.2 Producción de las inulosacarosas recombinantes

3.2.1 Expresión óptima de las EIS's

Con el objetivo de determinar las condiciones de máxima expresión de las tres versiones de la inulosacarasa, se realizaron fermentaciones utilizando arabinosa como inductor. Se probaron cinco concentraciones de inductor para cada cepa (como se describe en materiales y métodos).

Como se puede observar en la tabla 3.1 la máxima expresión de las enzimas EIS1 y EIS2 se obtuvo con una concentración de 0.02% de arabinosa y en el caso de la enzima EIS3 con 0.2% de arabinosa.

En la Fig. 3.3 se muestran los geles de SDS poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie, en donde se corroboraron los resultados antes mencionados al observar bandas más intensas en los extractos donde se detectó mayor actividad enzimática.

Tabla 3.1 Expresión óptima de las inulosacarosas recombinantes.

Inductor	EIS1	EIS2	EIS3
Arabinosa %	U/ml	U/ml	U/ml
0.2	0.5	0.5	0.7
0.02	0.63	0.54	0.5
0.002	0.024	0.14	0.45
0.0002	0.014	0.11	0.28
0.00002	n/d	n/d	0.13

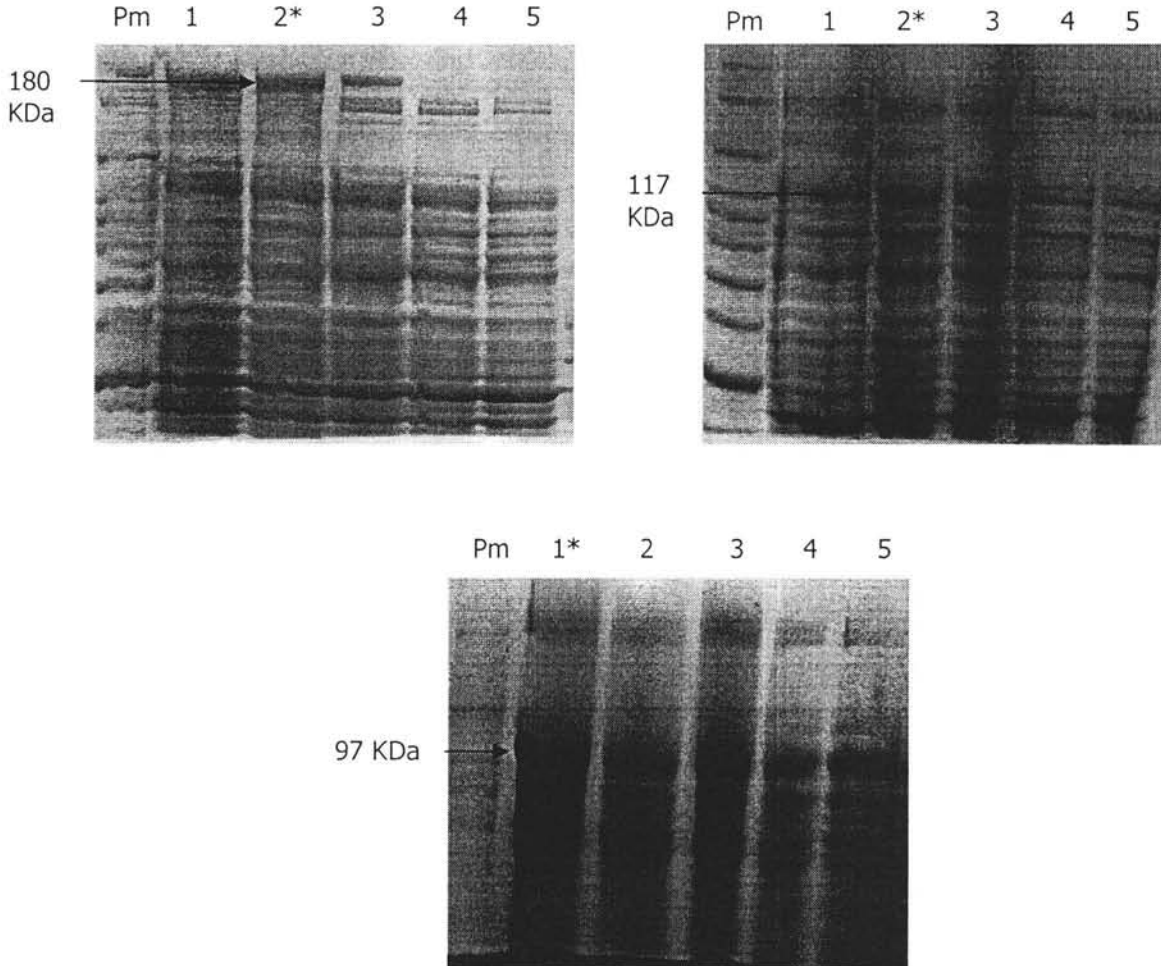


Fig. 3.3 Geles de SDS teñidos con azul de Coomassie. Carril 1 marcador pm (Bench mark, Invitrogen, 40-200 KDa) 0.2% arabinosa, carril 3 0.02% arabinosa, carril 4 0.002% arabinosa, carril 5 0.0002% arabinosa y carril 6 0.00002% de arabinosa. El asterisco indica la concentración en la cual se expresó mejor la proteína. (El peso molecular de las enzimas aumentó 15 KDa, correspondientes a la proteína de fusión Tiorredoxina incluida en el vector. Los pesos moleculares de las enzimas EIS1, EIS2 y EIS3 son 180, 117 y 97 KDa respectivamente).

3.2.2 Efecto de la temperatura en la producción de las EIS's

Una vez conocidas las concentraciones de arabinosa óptimas para la expresión de las EIS's (inulosacarosas recombinantes) se procedió a determinar la temperatura mas apropiada para producir las enzimas, para lo cual se realizaron fermentaciones a dos temperaturas de crecimiento: 37°C y 23°C. Se iniciaron las fermentaciones a 37°C y se adicionó el inductor cuando el cultivo alcanzó una DO = 0.5, incubando las células 4 horas más, como lo indica el protocolo. A esta temperatura se observó mayor actividad enzimática en los restos celulares (60%) que en el extracto celular (40%); ésto podría deberse a la formación de cuerpos de inclusión.

Villaverde y Mar Carrió 2003, reportaron la formación de cuerpos de inclusión, debido a la sobreproducción de proteínas recombinantes en *E. coli*.

Para evitar la probable formación de cuerpos de inclusión y obtener las enzimas solubles se redujo la temperatura de crecimiento a 23°C; al disminuir la temperatura el crecimiento celular es más lento, por lo que se realizó nuevamente el perfil de inducción para determinar si la temperatura modificaba la expresión de las proteínas. Se obtuvieron los mismos resultados a ambas temperaturas, lo cual significa que la concentración óptima de inductor no se modifica en función de la temperatura. Además, se observaron resultados similares al agregar el inductor al inicio de la fermentación ó al alcanzar una DO = 0.5 por lo que el inductor se adicionó al inocular el medio de cultivo. Bajo estas condiciones se lograron obtener las enzimas solubles, ya que el 80% de la actividad se encontró en la fracción soluble de los extractos enzimáticos y solo el 20% en los restos celulares. Probablemente la expresión de las proteínas es más lenta y permite a las enzimas plegarse adecuadamente, favoreciendo que se mantengan solubles.

Por otro lado Ortiz S. 2004, reporta que a 20°C se reduce la proteólisis de la enzima nativa y se favorece la actividad enzimática. Probablemente en el caso de las enzimas recombinantes, el trabajar a 23°C además de favorecer el plegamiento correcto de las proteínas, podría reducirse la proteólisis de las enzimas (en la figura 3.2 se observan bandas activas mas pequeñas que la banda principal en las enzimas EIS1 y EIS2 lo que indica que estas enzimas se proteolizan).

Las tres versiones de la inulosacarasa presentaron el mismo comportamiento a 37 y 23°C, por lo que se seleccionó como mejor temperatura de crecimiento para las tres cepas 23°C.

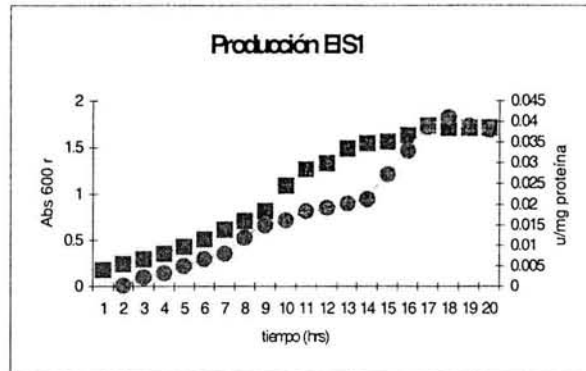
3.2.3 Cinéticas de producción de las EIS's

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de las cepas en las condiciones establecidas y así determinar el momento en el cual detener el crecimiento del microorganismo, se realizaron fermentaciones de las cepas productoras de las diferentes versiones de la inulosacarasa. Se siguió el crecimiento celular midiendo densidad óptica a 600 nm. Además se determinó la actividad enzimática y la proteína total.

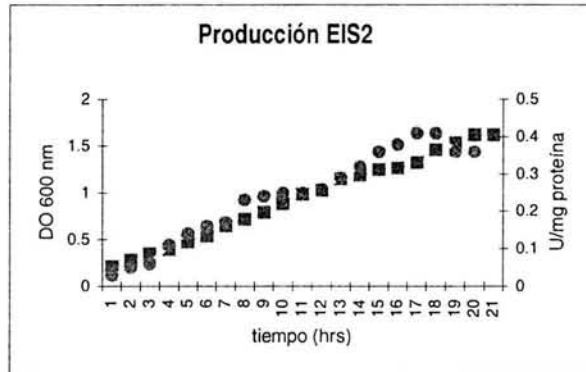
En la figura 3.4 se muestra la evolución de los cultivos, en donde se observa que la actividad enzimática esta asociada al crecimiento celular en todas las cepas y al final de la fermentación la actividad decae probablemente debido a la producción de metabolitos secundarios tóxicos o enzimas degradativas como proteasas.

Curvas de crecimiento y actividad enzimática.

a)



b)



c)

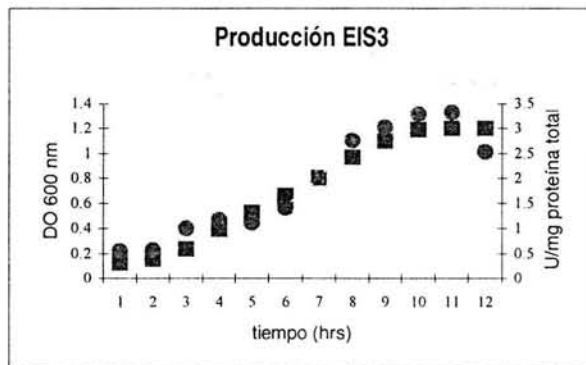


Fig. 3.4 Curvas de crecimiento a) EISR1, b) EISR2, c) EISR3. Producción de las inulosacarinas recombinantes D.O ■ U/mg proteína ●. Nótese que la actividad enzimática está asociada al crecimiento celular. Las cepas EISR1 y EISR2 alcanzan su actividad máxima alrededor de las 20 hrs, mientras que la cepa EISR3 la alcanza a las 11 hrs.

Con base en estos resultados se determinó que el mejor momento para detener las fermentaciones de EISR1 y EISR2 es alrededor de las 19-20 horas, mientras que de EISR3 es entre las 10-11 horas de crecimiento, cuando se ha alcanzado una DO de 1.2 a 1.7.

Es importante mencionar que bajo las condiciones que se realizaron las fermentaciones las velocidades específicas de crecimiento (μ) de cada cepa fueron diferentes entre ellas (Tabla 3.2). La cepa EISR3 presenta una μ del doble y triple de EISR1 y EISR2 respectivamente. Al realizar estas fermentaciones sin inductor, las cepas EISR1 y EISR2 presentaron una μ de 0.2775 y 0.295 h^{-1} respectivamente y un tiempo de duplicación de 2.5 y 3 horas respectivamente, mientras que para la cepa EISR3 la μ fue de 0.4537 h^{-1} y el tiempo de duplicación 1.5 horas. La diferencia entre la μ de las cepas sin inductor podría deberse a la replicación de los plásmidos, esto debido a que los plásmidos de las cepas EISR1 y EISR2 contienen más pb que el de la cepa EISR3.

Tabla 3.2 Velocidades específicas de crecimiento

Cepa	μ (h^{-1})	Td (h)
EISR1	0.1843	3.76
EISR2	0.1466	4.72
EISR3	0.4621	1.5

Con base en estos resultados, se concluye que la cepa EISR3 crece más rápido en comparación con las cepas EISR1 y EISR2, además de que no se afecta su velocidad de crecimiento al producir la proteína EIS3. En cambio las cepas EISR1 y EISR2 crecen más lento probablemente debido a la carga metabólica generada por la síntesis de proteínas de mayor peso molecular.

Por otro lado como se muestra en la tabla 3.3 se incrementó la producción de la enzima EIS1 2.7, EIS2 25.62 y para EIS3 107.41 veces, con respecto a los datos obtenidos con las enzimas recombinantes bajo su propio promotor (Olivares y col. 2003).

Con los resultados obtenidos se logró uno de los objetivos de este trabajo que consistía en sobreexpresar las enzimas, ya que hubo un incremento importante en su producción, con respecto a las cepas pCRIS que se encuentran bajo su propio promotor.

Tabla 3.3 Sobreexpresión de las EIS's. Incremento de la actividad en el vector pBAD con respecto al vector pCRIS.

Sistema de expresión	EIS1 U/mg	EIS2 U/mg	EIS3 U/mg	Referencia
pCRIS	0.015	0.016	0.031	Olivares 2003
pBAD	0.041	0.41	3.03	Este trabajo
Incremento	2.7 veces	25.6 veces	107.4 veces	

3.2.4 Extracción de las enzimas

Para liberar las enzimas de las células, se evaluarón tres métodos: extracción por choque osmótico, ruptura celular por sonicación y ruptura celular por implosión utilizando la prensa de French.

Se planteó choque osmótico partiendo de que la proteína podría encontrarse en el espacio periplásmico, transportada por la proteína de fusión Tiorredoxina (incluida en el vector de expresión). Para comprobar si la enzima se encontraba en este sitio, se incubaron células con sacarosa, dado que la membrana externa es permeable permite la entrada y salida de pequeñas moléculas como la sacarosa, fructosa y glucosa.

Después de la incubación de las células con sacarosa no se detectó la presencia de azúcares reductores lo que indica que las enzimas no se transportan al espacio periplásmico, por lo que no se aplicó el choque osmótico.

Mediante la sonicación de células la recuperación de las enzimas fue mínima, se observó actividad en el sobrenadante (70%) y en los restos celulares (30%) lo que sugería una lisis parcial. Al aumentar el tiempo de sonicación la actividad total disminuye, probablemente a causa de la desnaturalización de las proteínas.

En la prensa de French se realizó la lisis celular a dos presiones distintas, obteniendo mejores resultados aplicando una presión de 18.000 PSI. Con este método se logró obtener el 90% de la actividad enzimática en el extracto celular, por lo que la lisis mediante la prensa de French resulto ser más exitosa para lograr la liberación de las enzimas.

3.3 Purificación

3.3.1 *Purificación por afinidad en columnas de níquel.*

El vector en que se encuentran clonadas las diferentes enzimas deja una etiqueta de histidinas en el carboxilo terminal, lo que permite purificarlas al pasarlas por una columna His-Trap. Ninguna de las tres versiones de EIS se logró purificar por este método, ya que no se quedaron unidas a la resina. Se verificaron las construcciones de las enzimas EIS1, EIS2 y EIS3, por medio del análisis de las secuencias de aminoácidos, se determinó que dichas construcciones si poseen la etiqueta de histidinas. Para comprobarlo se realizó un Western-Blot con la enzima EIS2, utilizando el anticuerpo Anti-His (Fig. 3.5). El anticuerpo si detectó la marca, lo cual sugiere que tal vez éstas no se encuentran accesibles, probablemente debido al tipo de plegamiento que presentan estas enzimas el carboxilo terminal no se encuentra expuesto, lo cual impide la interacción de las histidinas con los iones níquel de la columna.

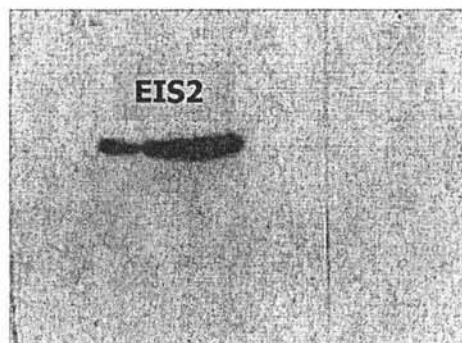


Fig 3.5 Western Blot de la enzima EIS2, revelado con radiactividad. El anticuerpo Anti-His detectó la marca de histidinas en la proteína, lo cual sugiere que las histidinas no se encuentran disponibles para interactuar con los iones níquel de la columna.

3.3.2 Purificación bajo condiciones desnaturalizantes.

Con el objetivo de lograr la exposición de la etiqueta de histidinas se realizó la purificación bajo condiciones desnaturalizantes, para lo cual se desnaturalizaron las proteínas con cloruro de guanidina y urea. No se detectó actividad en ninguna fracción de la elución, indicando que las proteínas no se habían pegado a la resina. De acuerdo a los resultados obtenidos se descartó la purificación de las enzimas por este método, ya que no se logró la retención de las proteínas por afinidad de las etiquetas de histidina con los iones de níquel.

Recientemente se publicó la caracterización cinética de la inulosacarasa de *Lactobacillus reuteri* (Van Hijum, 2003) en la cual no se encontró diferencia significativa en cuanto al comportamiento y constantes cinéticas de la enzima pura y en extracto.

Con base en este antecedente y debido a los problemas enfrentados en el proceso de purificación se decidió comenzar la caracterización bioquímica de las enzimas en extracto mientras se establece el protocolo de purificación, lo cual permitirá comparar ambos resultados y determinar si presentan diferencias o no, como el caso de la IS de *L. reuteri*.

3.4 Caracterización bioquímica

3.4.1 *Constantes cinéticas*

En la tabla 3.4 se muestran los valores de las constantes de Michaelis-Menten obtenidos para la reacción global; la enzima EIS1 muestra un valor de K_m similar al de la enzima nativa asociada a células y la enzima EIS2 al de la enzima solubilizada. En el caso de la enzima EIS3 el valor de K_m es muy elevado, lo que indica que al eliminar el dominio C-terminal la enzima pierde afinidad por su sustrato.

Tabla 3.4 Valores de las constantes de Michaelis-Menten obtenidos en la reacción global para la IS de *L. citreum*, la recombinante y sus formas truncadas.

Enzimas nativas	K_m
Asociada a células	66
Solubilizada	36
Enzimas recombinantes	
EIS1	60
EIS2	34
EIS3	376

Ortiz S. (2004) reporta que la diferencia entre la K_m de la enzima asociada a células y solubilizada radica en que el polímero sintetizado por la enzima asociada a células podría quedarse unido a la membrana, de modo que al sintetizar cierta cantidad de polímero se dificultaría el acceso de la sacarosa al sitio catalítico de la enzima, evento que no sucedería con la enzima solubilizada.

En el caso de las recombinantes probablemente las deleciones en el carboxilo terminal afectan la afinidad de la enzima por su sustrato. Así mismo el plegamiento de la enzima completa podría dificultar el acceso del sustrato al sitio activo y al eliminar una región del C- terminal éste podría quedar mas expuesto, lo que explicaría que la enzima EIS2 es mas afín al sustrato que la enzima EIS1. En el caso de la enzima EIS3 la afinidad se reduce considerablemente, esto se podría deber a una desestabilización estructural, ya que dicha enzima carece completamente del dominio carboxilo terminal.

La diferencia entre los valores de K_m en la enzima nativa solubilizada y la enzima recombinante EIS1, podría deberse a las condiciones presentes en el hospedero heterólogo, ya que se han reportado diferencias entre los productos sintetizados por las enzimas en el hospedero natural y en los hospederos heterólogos (Heyer y Wendenburg 2001, Van Hijum y col. 2002), lo que podría sugerir una modificación en el comportamiento cinético y en la afinidad de las enzimas por su sustrato.

Por otro lado, la reacción global es el resultado de la transferencia al agua (hidrólisis) y la transferencia al polímero, por lo que se determinaron las constantes cinéticas para cada reacción (Tabla 3.5).

Ortiz S. 2004, reporta los valores de las constantes de Michaelis-Menten para ambas reacciones en la enzima solubilizada. Para la reacción de hidrólisis reporta una K_m de 16 mM y para la de transferencia 91 mM.

En nuestro caso las tres enzimas recombinantes presentan un K_m menor para la reacción de hidrólisis que para la de transferencia, al igual que la enzima nativa, lo que muestra que las enzimas son mas afines para transferir el residuo fructosilo al agua que para transferirlo a la formación del polímero.

Tabla 3.5 Valores de las constantes de Michaelis-Menten obtenidos para la reacción de hidrólisis y transferencia en las diferentes formas de la inulosacarasa.

Enzima	Km (H)	Vmax (H)	Km (T)	Vmax (T)
EIS1	23.4	0.102	285.84	0.018
EIS2	11.48	0.45	2363.29	3.1
EIS3	269.32	0.155	350.84	0.31

En las recombinantes se observa que la Km de transferencia de la enzima completa y de la enzima truncada EIS3 son similares, mientras que el valor de Km para la enzima EIS2 es un orden de magnitud mayor que los valores correspondientes a EIS1 y EIS3. Esto indica que la afinidad de la enzima EIS2 para transferir el fructosilo disminuye considerablemente. Sin embargo, es importante mencionar que en el caso particular de esta enzima no fue posible llegar a la saturación por sustrato, aún a concentraciones elevadas (730 mM sacarosa) probablemente en este caso el comportamiento cinético no corresponde a un comportamiento Michaeliano (Fig. 3.6). Es probable que debido a la delección de 550 aminoácidos en la enzima EIS2, sitios importantes en la catálisis enzimática queden expuestos lo que podría modificar el comportamiento cinético de la enzima.

En la reacción de hidrólisis los valores de Km en las enzimas EIS1 y EIS2 son similares, mientras que para EIS3 el valor de Km es un orden de magnitud mayor con respecto a las otras dos enzimas, esto indica que la delección del carboxilo terminal también afecta la afinidad de la enzima por esta reacción.

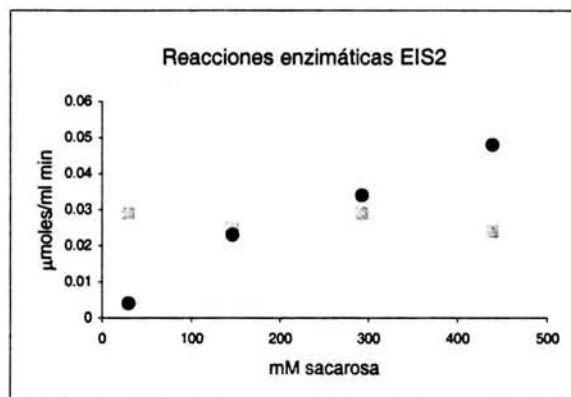


Fig. 3.6. Comportamiento cinético de la inulosacarasa E2. En la reacción de hidrólisis se observa una inhibición por sustrato, mientras que para la reacción de transferencia no fue posible llegar a la saturación por sustrato, lo cual sugiere que la enzima no sigue un comportamiento Michaeliano.

● Transferencia ■ Hidrólisis

3.4.2 Relación Hidrólisis-Transferencia

Aunque estas enzimas son mas eficientes para llevar a cabo la reacción de hidrólisis que la de transferencia, se logró dirigir la transferencia del residuo fructosilo hacia la síntesis del polímero modificando la concentración de sustrato. (Fig. 3.7.)

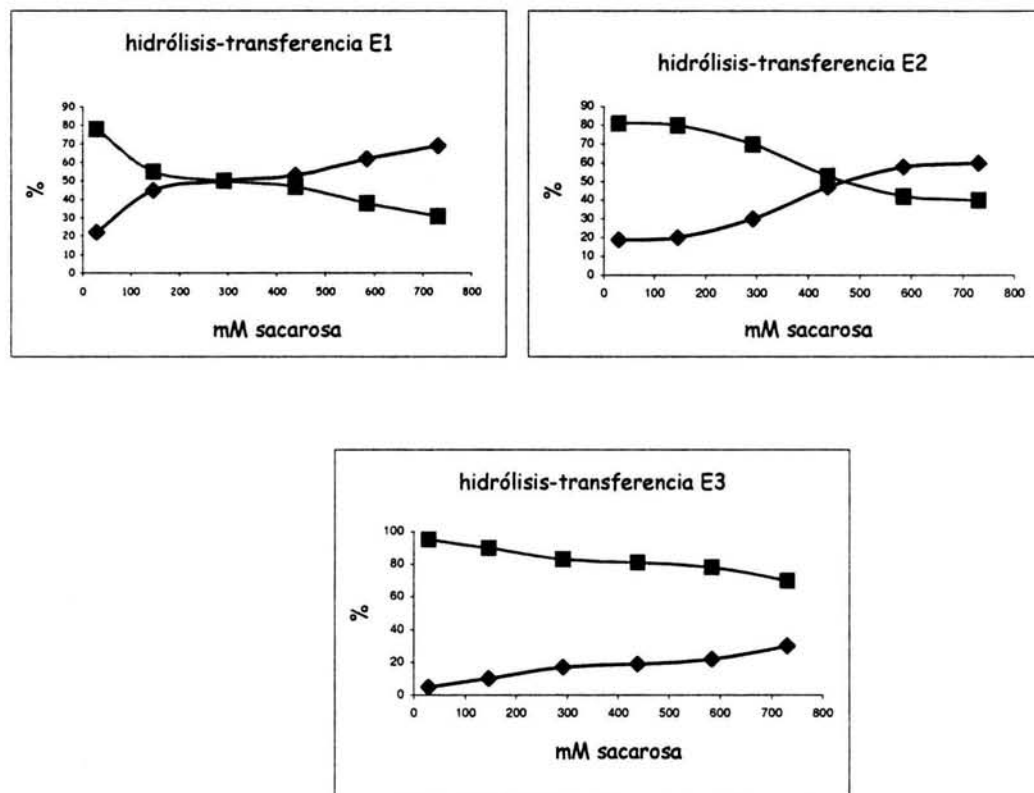


Fig. 3.7. Porcentaje de hidrólisis y de transferencia con respecto a la concentración de sustrato . En todas las recombinantes el porcentaje de transferencia aumentó proporcionalmente al incrementar la concentración de sustrato. El porcentaje de transferencia para EIS1 se incremento a 70% a una concentración de sacarosa 730 mM, para EIS2 60% a 584 mM y 30% para EIS3 a 730 mM de sacarosa. Reacciones catalizadas por las enzimas recombinantes \blacklozenge Transferencia \blacksquare Hidrólisis.

En las tres formas enzimáticas se observó un incremento en la relación hidrólisis-transferencia, proporcional a la concentración de sustrato. Si bien, el comportamiento de las enzimas ante la concentración de sustrato es similar, la relación H-T para cada una es distinta. En la enzima EIS1 la transferencia aumenta hasta 70% , en la enzima EIS2 a 60% y en la EIS3 30%.

Estos resultados comprueban que el dominio carboxilo terminal le confiere especificidad a la enzima, ya que conforme se eliminan las regiones del C-terminal la enzima se vuelve más hidrolítica. Probablemente los dominios adicionales de la inulosacarasa le permiten ser mas eficiente para transferir la fructosa al polímero en crecimiento.

Como se mencionó anteriormente las fructosiltransferasas carecen de dominios estructurales. La levansacarasa de *Bacillus subtilis*, que carece de dichos dominios presenta una relación hidrólisis-transferencia 70%/30%, que corresponde a la relación observada para la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* deletada del dominio C-terminal. Por esta razón podría deducirse que la adición de dominios estructurales es producto de una evolución de la proteína, que favorece la actividad transferasa de la enzima.

Otro aspecto importante es que en las glucansacarosas el dominio C-terminal que se denomina de unión a polímero, esta asociado con la retención y crecimiento del polímero sintetizado y su deleción provoca la perdida de la actividad enzimática. En la inulosacarasa podría no tener esta función ya que la forma que carece de dicho dominio no pierde la capacidad de sintetizar inulina. Lo mismo sucede con la alternansacarasa en la que el domino C-terminal no esta implicado en la catálisis.

Por otro lado, el dominio C-terminal también parece estar implicado en la proteólisis de la enzima ya que en los zimogramas incubados con sacarosa se observan bandas activas mas pequeñas que la banda de 180 KDa y 117 KDa para la enzima EIS1 y EIS2 respectivamente, mientras que en la enzima EIS3 no se observan más bandas activas. Esto indica que el dominio C-terminal podría estar implicado en la proteólisis de la enzima, aunque también que las formas de degradación mas pequeñas de 97 KDa ya no son activas.

Parte de la proteólisis se efectúa en el extremo carboxilo terminal ya que al realizar un Western Blot (Fig 3.4) de la enzima EIS2, sólo se observó la banda de 117 KDa que contiene la etiqueta de histidinas y no se observan las bandas mas pequeñas, ya que al ser digeridas por este extremo pierden las histidinas para las cuales esta dirigido el anticuerpo.

De acuerdo con estos resultados es de interés dirigir la especificidad de la enzima EIS3 hacia la formación de polímero ya que esta forma enzimática es mas activa y es menos afín para transferir el residuo fructosilo al agua. Probablemente podría reducirse la actividad hidrolítica disminuyendo el agua en el medio de reacción, de esta forma la transferencia de la fructosa sería exclusivamente para la formación del polímero.

4. CONCLUSIONES

Se logró sobreexpresar exitosamente la inulosacarasa y sus versiones truncadas, obteniendo 2.7, 25.62 y 107.41 veces más enzima EIS1, EIS2 y EIS3 respectivamente, en comparación con las enzimas recombinantes expresadas bajo su propio promotor.

Las condiciones óptimas para producir las enzimas fueron: temperatura de 23°C, las concentraciones de inductor para las cepas EISR1 y EISR2 fueron de 0.02% y para EISR3 0.2% de arabinosa. Las cinéticas de crecimiento muestran que la cepa EISR3 crece más rápido en comparación con las otras dos.

La purificación de las enzimas por afinidad de las etiquetas de histidina a los iones de níquel no fue exitosa, ya que no se logró la retención de las proteínas, aún en condiciones desnaturalizantes.

La K_m de la reacción global fue de 60, 34 y 376 mM para EIS1, EIS2 y EIS3 respectivamente. En la reacción de transferencia al agua se obtuvo: EIS1 23.4 mM, EIS2 11.48 mM y EIS3 269.32 mM, y en la de transferencia al polímero 285.84 mM para EIS1, EIS2 2363.29 mM y para EIS3 350.84 mM de sacarosa.

En todos los casos se observó que las inulosacarasas son más eficientes para transferir el residuo fructosilo hacia el agua. No obstante se logró dirigir la especificidad de las enzimas hacia la síntesis de polímero aumentando la concentración de sustrato.

Aunque las tres versiones de la inulosacarasa son capaces de aumentar la transferencia del residuo fructosilo al polímero, presentan diferencias entre sí. Los valores máximos para la síntesis de polímero fueron: para la enzima EIS1 70% a 730 mM, EIS2 60% a 584 mM y EIS3 30% a 730 mM de sacarosa.

5. PERSPECTIVAS

Los resultados indican que el dominio C-terminal de la inulosacarasa esta implicado en la afinidad de la enzima por el sustrato por lo tanto en la especificidad de las reacciones de hidrólisis/transferencia, sin embargo aún faltan estudios más detallados que muestren como afecta al sitio catalítico y en la estructura tridimensional la eliminación del C- terminal, para lo cual se requiere de la estructura cristalográfica.

Aunque el dominio C- terminal parece estar implicado en la proteólisis de la enzima, aún faltan determinar si ambos extremos (N y C terminal) se proteolizan.

Actualmente se esta trabajando en la purificación de las enzimas para determinar su eficiencia catalítica y de esta manera corroborar los datos obtenidos en la caracterización de las enzimas en extracto. Así mismo determinar que efecto tienen los sitios eliminados en el comportamiento cinético de la enzima pura, con respecto a la enzima en extracto enzimático.

Es importante determinar si alguna de las enzimas recombinantes realiza reacciones de aceptor y caracterizar los polímeros sintetizados por las enzimas recombinantes ya que podrían presentar diferentes pesos moleculares, debido a la expresión heteróloga de las enzimas, así como a las deleciones realizadas en el carboxilo terminal.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Andrew J. Cairns. **2003**. Fructan biosynthesis in transgenic plants. *J. of Experim Bot.* 54: N. 382. 549-567.
2. Bradford M. M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* May 7(72): 248-254.
3. Canedo, M., Jiménez-Estrada, M., Cassani, J., and López-Munguía, A. **1999**. Production of maltosylfructose (erlose) with levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Biocatal and Biotransf.* 16: 475-485.
4. Chambert, R., Tréboul, G., and Dedonder, R. **1974**. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur J Bioch.* 62: 55-64
5. Chambert, R., Petit-Glatron M.F. **1991**. Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site directed mutagenesis. *Biochem. Journal.* Oct. 1(279): 35-41
6. Chambert, R., MC Rain-Guion and Petit-Glatron. **1992**. Readthrough of the *Bacillus subtilis* stop codon produces an extended enzyme displaying a higher polymerase activity. *Bioch et Biophys Acta.* 1132: 145-153.
7. Edelman, J., and Jefford T.G. **1968**. The mechanism of fructosan metabolism in plants as exemplified in *Heliantus tuberoses*. *New Phytol.* 67: 517-531.
8. Frank, A., **2002**. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition.* **87**: Suppl. 2, S287-S291.
9. Hendry, G.A.F. y Wallace, R.K. **1993**. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. *Science and Technology of Fructans*. CRC Press, Boca Raton, FL. 119-139.
10. Hettwer U, FR Jaeckel, J Boch, M Meyer, K Rudolph and MS Ullrich. **1998**. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of levansucrase genes from the plant pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea* and *P. syringae* pv *phaseolicola*. *Appl Environ Microbiol.* 64 (9): 3180-3187.

11. Heyer, A., and Wendenburg, R. **2001**. Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. *Appl Environ Microbiol.* 67: 363-370.
12. Hirayama, M., Sumi N., and Hidaka, H. **1989**. Purification and properties of a fructooligosaccharides-producing beta fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC20611. *Agric Biol Chem.* 53: 668-674.
13. Jacques NA. **1995**. Extracelular sucrose metabolism by *Streptococcus salivarius*. *Dev Biol Stand.* 85: 315-322.
14. James, E., Reis, V., Olivares, F., Baldani, J. Y Döbereiner, J. **1994**. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J Exp Bot.* 45: 757-766.
15. Kawai, G., Taniguchi, H., and Nakamura, M. **1973**. Polyfructan and oligofructan synthesized from sucrose by conidia of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. *Agric Biol Chem.* 37: 2111-2119.
16. Liepa, V., Zakenfelds, E., Volpe, Z., Koronova, R., Lapsa, M., Laivenieks, M., Bekeris, M., and Pospishil, I. **1993**. Levan prolongs the life-span of tumor-bearing or irradiated mice, and enhanced the antitumoral activity of leukocytes. *Proceed of the Latvian Acad of Scien B. N. 5.* 500: 59-64.
17. Meng, G. and Fütterer, K. **2003**. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struct Biol.* 10: 935-941.
18. Monsan P, Bozonnet S, Albenne C, Joucla G, Willemout R.M, Remaud-Simeón M. **2001**. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 11: 675-685.
19. Olah, A., Papp, Z., and Szentirmai. **1993**. Inulin formation of penicillin producing industrial *Penicillium crysogenium* strains. *Acta Microbiol Hungarica.* 40: 379-386.
20. Olivares, I. V., Wachter-Rodarte, C., LeBorgne, S., and López-Munguía, A., **2002**. Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *J. Ind Microbiol Biotechnol.* 28: 112-117.
21. Olivares, I. V., López-Munguía A., and Olvera C. **2003**. Molecular Characterization of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a Fructosyltransferase within a Glucosyltransferase. *J Bacteriol.* 185: 3606-3612.

22. Ortíz S. M. E. **2004** Tesis de maestría. Caracterización físico-química y aplicación de la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum*.
23. Pons, T., Hernández, L., Batista, F., and China, G. **2000**. Prediction of a common β -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Science*. 9: 2289-2291.
24. Rehms, J., Willmitzer, L., and Heyer, A. **1998**. Production a 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J Bacteriol*. 180: 1305-1310.
25. Remaun-Simeon, M., Willemot, R., SarCabal, P., Potocki, G., and Monsan, P. **2000**. Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *J Mol Catal. B* 10:117-128.
26. Ritsema, T., and Smeekens, S. **2003**. Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr Opin Plant Biol*. 6: 223-230.
27. Rivera H, López-Munguía A, Soberón X, and Saal G. **2003**. α - Amilase from *Bacillus licheniformis* mutans near to the catalytic site: effects on hydrolytic and transglycosylation activity. *Protein Engineering*. 16 (7) 505-514.
28. Roberfroid, M.B. **1999**. Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose. Concepts in functional foods: The case of inulin and oligofructose. *J Nutr*. 129: 1398S-1401S.
29. Roberfroid, M.B. **1999**. Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose. Caloric value of inulin and oligofructose. *J Nutr*. 129. 1436S-1437S.
30. Roberfroid, M.B. **2000**. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr*. 71: 1682S-1687S.
31. Rosell K.G, Birkhed D. **1974** An inulin-like fructan produced by *Streptococcus mutans*, strain JC2.. *Acta Chem Scand B*. 28: 5. 589-597.
32. Rozen, R., Bachrach, G., Bronshteyn, M., Gedalia, I., Steinberg, D. **2001**. The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett*. 195: 205-210.

33. Song K.B, Belghith H, Rhee S. **1996**. Production of levana a fructose polymer using an overexpressed recombinant levansucrase. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 12: 799. 601-607.
34. Sprenger, N., Bartlik, K., Brandt, A., Boller, t., Wiemken, A. **1995**. Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Proc Natl Acad Sci.* 92: 11652-11656.
35. Summer JB and SF Howell. **1935**. A method for determination of invertase activity. *J Biol Chem.* 108:51-54.
36. Tanaka, T., Yamamoto, S., Oi, S., and Yamamoto, T., **1981**. Structure of heterooligosaccharides synthesized by levansucrase. *J Biochem.* 90: 521-526.
37. Van Hijum, S., Van Geel-Schuten, H., Rahaoui, H., van der Maarel, M., and Dijkhuizen, L. **2002**. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesized high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol.* 68: 4390-4398.
38. Van Hijum S.A.F.T., van der Maarel, M.J.E.C. y Dijkhuizen, L. **2003**. Kinetics properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS Lett.* 534: 521-526.
39. Van Loo, J., Coussement, P., De Leenher, L., Hoebregs, H. y Smits, G. **1995**. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 35: 525-552.
40. Vijn, I. and Smeekens, S. **1999**. Fructan: More than a reserve of carbohydrate? *Plant Physiol.* 120: 351-359.
41. Villaverde A. y Mar Carrió M. **2003**. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* 25: 1385-1395.
42. Wada, T., Ohguchi, M. and Iwai, Y. **2003**. A novel enzyme of *Bacillus sp.* 217C-11 that produces Inulin from sucrose. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67: 1327-1334.