



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

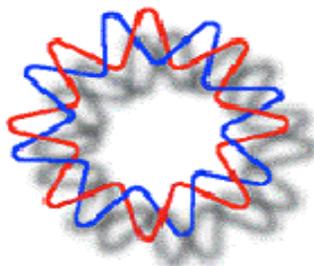
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

ESTUDIO DE UNA FRUCTOSILTRANSFERASA DE
***Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F: CLONACION,**
PRODUCCION Y ANALISIS DE LA RELACION
ESTRUCTURA-FUNCION.

TESIS que para obtener el título de:
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

M en C Sandra Morales Arrieta



Cuernavaca, Morelos. Julio 2007.



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.

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

Durante la realización de los estudios de Doctorado, se contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 117001 y un complemento de beca de la Dirección General de Estudios de Posgrado-UNAM.

El proyecto fue financiado por el Comité Técnico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con clave IN228006-3 y al acuerdo México-Francia (SEP-CONACYT-ANUIES-ECOS Nord) MO1-A04.

“De vez en cuando mira bien algo que no esté hecho por la mano del hombre: una montaña, una estrella, el movimiento de un arroyo. La sabiduría, la paciencia, el consuelo llegarán hasta ti y, sobre todo, la seguridad de que no estas solo en el mundo”

Sidney Lovett

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Clarita Olvera Carranza, por ser parte fundamental en el desarrollo de éste proyecto.

Al Dr. Agustín López-Munguía Canales, por permitirme ser parte de su grupo y confiar en mi.

Al comité tutorial formado por los Drs. Eduardo Horjales, Agustín López Munguía, Clarita Olvera y Amelia Farres Saravia que contribuyeron de manera sustancial a mi formación durante el transcurso del Doctorado.

Al comité revisor de esta tesis por sus fructíferos comentarios y sugerencias:

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Dra. Clarita Olvera Carranza

Dra. Gloria Soberón Chávez

Dr. Lorenzo Segovia

Dr. Jesús Caballero Mellado.

A los Drs. Pierre Monsan y Magalí Remaud por permitirme integrarme a su equipo de trabajo en el Laboratoire Biotechnologies/Bioprocédés-INSA Toulouse Francia, durante las estancias realizadas en el posgrado.

A la M en B Ma. Elena Rodríguez Alegría por su apoyo técnico en la caracterización enzimática.

Al Dr. Paul Gaytán, M en C Eugenio López y Q. I. Santiago Becerra por la síntesis química de oligonucleótidos así como al M en B René Hernández, M en C Jorge Yañez y M en C Soledad Juárez por la secuenciación automática de DNA.

A Ferr y Doña Aurelia por el apoyo técnico proporcionado en este trabajo.

A mis padres por seguir siendo los pilares de mi vida.

A mis hermanas Paty y Perla por compartir las lecciones de la vida.

A Güero, León y Sebastián por hacer que los días sean diferentes y divertidos.

A Julia, por estar aquí apoyándonos en todo.

A Agustín, por apoyarme tanto en lo académico como en lo personal.

A mis mejores amigos, Homero, Mary Cruz y Magda por seguir conmigo en las buenas y en las malas.

A Paul, Jorge, Santiago, Eugenio, Sol, Ane lore, Moni, Crescencio por dejarme seguir siendo miembro vitalicio de la unidad de Síntesis... gracias!

A las ex-López por todas las experiencias compartidas como las tardes de BASTA (ojala no las olviden) a Vane, Lolita, Chelo, Marce, Xoch, Gina, y los mas recientes Erika y Rubén. A los López, Edmundo, Male, Clarita, Fer, Angela, Doña Aurelia, Alina, Iván, Sandrita, Arlette, Alex, Vero, Judith, Jaime, Poncho, María, Sara y Edith, los cuales contribuyeron de una u otra manera a la realización de este proyecto.

Al Groupe d'Ingénierie Enzymatique Moléculaire: Emeline, Célile, Claire, Gilles, Miguel, Elise, Wahid, Sandra, Stephane y Renée. A mis nuevos amigos franceses Maricarmen, Juan Gabriel, Oscar, Ximena, Miguel, Adrian y Manuel.

Al Dr. Castillo por las largas discusiones de la verde fluorescente.

A Male y a Angela por escucharme a caada rato y ser más que unas compañeras de laboratorio.

A Clarita, por todas las charlas que tuvimos principalmente en Barcelona, ja!.

A Lina, Eli, Alba, Margie, Isbeidi, Lídice y Clau, por hacer los Jueves un dia diferente.

A Rocío por ser una buena roommate

A Enrique por ser un excelente amigo gracias por apoyarme en todo.

A mi nueva gran familia, Maria, Elsa, Lety, Lupila Ma. Elena e Irais.

A René por seguir el camino como dos rieles de un mismo carril, separadamente y sin embargo juntos.

A Dios y a la vida por coincidir...



ÍNDICE	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
1 GENERALIDADES	6
1.1 Fructanas	7
1.1.1 Aplicación de las fructanas	7
1.2 Fructosiltransferasas	9
1.2.1 Fructosiltransferasas de origen vegetal	9
1.2.2 Fructosiltransferasas en hongos	12
1.2.3 Fructosiltransferasas en bacterias	13
1.3 Organización estructural de las Fructosiltransferasas	14
1.3.1 Estructura terciaria de la levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i>	15
1.3.2 sitio catalítico	17
1.3.3 Sitio de unión a calcio	17
1.4 Glucosiltransferasas	18
1.4.1 Reacciones catalizadas por las Glucosiltransferasas	18
1.4.2 Organización molecular de las Glucosiltransferasas	19
1.5 Una fructosiltransferasa dentro de una glucosiltransferasa: La inulosacarasa de <i>Leuconostoc citreum</i>	20
1.6 Fructosiltransferasas en <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	21
OBJETIVOS	23
2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 Cepas, condiciones de crecimiento y medio de cultivo	26

2.2 Producción de glicosiltransferasas en <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	27
2.3 Electroforesis de proteínas	27
2.4 Cuantificación de proteína	28
2.5 Secuenciación de péptidos de la levansacarasa	29
2.6 Técnicas de biología molecular	29
2.6.1 Purificación de DNA genómico de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	29
2.6.2 Purificación de DNA plasmídico	29
2.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
2.6.4 Construcción del banco genómico	31
2.6.5 Hibridación de DNA	32
2.6.6 Secuenciación	32
2.6.7 Transformación de <i>E. coli</i>	32
2.6.8 Construcción de los vectores de expresión para <i>levS</i> y sus versiones truncadas	33
2.6.9 Expresión piloto	34
2.7 Análisis de las secuencias	34
2.8 Análisis filogenético de las fructosiltransferasas de <i>Leuconostoc</i>	35
2.9 Caracterización enzimática de LevS recombinante	36
2.9.1 Efecto de la temperatura, pH, CaCl ₂ y EDTA en la actividad de LevS	36
2.9.2 Determinación de parámetros cinéticos	37
2.10 Reacciones de acceptor	37
2.11 determinación del peso molecular del polímero	38
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1 Identificación de la fructosiltransferasa de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	40
3.1.1 Aislamiento del gen <i>levS</i>	41
3.1.2 Aislamiento de la región central del gen <i>levS</i>	41
3.1.3 Aislamiento de la región 5' del gen <i>levS</i>	43
3.1.4 Aislamiento del región 3' del gen <i>levS</i>	43
3.2 Análisis de la secuencia nucleotídica de <i>levS</i> de <i>L. mesenteroides</i> NRRL	

B512F	44
3.3 Análisis de la secuencia de aminoácidos de LevS	45
3.3.1.1 Fructosiltransferasas en <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	
ATCC 8293	45
3.3.2 Análisis de la región amino terminal de LevS	46
3.3.3 Dominio catalítico de LevS	48
3.3.4 Análisis de la región C-terminal de LevS	48
3.4 Análisis filogenético de las glicosiltransferasas de <i>Leuconostoc</i>	49
3.5 Expresión de <i>levS</i> en <i>E. coli</i>	52
3.6 Identificación del polímero producido por LevS	53
3.7 Caracterización bioquímica de LevS	54
3.7.1 Efecto del pH, temperatura, CaCl ₂ y EDTA en la actividad de LevS	55
3.7.1.1 Perfil de pH y temperatura	55
3.7.1.2 Efecto del CaCl ₂ y EDTA en LevS	56
	54
3.7.2 Propiedades cinéticas de LevS	58
3.8 Construcción de versiones truncadas de LevS	60
3.8.1 Versión sin C-terminal de LevS (SCT)	61
3.8.2 Versión truncada sin N-terminal de LevS (SNT)	64
3.8.3 Región catalítica de LevS	67
CONCLUSIONES	69
PERSPECTIVAS	71
BIBLIOGRAFÍA	72
Anexo 1	81
Anexo 2	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de las reacciones que llevan a cabo las FTFs	10
Figura 2	Esquema de las diferentes estructuras de fructanas producidas por fructosiltransferasas de plantas	11
Figura 3	Vista ortogonal del plegamiento β propela de la levansacarasa de <i>B. subtilis</i>	16
Figura 4	Representación esquemática de la estructura de las GTFs	20
Figura 5	Identificación de las glucosiltransferasas de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	41
Figura 6	Estrategia utilizada para el aislamiento del gen <i>levS</i> de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	42
Figura 7	Análisis tipo Southern blot realizado con el banco genómico de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	43
Figura 8	Representación esquemática de la estructura primaria de LevS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	45
Figura 9	Comparación esquemática de la estructura primaria de las FTFs.	47
Figura 10	Alineamiento de los tres elementos de repetición en el dominio C-terminal de LevS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	49
Figura 11	Análisis filogenético del dominio catalítico de 20 diferentes levansacarasa seleccionadas por BLASTP	51
Figura 12	Análisis filogenético del dominio de unión a glucano de glicosiltransferasas de <i>Streptococcus</i> y <i>Leuconostoc</i>	52
Figura 13	Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en el que se puede observar la expresión heteróloga de LevS en <i>E coli</i>	53
Figura 14	Espectro de resonancia magnética nuclear de levana producida por la levansacarasa (LevS) de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	54
Figura 15	Perfil de actividad en función del pH para la enzima recombinante LevS	55
Figura 16	Efecto de la temperatura en la actividad levansacarasa de LevS	56

Figura 17 Efecto del EDTA en la actividad levansacarasa	57
Figura 18 Efecto de activación de LevS con CaCl ₂	58
Figura 19 Regresión lineal a través del método de Lineweaver-Burk par alas determinaciones de las constants cinéticas de LevS	59
Figura 20 Esquema de las versions truncadas de LevS las cuales fueron expresadas en <i>E coli</i>	60
Figura 21 Gel de poliacrialmida teñido con azul de coomassie donde se observa el proceso de purificación de la version truncada sin C-terminal	62
Figura 22 Espectro de RMN 13-C de la fructana producida por la version truncada SCT de la enzima LevS de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	63
Figura 23 análisis del peso molecular de las fructanas producidas por LevS y SCT mediante cromatografía de permeación en gel (HPLC)	64
Figura 24 Electroforesis de los extractos insolubles de las versions truncadas de LevS	66
Figura 25 Diagrama de HPLC en gel de permeación que muestra la distribución de peso molecular del polímero producido por la version truncada SNT de LevS	66
Figura 27 Gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie de la fracción soluble de la version correspondiente a la región catalítica	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición del medio de cultivo de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B512F	26
Tabla 2 Condiciones para la amplificación de los fragmentos de DNA	30
Tabla 3 Oligonucleótidos utilizados para el aislamiento del gen y las versiones truncadas de la levansacarasa de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	31

ÍNDICE	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
1 GENERALIDADES	6
1.1 Fructanas	7
1.1.1 Aplicación de las fructanas	7
1.2 Fructosiltransferasas	9
1.2.1 Fructosiltransferasas de origen vegetal	9
1.2.2 Fructosiltransferasas en hongos	12
1.2.3 Fructosiltransferasas en bacterias	13
1.3 Organización estructural de las Fructosiltransferasas	14
1.3.1 Estructura terciaria de la levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i>	15

1.3.2 sitio catalítico	17
1.3.3 Sitio de unión a calcio	17
1.4 Glucosiltransferasas	18
1.4.1 Reacciones catalizadas por las Glucosiltransferasas	18
1.4.2 Organización molecular de las Glucosiltransferasas	19
1.5 Una fructosiltransferasa dentro de una glucosiltransferasa: La inulosacarasa de <i>Leuconostoc citreum</i>	20
1.6 Fructosiltransferasas en <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	21
OBJETIVOS	23
2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 Cepas, condiciones de crecimiento y medio de cultivo	26
2.2 Producción de glicosiltransferasas en <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	27
2.3 Electroforesis de proteínas	27
2.4 Cuantificación de proteína	28
2.5 Secuenciación de péptidos de la levansacarasa	29
2.6 Técnicas de biología molecular	29
2.6.1 Purificación de DNA genómico de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	29
2.6.2 Purificación de DNA plasmídico	29
2.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
2.6.4 Construcción del banco genómico	31
2.6.5 Hibridación de DNA	32
2.6.6 Secuenciación	32
2.6.7 Transformación de <i>E. coli</i>	32
2.6.8 Construcción de los vectores de expresión para <i>levS</i> y sus versiones truncadas	33
2.6.9 Expresión piloto	34
2.7 Análisis de las secuencias	34
2.8 Análisis filogenético de las fructosiltransferasas de <i>Leuconostoc</i>	35
2.9 Caracterización enzimática de LevS recombinante	36

2.9.1 Efecto de la temperatura, pH, CaCl ₂ y EDTA en la actividad de LevS	36
2.9.2 Determinación de parámetros cinéticos	37
2.10 Reacciones de acceptor	37
2.11 determinación del peso molecular del polímero	38
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1 Identificación de la fructosiltransferasa de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	40
3.1.1 Aislamiento del gen <i>levS</i>	41
3.1.2 Aislamiento de la región central del gen <i>levS</i>	41
3.1.3 Aislamiento de la región 5' del gen <i>levS</i>	43
3.1.4 Aislamiento del región 3' del gen <i>levS</i>	43
3.2 Análisis de la secuencia nucleotídica de <i>levS</i> de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	44
3.3 Análisis de la secuencia de aminoácidos de LevS	45
3.3.1.1 Fructosiltransferasas en <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	45
3.3.2 Análisis de la región amino terminal de LevS	46
3.3.3 Dominio catalítico de LevS	48
3.3.4 Análisis de la región C-terminal de LevS	48
3.4 Análisis filogenético de las glicosiltransferasas de <i>Leuconostoc</i>	49
3.5 Expresión de <i>levS</i> en <i>E. coli</i>	52
3.6 Identificación del polímero producido por LevS	53
3.7 Caracterización bioquímica de LevS	54
3.7.1 Efecto del pH, temperatura, CaCl ₂ y EDTA en la actividad de LevS	55
3.7.1.1 Perfil de pH y temperatura	55
3.7.1.2 Efecto del CaCl ₂ y EDTA en LevS	56
3.7.2 Propiedades cinéticas de LevS	54
3.7.2 Propiedades cinéticas de LevS	58
3.8 Construcción de versiones truncadas de LevS	60
3.8.1 Versión sin C-terminal de LevS (SCT)	61

3.8.2 Versión truncada sin N-terminal de LevS (SNT)	64
3.8.3 Región catalítica de LevS	67
CONCLUSIONES	69
PERSPECTIVAS	71
BIBLIOGRAFÍA	72
Anexo 1	81
Anexo 2	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición del medio de cultivo de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B512F	26
Tabla 2 Condiciones para la amplificación de los fragmentos de DNA	30
Tabla 3 Oligonucleótidos utilizados para el aislamiento del gen y las versiones truncadas de la levansacarasa de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	31

INTRODUCCION

Durante los últimos años en el laboratorio de ingeniería y tecnología de enzimas del Instituto de Biotecnología, se ha desarrollado una línea de investigación, tendiente a la búsqueda de nuevas enzimas con propiedades catalíticas interesantes que proporcionen aplicaciones novedosas, en el área de la glicobiotecnología. Uno de los principales objetivos del laboratorio son las glicosiltransferasas de importancia industrial, dentro de las cuales podemos encontrar a las glucosiltransferasas (GTFs) y fructosiltransferasas (FTFs), responsables de la producción de polímeros y oligosacáridos de glucosa y fructosa respectivamente.

Los polímeros generados por las GTFs y las FTFs han sido utilizados en la industria en general, mientras que los oligosacáridos se han usado como prebióticos, siendo los alimentos y los cosméticos los campos de mayor aplicación (Vallete, 1993) Las fuentes mas estudiadas de GTFs son algunas de las especies de *Streptococcus* y *Leuconostoc*, mientras que para las FTFs son *Bacillus subtilis*, y *Leuconostoc* spp, entre las bacterias y *Aspergillus* entre los hongos.

El estudio de las glicosiltransferasas dentro de nuestro grupo de trabajo inició hace varios años con un enfoque aplicado, basado en la caracterización bioquímica y el diseño de procesos de aplicación así como la producción de polímeros y oligosacáridos.

En una segunda etapa la atención se dirigió hacia la búsqueda de enzimas con nuevas especificidades, como la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* aislada del pulque (IBT-PQ), la cual presenta comportamientos similares a la cepa industrial (NRRL B512F) (Chellapandian, 1998). Olivares y colaboradores en el 2003 caracterizaron una fructosiltransferasa del tipo inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* (CW28) aislada del pozol, enzima asociada a células con una masa molecular de 170 kDa, la mayor reportada para las fructosiltransferasas hasta esa fecha.

A partir del inicio de proyectos de Biología Molecular en el grupo, nos abocamos al aislamiento y caracterización de los genes que codifican estas enzimas. Este trabajo se ubica en la continuación de esos esfuerzos.

Por otro lado, si bien se han realizado diferentes estudios sobre levansacarasas de varios microorganismos, la levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* de la cepa NRRL

B512F ha sido poco estudiada, considerando que es la cepa que se emplea para la producción industrial de dextrana.

Hasta el momento solo una levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512FMC ha sido reportada; dicha proteína tiene un peso molecular de 47 kDa y presenta características similares a las FTFs de gram negativas. La FTF de *Leuconostoc mesenteroides* B512F es de particular interés para nosotros debido a que presenta una masa molecular superior a las reportadas, lo que pudiera indicar la presencia de dominios con función aún desconocida. Dado el interés de los productos de estas enzimas y el limitado conocimiento de los mecanismos de síntesis de los polímeros resulta entonces interesante aislar y caracterizar el gen que codifica para la levansacarasa, realizar estudios de estructura-función en la proteína, haciendo un análisis comparativo con la inulosacarasa mosaico recién caracterizada así como con las FTFs ya reportadas.

RESUMEN

En el presente trabajo, *levS*, el gen que codifica para la levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F se aisló por medio de herramientas moleculares y se logró expresarlo en *Escherichia coli*. La enzima recombinante es una fructosiltransferasa que a partir de sacarosa realiza la síntesis de levana, polímero de fructosa que fue identificado como tal por resonancia magnética nuclear.

La secuencia nucleotídica del gen *levS* consiste de un marco de lectura abierta de 3066 pb que codifica para una proteína de 1022 aminoácidos con una masa molecular teórica de 113 410 Da. De acuerdo al análisis de la secuencia primaria, LevS es una proteína mosaico similar a la inulosacarasa de *L. citreum* CW28, una fructosiltransferasa con características estructurales de glucosiltransferasas en las regiones amino y carboxi-terminal. Esta misma estructura fue encontrada en 3 levansacarasas, en el genoma de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 recientemente secuenciado.

La LevS recombinante es activada y estabilizada por Ca^{2+} ; la actividad máxima fue alcanzada a un pH de 6.0 a 30 °C, con una K_m 36.7 mM. La actividad principal de la enzima a una concentración de sacarosa 875 mM, es dirigida hacia la síntesis de levana (75%), el 25% restante corresponde a la actividad hidrolítica.

El análisis filogenético de la región C-terminal de las levansacarasas de *L. mesenteroides* demuestran que divergieron hace mucho tiempo del C-terminal de las glucosiltransferasas (GTFs) mientras que su dominio catalítico esta relacionado entre las especies cercanas; sin embargo, no hay razón clara de la evolución de las fructosiltransferasas (FTFs) hacia estas formas quiméricas. La presencia de 5 diferentes enzimas en *Leuconostoc* spp. con esta estructura nos permite proponer que éstas enzimas pueden ubicarse en una nueva sub-familia de FTFs.

Summary

A *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F levansucrase (LS) gene, *levS*, was isolated, sequenced, and cloned in *Escherichia coli*. The recombinant enzyme was shown to be a fructosyltransferase producing a polymer identified by ¹³C-NMR as levan.

The nucleotide sequence of the *levS* gene consists of 3069 bp coding for a 1022 amino-acid protein with a theoretical molecular mass of 113 410 Da. Based on sequence analysis, we found that this fructosyltransferase is a mosaic protein similar to inulosucrase, another FTF that we have previously reported bearing structural features of glucosyltransferases (GTFs) in the amino and carboxy terminal regions. This is also the case of 3 hypothetical LS we have found in the sequenced genome of *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Recombinant LevS exhibited maximum activity at pH 6 and 30°C. The enzyme was activated and stabilized by Ca²⁺ ions and inhibited by EDTA. The enzyme exhibited Michaelis-Menten kinetic properties with a Km of 36.7 mM. The acceptor reaction of recombinant LevS was very poor using maltose as acceptor when compared to others GTFs. The maximum transferase/hydrolase ratio was 75/25 at 875 mM sucrose.

The phylogenetic analysis of GBD domains of levansucrases from *Leuconostoc mesenteroides* shows that they group together and evolved long before all other GBDs including those of other *Leuconostoc* species, while their catalytic domain structure is species related, which include Gram positive, *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc* grouping separately. Although there is no evident reason for the evolution of

FTFs towards these chimeric forms. The presence of 5 different enzymes in *Leuconostoc* spp allow us to conclude that this a new sub-family of FTFs.

1 GENERALIDADES

1.1 Fructanas

Las fructanas son polímeros de fructosa sintetizados a partir de la sacarosa cuya estructura general consiste de una glucosa inicial unida a múltiples unidades de fructosa. Existen principalmente dos tipos de fructanas que pueden ser producidas tanto por plantas como por microorganismos y se distinguen entre sí por el tipo de enlace glicosídico que une a las fructosas. La primera de ellas es la levana, homopolímero con enlaces β 2-6 con ramificaciones en β 2-1. La segunda es la inulina, en la que sus fructosas están unidas a través de enlaces tipo β 2-1 y que se ramifica por enlaces β 2-6.

1.1.1 Aplicación de las fructanas.

Las fructanas son parte de la dieta normal de un ser humano, ya que se encuentran de manera natural en muchas plantas, tales como la cebolla, puerros, alcachofas, etc. El interés comercial por las fructanas ha ido en aumento desde hace una década cuando se descubrió su uso potencial como fibra soluble y prebiótico.

Los prebióticos son ingredientes alimenticios que resisten la digestión en el estómago y en el intestino delgado, pudiendo llegar al colon donde son selectivamente fermentados por un grupo microbiano específico. Las fructanas fomentan el crecimiento selectivo de especies benéficas alterando la flora bacteriana del intestino, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas.

La inulina es una fibra soluble que no puede ser digerida por los humanos. Cuando se emulsifica con agua, la inulina forma un gel con características muy similares a la grasa pero con mucho menor valor calórico, por lo que es ampliamente utilizado como sustituto de grasa bajo en caloría, en yogurts, quesos helados, etc. (Ritsema y Smeekens, 2003).

Por otro lado, si bien es cierto que las inulinas tienen más aplicaciones como prebiótico, también las levaduras ofrecen una variedad de aplicaciones industriales en los campos de cosméticos, alimentos y farmacéuticos.

En el 2005, Kim y col. reportan las propiedades de la levadura como agente cosmético. Estos autores observan que en piel artificial que fue tratada con levadura muestra una proliferación celular mayor (más del 30%) que las que no recibieron el tratamiento. Se determinó también que la levadura mostró un efecto antiinflamatorio en pieles irritadas.

Se ha demostrado en ratas que la administración de levadura fue benéfica provocando la supresión de obesidad inducida por una dieta rica en grasas y este efecto fue acompañado por la activación del metabolismo de lípidos así como también la supresión de la lipogénesis en el hígado. Este efecto hipolipidémico se debe probablemente a la disminución de expresión de las enzimas lipogénicas, resultado de la acción de los ácidos grasos de cadena corta producidos por la fermentación de levadura (Kang y col., 2006).

Recientemente, Rairakhwada y col. (2007) reportaron el efecto inmunoestimulante de la levadura de origen microbiano en la dieta de la carpa común, que es uno de los peces cultivados más importantes en el mundo. La dieta suplementada con levadura mostró un efecto significativo en la sobrevivencia de peces juveniles contra una infección producida por *Aeromonas hydrophila*. Los resultados indican que el uso de polisacáridos microbianos constituye un parámetro importante para reducir la mortalidad en peces.

La levadura también han sido utilizada como goma industrial, sustituto de plasma sanguíneo y edulcorante. También se ha propuesto que la levadura puede actuar como emulsificante, estabilizante, espesante, agente encapsulante y acarreador de sabores y fragancias (Han y col., 1990).

1.2 Fructosiltransferasas

Las enzimas responsables de sintetizar fructanas son conocidas como fructosiltransferasas y llevan a cabo la transferencia del residuo fructosilo de la sacarosa o de la rafinosa, a varias moléculas aceptoras sin necesidad de cofactores ya que la energía proviene del enlace glicosídico del sustrato. La enzima cataliza reacciones de **transfructosilación**, en la cual la fructosa se va acoplando a una cadena de polímero en crecimiento; pero también puede llevar a cabo una reacción de **hidrólisis** de la sacarosa donde la molécula de agua actúa como aceptor; también puede llevar a cabo la **síntesis de fructósidos**, cuando moléculas aceptoras tales como la maltosa, lactosa, diversos alcoholes, monosacáridos y oligosacáridos son adicionadas al medio de reacción (Chambert y col., 1974). Estas reacciones se ejemplifican en la figura 1.

1.2.1 Fructosiltransferasas de origen vegetal.

Las fructanas al igual que el almidón son conocidas por su papel como reserva de carbohidratos, encontrándose en aproximadamente 15% de las especies de plantas que producen flores. La capacidad de las plantas de sintetizar fructanas correlaciona con su supervivencia a los climas secos y fríos, indicando su papel como protector a la sequía y como crioprotector en condiciones severas (Ritsema y Smeekens, 2003).

Entre las plantas que almacenan fructanas se encuentran los cereales, como la cebada, trigo y avena, los vegetales, como achicoria, cebolla y lechuga, las plantas ornamentales, como dalia y tulipán y los pastos como *lolium* y *festuca*. Las fructanas son sintetizadas por la acción concertada de dos enzimas. La síntesis inicia con la conversión de la sacarosa a 1-kestosa utilizando la sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST), (EC 2.4.1.99). En una segunda etapa la fructan:fructan 1-fructosiltransferasa (1-FFT) elonga la 1-kestosa adicionando unidades de fructosa unidas por enlaces β 2-1, siendo la que determina la longitud de la inulina sintetizada.

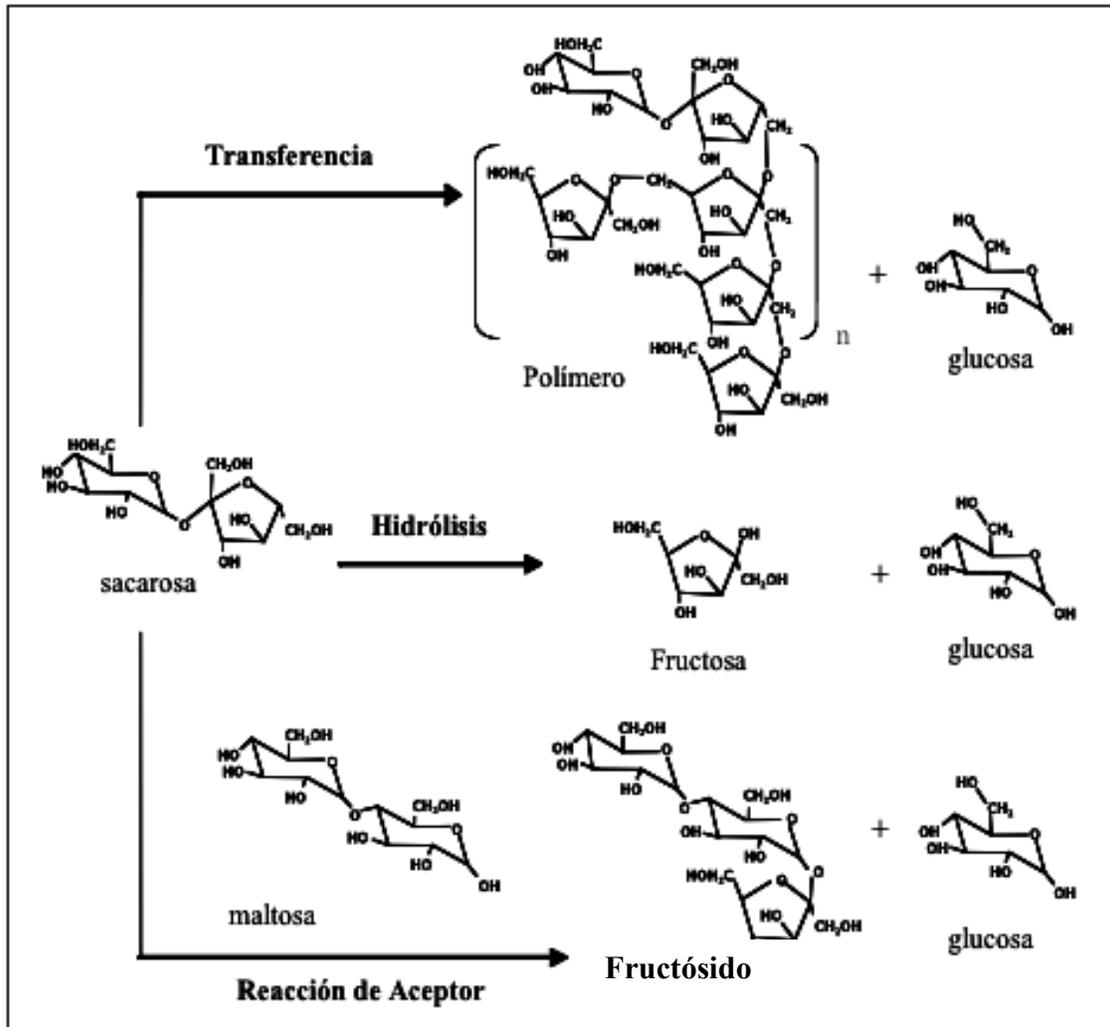


Figura 1. Esquema de las reacciones que llevan a cabo las FTFs.

En general, la 1-SST y la 1-FFT son enzimas indispensables para la síntesis de fructanas tipo **inulina** (figura 2a), que es una fructana lineal con residuos de fructosa unidos por enlaces β 2-1. Existen fructanas de estructura más compleja, se requieren de enzimas adicionales, tales como la fructan:fructan 6G-fructosiltransferasa (6G-FFT) que sintetiza **neo-series de inulina** (Figura 2b), formadas por dos cadenas de fructosa unidas por enlaces β 2-1, una de las cuales se encuentra unida a la glucosa y otra a la fructosa de la sacarosa inicial. En plantas existen también las **levanas o phleinas** (Figura 2c), que como ya se señaló, están constituidas por un polímero de fructosa lineal donde las fructosas están unidas por enlaces β 2-6, y han sido identificadas principalmente en

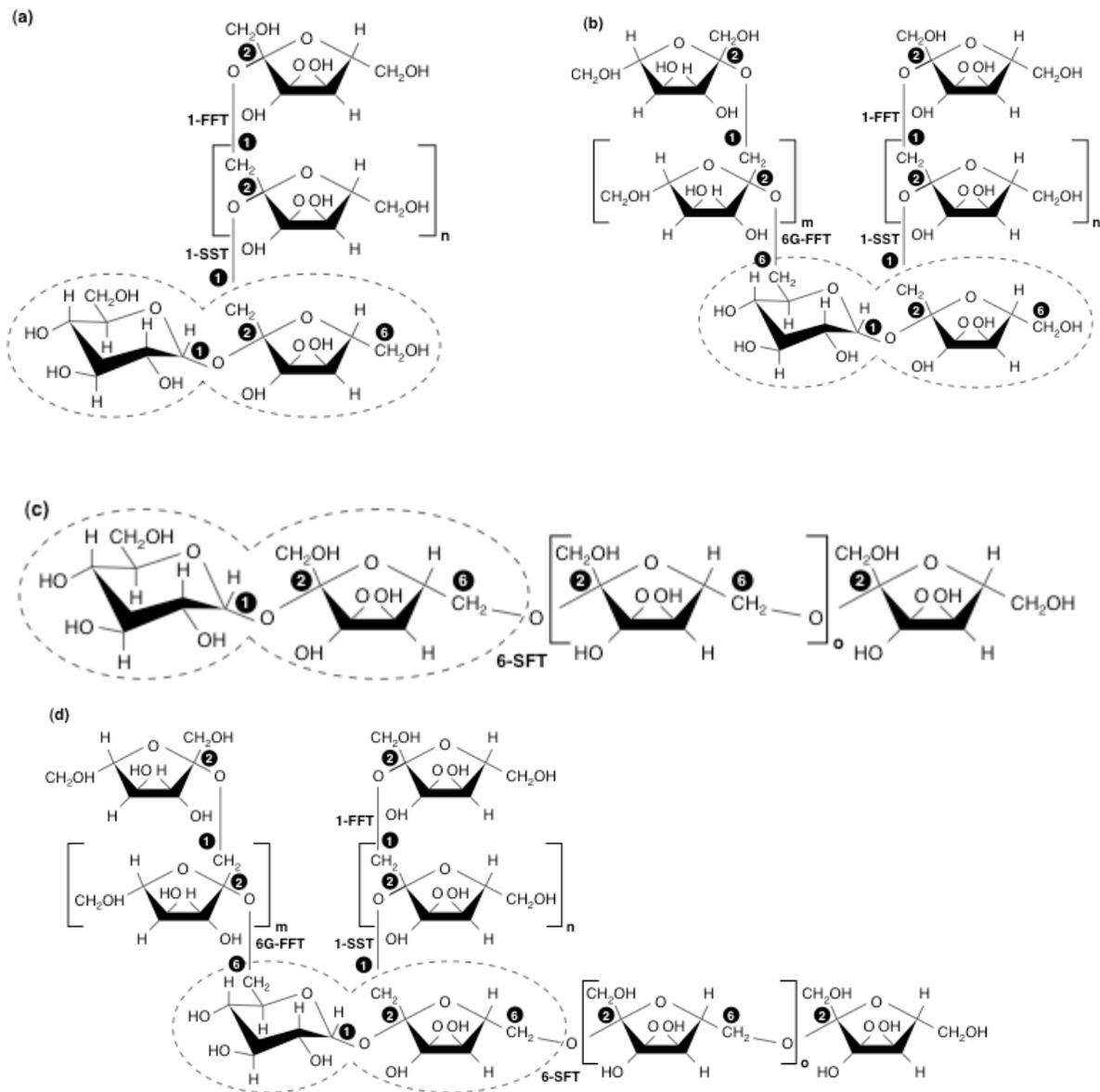


Figura 2. Esquema de las diferentes estructuras de fructanas producidas por fructosiltransferasas de plantas. La estructura en círculo es la sacarosa y a partir de ésta se construyen las fructanas. Las enzimas encargadas de formar los enlaces son: 1-FFT (fructan:fructan 1-fructosiltransferasa), 1-SST (sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa), 6G-FFT (fructan:fructan 6G fructosiltransferasa), 6-SFT (sacarosa:fructan 6-fructosiltransferasa). a) Inulina lineal, b) Neo-series de inulina, c) Levana o phleina y d) Fructanas mezcladas (Ritsemá y Smeekens, 2003).

pastos. Finalmente, existen también las **fructanas mezcladas** (Figura 2d), cuyos residuos de fructosa se unen por enlaces β 2-6 y mediante ramificaciones en β 2-1. Todas estas estructuras se esquematizan en la figura 2 (Ritsema y Smeekens, 2003).

1.2.2 Fructosiltransferasas en hongos

En varias cepas de hongos se han identificado fructosiltransferasas que sintetizan fructanas de diversos pesos moleculares, sin embargo, muy poco se conoce sobre el significado fisiológico de las fructanas en hongos.

En *Aspergillus foetidus* (Rehm y col., 1998) se aisló y clonó una fructosiltransferasa que produce el trisacárido denominado 1-kestosa. La producción de fructooligosacáridos ha sido reportado para *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*, (Hirayama, 1989 y Patel, 1994 respectivamente). Olah y col. (1993) reportaron la síntesis de inulina de alto peso molecular en *Penicillium chrysogenum*.

La fructosiltransferasa de *Aspergillus sydowi* es de particular interés ya que es capaz de sintetizar diferentes productos dependiendo de las condiciones experimentales. Las suspensiones de conidios fungales producen inulina de un peso molecular de 30 millones de daltons, mientras que los micelios liofilizados y posteriormente rehidratados produce una mezcla de oligosacáridos con un grado de polimerización de 3 a 13 (Muramatsu y Nakakuki, 1995).

Heyer y colaboradores (2001) expresaron la FTF de *Aspergillus sydowi* en *E. coli*, *S. cerevisiae* y plantas de papa. Los resultados con respecto al peso molecular coinciden con los reportados por Muramatsu y Nakakuki, 1995, ya que al incubar con sacarosa los extractos proteicos de los conidios fungales y los extractos proteicos de las enzimas recombinantes de *E. coli* y de *S. cerevisiae* observaron que sólo sintetizan fructooligosacáridos. Sin embargo, los productos de la síntesis in vivo con conidios fungales fueron de pesos moleculares mayores a 1×10^7 Da. Una posible explicación de los autores a éste fenómeno es la presencia de dos enzimas en los conidios, una que es soluble en el medio intracelular y otra que esté asociada a la membrana.

Cuando la expresión de la fructosiltransferasa de *A. sydowi* fue realizada en plantas de papa todas las plantas presentaron alteraciones fenotípicas como retraso en el crecimiento, necrosis de las hojas y finalmente murieron en 4-8 semanas. Según los autores este fenómeno puede relacionarse al hecho de que las levansacarosas muestran baja especificidad por moléculas aceptoras de residuos fructosilo. La posible razón del daño en plantas transgénicas es que la actividad levansacarasa podría interferir con la glicosilación de la proteína u otros procesos celulares (Heyer y Wendenburg, 2001).

1.2.3 Fructosiltransferasas en bacterias

En bacterias, se requiere de una sola enzima para la síntesis de fructanas, a diferencia de las plantas en las que se requieren al menos de dos (SST/FFT). Como se mencionó anteriormente, la **levansacarasa** sintetiza un polímero de fructosa que se encuentra unido por enlaces de tipo β 2-6 en su cadena lineal y puede presentar ramificaciones en los enlaces β 2-1 mientras la **inulosacarasa**, lleva a cabo la síntesis de inulina, en la que los residuos fructosilo de la cadena principal se encuentran unidos por enlaces β 2-1 y las ramificaciones se unen a través de enlaces β 2-6.

Se ha reportado la presencia de FTFs tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram negativas. Entre las especies de Gram-negativos se encuentran *Gluconoacetobacter diazotrophicus* (Arrieta y col., 1995), *Zymomonas mobilis* (Yannase y col., 1992), *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Hettwer y col., 1995), *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Hettwer y col., 1998). Entre las bacterias Gram-positivas que producen levansacarosas destacan diferentes especies de *Bacillus*, como *B. subtilis*, (Steinmetz y col., 1985), *B. circulans* (Pérez y col., 1996), *B. polymyxa* (Bezzate y col., 1994) y *B. amyloliquefaciens* (Tang y col., 1990), así como las bacterias ácido lácticas *Streptococcus mutans* (Sato y col. 1986), *Streptococcus salivarius* (Jacques, 1993), *Leuconostoc mesenteroides* (Kang y col., 2005) y *Lactobacillus reuteri* (Van Hijum y col., 2001). Las inulosacarosas han sido identificadas en los géneros de *Streptococcus mutans* (Shiroza y Karamitzu, 1988), *Lactobacillus reuteri* (van Hijum y col, 2002), *Leuconostoc citreum* (Olivares-Illana y col., 2002) y *Bacillus sp* (Wada y col., 2003).

Los polímeros producidos por streptococci oral han sido ampliamente estudiados debido a su papel claramente establecido en la formación de la placa dental, así como en la adherencia de la bacteria a la superficie del diente, modulando las distancias a través de la placa y ocasionalmente sirve como reserva de energía. Alternativamente, éstos polímeros pueden proteger las células microbianas contra fagocitosis y ataque de fagos, antibióticos o compuestos tóxicos y estrés osmótico, (Van Hijum y col., 2006).

1.3 Organización estructural de las Fructosiltransferasas

De acuerdo a la estructura primaria, las fructosiltransferasas presentan cuatro regiones: a) péptido señal, b) N-terminal, c) región catalítica y d) C-terminal.

La región N-terminal es una región estrecha que varía en longitud entre las FTFs sin que se le conozca una función específica. En esta región se localiza una secuencia señal que es la responsable de la secreción de la proteína.

El dominio catalítico es el responsable de la actividad fructosiltransferasa y en promedio está formado por 500 aa. En 2003, se elucidó la primera estructura tridimensional de una fructosiltransferasa, la de la levansacarasa de *Bacillus subtilis*, identificándose tanto el plegamiento de la proteína así como los residuos involucrados en la catálisis. Dicha estructura se describe más adelante.

En cuanto al dominio C-terminal de las FTFs, Van Hijum y colaboradores (2006) sugieren, que podría estar afectando el tamaño y/o la especificidad de la enzima. En *Bacillus subtilis* se ha reportado que al extender su C-terminal, la levansacarasa produce un polímero más grande, como consecuencia de un mayor número de ramificaciones en la levana (Chamber y col., 1992).

Otra función para el C-terminal de las FTFs es como unión de la enzima a la pared celular del organismo productor. Un motivo común dentro del C-terminal es el LPXTG denominado motivo de anclaje a pared celular. Este motivo ha sido encontrado en el C-terminal de la inulosacarasa (Van Hijum y col., 2002) y de la levansacarasa de *L. reuteri* (Van Hijum, 2004). Los homopolisacáridos asociados a células producidos por

este tipo de enzimas podrían estar involucrados en la adherencia del organismo a superficies tales como los dientes y la mucosa intestinal (Rozen y col., 2001).

1.3.1 Estructura terciaria de la levansacarasa de *Bacillus subtilis*.

Las fructosiltransferasas bacterianas fueron ubicadas en la familia 68 de las glicósido hidrolasas. A principios de los años 70s se cristalizó la levansacarasa de *B.subtilis* a baja resolución, lo que no permitió tener información concreta sobre el tipo de plegamiento y de los aminoácidos involucrados en la catálisis. Basándose en herramientas de modelamiento, se analizaron los plegamientos entre FTFs de plantas, hongos y bacterias a partir de sus secuencias primarias y secundarias. El análisis predijo que el plegamiento para el dominio catalítico de estas enzimas era una β propela, plegamiento similar a la de la neuraminidasa y la sialidasa (enzimas pertenecientes a la familia 33 y 34, respectivamente). En las FTFs se identificaron también regiones conservadas de la familia 32 y 68 de las GH, siendo uno de ellos el motivo denominado RDP que de hecho está conservado en ambas familias (Pons y col., 2000).

En el 2003, la primera estructura tridimensional de un miembro de la familia 68, la levansacarasa de *B. subtilis* (SacB), fue descrita por Meng y Futterer a alta resolución (1.5 Å), y una mutante inactiva de la misma enzima a 2.1 Å. La estructura cristalográfica indica que está constituida por un solo dominio y presenta un plegamiento tipo β -propela de 5 hojas (figura 3), las cuales están arregladas alrededor de un túnel central. Las hojas (I-V) adoptan una topología clásica "W" de 4 hojas β antiparalelas (Meng y Futterer, 2003).

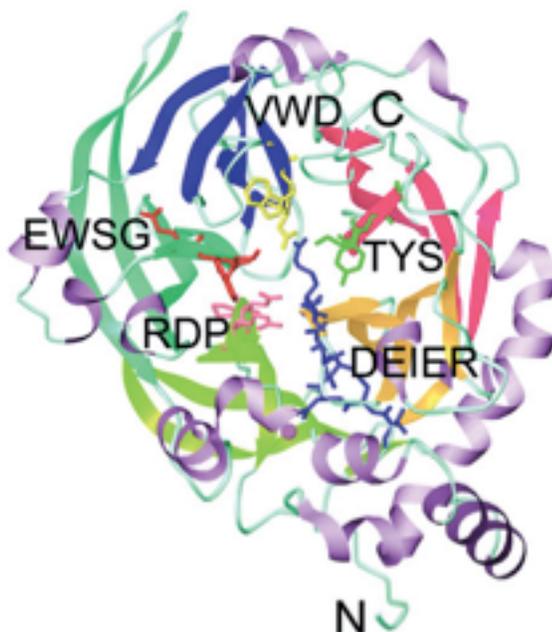


Figura 3. Vista ortogonal del plegamiento β -propela de la levansacarasa de *B. subtilis*, en donde se incluyen la secuencia de los motivos conservados.

Hasta hoy han sido identificadas cinco clases de β propelas, mostrando una pseudo-simetría de 4, 5, 6, 7 y 8 hojas, las cuales se empacan cara a cara por interacciones hidrofóbicas. Como regla general, la propela mas pequeña de 4 hojas se estabiliza por puentes disulfuros. Existen otras formas de estabilizar la proteína una es mediante el cierre del anillo de las hojas. Para esto existen dos mecanismos uno es mediante una interacción tipo velcro, en la que la última hoja esta formada por una combinación de hojas del N y C-terminal, dando origen a un anillo cerrado con una estructura rígida. El otro mecanismo es la de tipo no-velcro en la que la unión está basada en interacciones hidrofóbicas entre las hojas vecinas (Bosch y col., 2006).

La levansacarasa de *B. subtilis* no muestra el velcro molecular, ya que al N-terminal está diametralmente opuesto a través de la primera hoja β al C-terminal que se empaca contra la hoja V pero sin interactuar con los puentes de hidrógeno con la hoja I. Varias hélices están distribuidas en la superficie de los asas del borde de la propela.

En la familia 68 se han identificado motivos altamente conservados, VWD-86, EWSG-165, RDP-248, DEIER-343 y TYS-412, los cuales se encuentran localizados en

las hojas de la I a la V y forman la cavidad central de la propela. La presencia de estos motivos puede ser explicada por las restricciones impuestas por el empacamiento de las hojas (Meng y Futterer, 2003).

1.3.2 Sitio catalítico

La superficie molecular de la levansacarasa tiene un bolsillo central cargado negativamente, en el cual se acomoda únicamente una molécula de sacarosa. Con la estructura cristalográfica se identificó que los residuos Asp86, Asp247 y Glu342 corresponden a la triada catalítica. Por datos cristalográficos de diversas mutantes, se encontró que el Asp86 y Glu342 son los residuos críticos para la catálisis mientras que el Asp247 aunque también participa, no parece estar directamente involucrado en el mecanismo químico de reacción.

Con las estructuras cristalográficas de las levansacarosas de *B. subtilis* SacB y la de *G. diazotrophicus* LsdA se identificaron los residuos involucrados en la unión de la sacarosa en el sitio activo y constituyen los sitios de unión al azúcar -1 y +1. El rompimiento del sustrato (sacarosa) tiene lugar entre estos subsitios -1 y +1, formando la enzima un intermediario covalente con el residuo fructosilo al subsitio -1. Posteriormente, la fructosa es acoplada a la molécula aceptora: la fructana o el agua (van Hijum, 2006) .

Se identificaron en las levansacarosas de *B. subtilis* SacB, *G. diazotrophicus* LsdA y la inulosacarasa de *L. reuteri* 121 los residuos que conforman el subsitio -1 utilizando la estructura tridimensional y alineamientos de secuencia de las proteínas de la familia 68 de las glicosilhidrolasas. Sorprendentemente, el subsitio +1 difiere entre las enzimas de la familia 68 de las glicosidohidrolasas, diferenciando a las FTFs de los microorganismos gram positivos (SacB e Inu) de los gram negativos (LsdA),(van Hijum, 2006).

1.3.3 Sitio de unión a Calcio.

La estructura cristalográfica arrojó evidencia de la presencia de un sitio de unión a un ión metálico preferencialmente de calcio. Se identificó en la estructura de la levansacarasa de *B. subtilis* al aspártico 399, como uno de los residuos que coordina al

ion Ca^{2+} . El papel de este residuo ha sido analizado por medio de mutagénesis sitiodirigida en la inulosacarasa y levansacarasa de *L. reuteri* (Ozimek y col., 2005). Ambas mutantes mostraron una disminución de la temperatura óptima así como también de la afinidad aparente en la unión con el Ca^{2+} .

Alineamientos de secuencias de miembros de la familia 68 mostraron que los residuos involucrados en la unión a calcio están conservados para las enzimas de bacterias gram positivas, pero no así para las proteínas de bacterias gram negativas (Ozimek y col., 2005).

1.4 Glucosiltransferasas

Las glucosiltransferasas (GTFs) son enzimas que transfieren unidades de glucosa a una molécula aceptora liberando fructosa al medio de reacción (Monsan y Paul, 1995). Éstas son enzimas extracelulares de alto peso molecular (alrededor de 170 000 Da) y han sido ampliamente estudiadas en los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*.

Dentro de las glucosiltransferasas podemos ubicar a la **dextransacarasa** (EC 2.4.1.5), la cual produce un polímero de glucosa denominado dextrana que se distingue por la presencia de enlaces de tipo α (1-6) en su cadena lineal y ramificaciones en α (1-2), (1-3) y (1-4). La dextransacarasa más estudiada, es la que produce *L. mesenteroides* NRRL B512F. En éste mismo grupo también se encuentra la **alternansacarasa**, que genera alternana, un polímero que se caracteriza por sus enlaces alternados α (1-6) y α (1-3). La **mutansacarasa** y la **reuteransacarasa** (EC 2.4.1.5) están clasificadas también dentro de esta familia: la primera produce un polímero denominado mutana con enlaces α (1-3) y es producida por *Streptococcus mutans* y algunas cepas de *Leuconostoc mesenteroides*; la segunda genera reuterana, con enlaces de tipo α (1-4) y el microorganismo productor es *Lactobacillus reuteri*.

1.4.1 Reacciones catalizadas por las Glucosiltransferasas

La reacción más importante que llevan a cabo las GTFs es la **transglucosilación**, mediante la cual rompen el enlace glucosídico de la sacarosa y transfieren la glucosa a

una cadena de polímero en crecimiento. Sin embargo, la glucosa también puede ser transferida a otro tipo de moléculas que pueden actuar como aceptores. Una de esas moléculas es el agua, resultando la hidrólisis de la sacarosa. Otro tipo de moléculasceptoras son la maltosa, isomaltosa o alcoholes primarios, lo que dirige la síntesis de polímero hacia la producción de glucooligosacáridos. Adicionalmente, el glucano mismo puede actuar como molécula aceptora dando origen a un polímero ramificado. La síntesis del polímero de glucosa no requiere de cofactores, ya que se lleva a cabo con la energía liberada durante el rompimiento del enlace glucosídico a partir de la sacarosa.

1.4.2 Organización molecular de las Glucosiltransferasas

De acuerdo a sus secuencias aminoacídicas, las GTFs comparten un patrón común de organización y están constituidas por 4 dominios estructurales: 1) el péptido señal, 2) región altamente variable en el N- terminal, 3) dominio catalítico y 4) dominio C-terminal, como según se ilustra en la figura 4 (van Hijum y col., 2006).

La región N- terminal contiene la secuencia señal que está constituida en promedio por 36 a 40 aminoácidos. La región que se encuentra entre el péptido señal y el dominio catalítico es denominada región variable. En esta región amino se han identificado unidades repetidas en todas las GTFs, pero su función es desconocida. Existen reportes en los que la región N-terminal de la GTF de *Streptococcus downei* MFe28 ha sido eliminada sin que se observen cambios en la estructura del glucano (Monchois y col., 1999), mientras que para GTF de *Lactobacillus reuteri* 121, la eliminación del N-terminal es importante para la actividad pero no produjo alteraciones importantes en las características del polímero (Kralj y col., 2004).

Hasta el momento no existen datos cristalográficos de ningún miembro de la familia 70 de las glicosilhidrolasas, familia a la que pertenecen las GTFs. Sin embargo, estudios de predicción de estructura secundaria indican que el dominio catalítico presenta un plegamiento de barril (β/α)₈ circularmente permutado. De acuerdo a este análisis, está formado por 8 hojas β (E1-E8) localizado en el centro de la proteína, alternando con 8 α -hélices (H1-H8) las cuales se localizan en la superficie de la enzima (MacGregor, 1996). En general, este dominio está constituido por aproximadamente 900 aminoácidos y a

través de mutagénesis sitio dirigida se han identificado en esta región los residuos responsables de la catálisis (Kato y col., 1992, Devulapalle y col., 1997, Monchois y col., 1997).

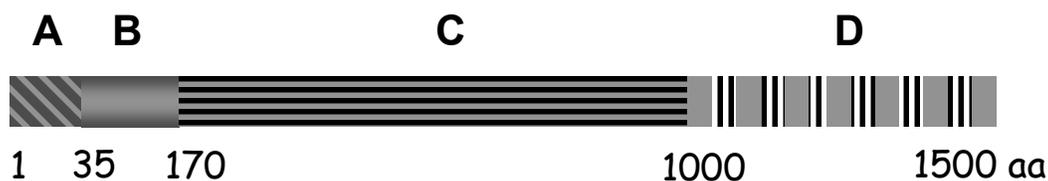


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de las GTFs. A: Péptido señal, B: Región variable, C: Dominio catalítico y D: Dominio de unión a glucano.

La región carboxi-terminal también conocida como dominio de unión a glucano (GBD), está formada por aproximadamente 500 residuos y se ha propuesto que este dominio se une al glucano. En el GBD también se han identificado una serie de unidades repetidas constituidas de 30-40 aa, que han sido clasificadas en cuatro tipos: A, B, C y D (Russel y col, 1990).

1.5 Una fructosiltransferasa dentro de una glucosiltransferasa: La inulosacarasa de *Leuconostoc citreum*.

En nuestro laboratorio se identificó una fructosiltransferasa en la cepa CW28 en *Leuconostoc citreum*, la cual produce inulina, habiéndose determinado que la enzima que produce esta cepa es una inulosacarasa de 170 kDa (Olivares, 2002). Se encontró que el gen que codifica para esta inulosacarasa es de 4473 pares de bases y codifica para una proteína de 1491 aminoácidos.

De acuerdo al análisis de la secuencia primaria se encontró que ésta fructosiltransferasa es el resultado de su inclusión dentro de la alternansacarasa, una glucosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* 1355. La inulosacarasa posee tres

dominios: el N-terminal el cual presenta una homología con la región variable de las glucosiltransferasas, el dominio catalítico que presenta una alta homología con las FTFs de varios microorganismos y la región del C-terminal, que presenta homología con el dominio de unión a glucano de la alternansacarasa. Siendo la primera inulosacarasa con características estructurales tanto de glucosiltransferasas como de fructosiltransferasas (Olivares, 2003).

Por otro lado, se ha reportado en *Leuconostoc* la presencia de actividades glucosil y fructosiltransferasa, produciéndose ambos polímeros a partir de sacarosa (Olvera, y col. 2006). Aunque no hay evidencia que demuestre las implicaciones de la mezcla de polímeros en los cultivos de *L. mesenteroides*. Rozen y col (2004) demostraron que los glucanos y fructanas de *Streptococcus mutans* son una parte integral del biofilm por lo que se sugiere que en *Leuconostoc* podría suscitarse un fenómeno similar.

1.6 Fructosiltransferasas en *Leuconostoc mesenteroides*.

En *Leuconostoc mesenteroides* sólo las GTFs han sido ampliamente estudiadas, debido a su aplicación en la producción industrial de dextrana. Sin embargo, desde 1979 se ha reportado que la cepa industrial de *L. mesenteroides* NRRL B512F produce levansacarasa como contaminante de preparaciones en las que predomina la actividad dextransacarasa (Robyt and Walseth, 1979). Miller y Robyt (1986), describieron dos FTFs de 116 y 92 kDa pero debido a su baja actividad sus propiedades no han sido estudiadas. Recientemente, Kang y col. (2005) reportaron el aislamiento del gen de una levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B512FMC (*m1ft*). Este gen codifica para una proteína de 425 aa con una masa molecular calculada de 47.1 kDa. Sin embargo, su secuencia aminoacídica presenta una identidad mayor con las fructosiltransferasas de las bacterias Gram negativas que con las de bacterias Gram positivas.

De manera análoga, hemos encontrado que la fructosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F presenta un peso molecular muy por arriba del encontrado en otras levansacarasa bacterianas. Muchas preguntas relacionadas con las FTFs están aún sin responderse; por lo que resulta por demás interesante realizar un estudio profundo

de la levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* de la cepa NRRL B512F a nivel molecular, que nos permita conocer con base en su estructura primaria si existe homología con las fructosiltransferasas descritas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Purificar y caracterizar la fructosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F y realizar estudios de la relación estructura-función.

Objetivos particulares

- ◆ Purificar la fructosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* de la cepa NRRL B512F.
- ◆ Aislar y secuenciar el gen que codifica para la fructosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* de la cepa NRRL B512F.
- ◆ Realizar un estudio comparativo a nivel de secuencia de aminoácidos entre la fructosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F y la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28, así como con el resto de las fructosiltransferasas reportadas.
- ◆ Producir la fructosiltransferasa en un sistema de expresión heterólogo y llevar a cabo su caracterización bioquímica.
- ◆ Construir y caracterizar versiones truncadas de la fructosiltransferasa de *Leuconostoc mesenteroides* B512F.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Cepas, condiciones de crecimiento y medios de cultivo

Las glicosiltransferasas silvestres fueron producidas a partir de un cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. La cepa se obtuvo de la colección Northern Regional Research Laboratory (NRRL) de Peoria, Illinois.

Las condiciones de crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* fueron de 30 °C y 200 rpm en un medio de cultivo (Tabla 1) con sacarosa como fuente de carbono, la cual fue sustituida por glucosa para evitar la síntesis de polímero cuando se requirió extraer DNA. El pH del medio al inicio de la fermentación fue ajustado a 6.9.

Tabla1. Composición del medio de cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F.

Componente	Concentración (g/L)
Sacarosa/glucosa	20
Extracto de levadura	20
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.2
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.05
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.01
NaCl	0.01

Las cepas *E. coli* DH5 α y TOP 10 fueron utilizadas como hospederos para las clonaciones realizadas en este estudio. La temperatura del crecimiento celular para estas cepas fue de 37 °C y 250 rpm en medio Luria-Bertani(LB) (Ausbel y col. 2001) y/o medio YT2X. La expresión de las proteínas heterólogas se llevó a cabo a 22° C y con agitación de 200 rpm. El medio fue suplementado con 200 μ g/ml de ampicilina ó 50 μ g/ml de kanamicina para seleccionar las colonias positivas. Las placas de agar se prepararon adicionando al medio 1.5 % de agar.

2.2. Producción de glicosiltransferasas en *L. mesenteroides* NRRL B512F.

Los inóculos se produjeron activando las células almacenadas en glicerol al 30% en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo estéril a una temperatura de 30° C y una agitación de 200 rpm. Posteriormente se inoculó una fermentación de 1L en un matraz Fernbach (2.8 L) incubando a 30°C y 200 rpm. El crecimiento celular se siguió durante la fermentación midiendo el incremento de la densidad óptica en el tiempo a 650 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 650. Al final de la fermentación el pH se ajustó a 5.2. La recuperación del sobrenadante de la fermentación se llevó a cabo por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Los sobrenadantes de la fermentación fueron concentrados 50 veces en un sistema de ultrafiltración (millipore). Los sobrenadantes concentrados fueron almacenados a 4°C.

2.3 Electroforesis de proteínas

La separación de las proteínas se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo con Laemmli (1970). Para tal fin se utilizó una cámara de electroforesis Mighty small II y geles de 1 mm de espesor. Un gel concentrador al 4% precede al gel separador al 8% de poliacrilamida. Las muestras a analizar fueron mezcladas con un volumen de amortiguador de carga 2X, el cual contenía Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20% y azul de bromofenol

0.05%. La migración de las proteínas se realizó a amperaje constante de 30 a 40 mA. Posteriormente se aplicó a los geles uno de los dos tratamientos siguientes:

- a) **Tinción de proteínas con azul de Coomassie.** Los geles se incubaron en una solución de ácido acético (10% v/v), metanol (50% v/v) y azul de Coomassie (0.125% v/v). Posteriormente se realizaron lavados con la solución I: ácido acético (10% v/v) y metanol (50% v/v) y posteriormente con la solución II: ácido acético (7 %) y metanol (5%), para remover el exceso de colorante.
- b) **Zimogramas de actividad teñidos con reactivo de Schiff.** Después de la electroforesis, los geles se lavaron tres veces a temperatura ambiente durante 30 minutos con solución amortiguadora de fosfatos pH 6 y Tween 80 (1% v/v) para replegar las enzimas. Posteriormente se incubaron en la misma solución adicionando sacarosa o rafinosa (100g/L) toda la noche a la misma temperatura. La actividad fue detectada por la aparición de bandas blancas correspondientes al polímero sintetizado por la enzima. El polímero fue fijado incubando los geles en una solución de etanol al 100% durante 30 minutos. Posteriormente, la oxidación de los grupos hidroxilo se llevo a cabo incubando una hora con una solución de ácido periódico al 0.7% v/v y ácido acético al 5% v/v. Después se realizaron tres lavados de 20 minutos cada uno con una solución de metabisulfito de sodio 0.2% p/v y ácido acético 5% v/v. Finalmente, el gel se puso en contacto con el reactivo de Schiff hasta la aparición de color. El exceso de colorante se eliminó lavando con una solución de metabisulfito de sodio 0.5% p/v y ácido acético 5% v/v.

2.4 Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se realizó por el método de Bradford (1976) usando el reactivo de Bio-Rad (Hércules, CA) teniendo como estándar albúmina sérica bovina (Bio-Rad).

2.5 Secuenciación de péptidos de la levansacarasa

Una levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F fue separada por SDS-PAGE y posteriormente una parte del gel fue teñido con azul de coomassie y otra tratada para observar la actividad *in situ*. Posteriormente la banda de interés fue cortada del gel teñido con azul de coomassie y sometida a una digestión por endoproteasas. Por medio de HPLC se separaron algunos péptidos internos para llevar a cabo su secuenciación, misma que se realizó en el laboratorio de microsecuenciación de proteínas del Instituto Pasteur, Francia.

2.6 Técnicas de biología molecular

2.6.1 Purificación de DNA genómico de *L. mesenteroides* NRRL B512F

La extracción de DNA genómico de *L. mesenteroides* NRRL B512F se realizó a partir de un cultivo de 50 ml que creció durante 12 horas en el medio de cultivo descrito en la tabla 1, utilizando glucosa como fuente de carbono. Las células se colectaron por centrifugación 10 minutos a 10000 rpm. La extracción se llevo a cabo por medio del kit de purificación: Microbial Genomic DNA isolation, Ultra Clean (MOBIO Laboratorios Inc) siguiendo las especificaciones del proveedor.

2.6.2 Purificación de DNA plasmídico

El DNA plasmídico de las construcciones expresadas heterológamente en *E. coli*, fue extraído empleando el kit High Pure Plasmid Isolation de Roche Diagnostics GmbH, siguiendo las indicaciones del proveedor. Se partió de un cultivo de 5 ml crecidos durante 12 horas en medio LB o YT2X, adicionando el antibiótico necesario para cada plásmido.

2.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los fragmentos de PCR durante el aislamiento del gen y para la preparación de las sondas se utilizó Taq DNA polimerasa (Roche Biochemical, Basel, Swizerland o invitrogen). Para las clonaciones en los vectores TOPO los productos de PCR fueron amplificados con Vent-pol y Expand High Fidelity.

En general, las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20µl con 100µM de dNTP's, 50 pM de oligonucleótidos, 2mM de MgCl₂ para el caso de Vent-pol, y el buffer indicado por el proveedor, finalmente se aforó con agua tetradestilada. Las reacciones se llevaron a cabo en un Termociclador RoboCycler gradient 96 Stratagene y/o en el termociclador Touchgene Gradient (TECHNE).

Los condiciones de amplificación de DNA dependieron de la enzima (Taq polimerasa, Vent-pol y Expand High Fidelity) utilizada. La temperatura de alineamiento depende de la T_m de los oligonucleótidos y el tiempo de extensión varía según el tamaño del fragmento a amplificar, aunque en términos generales se consideró 1 Kpb por minuto (Tabla2).

Tabla 2. Condiciones para la amplificación de los fragmentos de DNA.

No. De ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Desnaturalización	2 min	95 °C
	Desnaturalización	1 min	95 °C
25-35	Alineamiento	1 min	variable
	Extensión	variable	72°C
1	Extensión final	10 min	72°C

Los productos amplificados por PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 0.8% y teñidos con bromuro de etidio. Los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo cuya secuencia se muestra en la tabla 3 fueron sintetizados en la unidad de síntesis y secuenciación de macromoléculas del Instituto de Biotecnología-UNAM. Los oligonucleótidos degenerados Pep1 y Pep2 que se muestran en la tabla 3, fueron diseñados de los péptidos internos secuenciados a partir de la Levansacarasa, tomando en cuenta el uso preferencial de codones de *Leuconostoc mesenteroides*.

2.6.4. Construcción del banco genómico.

Como se describió anteriormente se extrajeron 30 µg de DNA genómico de *L. mesenteroides* NRRL B512F. Dicho DNA genómico fue fragmentado con un haz de nitrógeno por 40 segundos a 14 Psi con agitación leve. Después se trató con el fragmento Klenow de la T4 DNA polimerasa. Los fragmentos fueron fraccionados por tamaño en un intervalo de 2-5 Kpb a través de electroferesis en geles de agarosa, y fueron clonados en el vector pZERTM-2 (invitrogen) utilizando el sitio de restricción EcoRV.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el aislamiento del gen y las versiones truncadas de la levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Longitud
Pep1	GCWGATAATATTGCWWSWTTRAATCCAGAT	30
Pep2	WGTACCTTGWGCYAAAACWGTATCYAAAAC	31
1200C	AATAAGTGCTGATGGTAGAGC	21
43R	ACGTAAGTAATATGTGCCATCATTACC	27
Intergénica	GTTAACGCCATCATGATTGCG	21
Inicio	CACCCCATGGAGAAAAAAGTTAT	23
Direinicio	CACCATGAGAAAAAAGTTATATAA	24
Dire-SNT	CACCAAAAATGCTGATGGTAC	21
SinC-termR	AGTCCATGTACCTTGAGCTAA	21
Sin GBDR	CATATAATAACGGAACCCAGT	21

2.6.5. Hibridación de DNA

Para la hibridación en colonia (tipo Southern), el DNA de dicha colonia fue transferido a una membrana de nylon Hybond-N+ en donde se utilizó la siguiente solución de hibridación:

SSC	5X
Denhardt	5X
SDS	0.5% (p/v)

Durante una hora la membrana fue prehibridada a 65°C; posteriormente se adicionó la sonda marcada radiactivamente y se incubó durante 12 horas, después de las cuales, las sondas fueron lavadas. La sonda requerida se marcó radiactivamente con ³²P con el kit para marcaje de sondas random prime labelling system rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England).

Las señales provenientes de la radioactividad fueron detectadas exponiendo las membranas a una placa de detección "phosphor screen" (molecular dynamics).

2.6.6 Secuenciación

Las secuencias derivadas de este estudio fueron realizadas en el secuenciador automático Applied Biosystem 3100 en la unidad de secuenciación automática de DNA del Instituto de Biotecnología-UNAM (Cuernavaca, Morelos).

2.6.7 Transformación de *E. coli*

La transformación en *E. coli* fue llevada a cabo por 2 vías: por electroporación y por choque térmico. La primera vía se realizó en un electroporador Micropulser Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA.) a 2.5 Kv, 25 µF y 200 Ω. La mezcla de ligación y las células electrocompetentes fueron adicionadas a una celda de 0.2 mm. Después de la electroporación, la celda se colocó en hielo y se adicionó medio SOC. Finalmente la mezcla fue transferida a un tubo eppendorf e incubadas a 37°C y 250 rpm por 1 hora.

Para la transformación por choque térmico, se utilizaron células químico-competentes a las que se le adicionó la mezcla de ligación. Posteriormente fueron

incubadas en hielo durante 30 min (según especificaciones del proveedor) y sometidas a un choque térmico de 42 °C por 30 seg e inmediatamente colocadas en hielo. Por último, se adicionó medio SOC y se incubaron durante una hora a 37°C y 250 rpm.

Una vez transcurrido el tiempo para ambos casos, las células recuperadas fueron sembradas en cajas de LB sólido con el antibiótico requerido.

2.6.8 Construcción de los plásmidos de expresión para *levS* y sus versiones truncadas.

El vector TOPO pBAD/D (Invitrogen, Calsbad, CA) fue utilizado para la clonación y expresión del gen *levS* y sus versiones truncadas, bajo el control del promotor de arabinosa; este vector permite la fusión de una etiqueta de 6 histidinas en la región C-terminal y una proteína denominada tioredoxina, en la región amino-terminal.

Con los oligonucleótidos *inicio* y *43R* (tabla 3) se amplificó a partir del DNA genómico un fragmento de 3033 pb correspondiente al gen *levS*, a partir del cual se elaboraron diversas construcciones como a continuación de describe:

Eliminación de los dominios adyacentes:

- 1.- Una versión truncada sin la región C-terminal (SCT) fue amplificada por PCR con los oligonucleótidos *Direinicio* y *SinC-termR* del nucleótido 1 al 1890 los cuales corresponden del aminoácido 1 al 630. El producto de PCR fue clonado en el vector TOPO pBAD/D.
- 2.- Para la construcción de una versión sin el dominio N-terminal (SNT) se amplificó un fragmento de 2500 pb utilizando los oligonucleótidos *SinN-ter* y *43R*, que corresponden del nucleótido 552 al 3033 (o del aminoácido 185 al 1022).
- 3.- Se diseñó una tercera construcción constituida únicamente de la región catalítica, versión en la que se eliminaron el dominio N y C-terminal. Con los oligonucleótidos *SinN-term* y *SinC-termR* se amplificó un fragmento de 1338 pb del nucleótido 552-1890 los cuales corresponden al aminoácido 185 al 629.

4.-Finalmente se generó un fragmento constituido por el dominio C-terminal (GBD) formado del nucleótido 1890 al 3033. Con los oligonucleótidos *GBD* y *43R* se generó por PCR un fragmento de 1143 pb (del aminoácido 630 al 1022).

Todas las construcciones fueron secuenciadas para verificar que no hubiera errores y clonadas en el vector TOPO pBAD/D bajo el control del promotor de arabinosa y expresadas heterológicamente en *E. coli*.

2.6.9 Expresión piloto

A partir de una colonia de cada clona de *E. coli* conteniendo una construcción recombinante, se inocularon 5 ml de LB o YT2X con 50 µg/ml de kanamicina, y se cultivó durante 12 H a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (600 nm) de 1-2. Transcurrido el tiempo, se inocularon 4 tubos con 10 ml de medio LB ó YT2X conteniendo el antibiótico requerido, con 0.1 ml del cultivo y se crecieron en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀~0.5. Para la optimización de la inducción se utilizó un gradiente de concentración de arabinosa de 2%, 0.2%, 0.02% y 0.002%. Se cuantificó el nivel de inducción después de 4 h. En los cultivos el nivel de inducción se cuantificó después de 4 h de inducción.

2.7 Análisis de las secuencias

El uso preferencial de codones para *L. mesenteroides* se obtuvo a partir de la base de datos Codon Usage Database del kasuza DNA Research Institute, Japón (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

Las comparaciones de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos fueron realizadas con la base de datos Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Clustal W fue el algoritmo utilizado para realizar los alineamientos de las secuencias aminoacídicas.

La región promotora putativa fue localizada con el algoritmo Neural network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) y el péptido señal

hipotético fue predicho mediante el algoritmo descrito por Nielsen y colaboradores (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

2.8 Análisis filogenético de las fructosiltransferasas de *Leuconostoc*.

Las secuencias utilizadas en el análisis filogenético fueron obtenidas de la base de datos de proteínas (PDB). La identificación de los dominios conservados de las GTFs y FTFs se realizó con la base de datos de dominios conservados (CCD); de esta forma, se identificó la región catalítica con identidad a la familia 68 o 70 (FTF ó GTF respectivamente), usando como sonda LevS de *L. mesenteroides* NRRL B512F. Este grupo fue reducido a una colección de secuencias de proteínas no redundantes. Los alineamientos fueron realizados con Muscle v.3.5 (Edgar, y col. 2004). El análisis filogenético se realizó con el software Mr. Bayes v4.04 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) usando 5000 ciclos para producir 5000 árboles.

Las secuencias seleccionadas para realizar el árbol filogenético del dominio catalítico fueron: IS de *Leuconostoc citreum* (no. de acceso GenBank AAO25086); LEUM_1410 LS de *L. mesenteroides* (no. de acceso GenBank ABJ62503); LEUM_1409 LS de *L. mesenteroides* (no. de acceso GenBank ABJ62502); LEUM_1411 LS de *L. mesenteroides* (no. de acceso GenBank ABJ602504); LS de *Streptococcus salivarius* (no. de acceso GenBank Q55242); LS de *Streptococcus mutans* (no. de acceso GenBank B28551); LS de *Lactobacillus johnsonii* (no. de acceso GenBank AAS087349); LS de *Lactobacillus sanfranciscensis* (no. de acceso GenBank CAD48195); LS de *Lactobacillus reuteri* (no. de acceso GenBank AAO14618); LS de *Bacillus subtilis* (no. de acceso GenBank NP391325); LS de *Clostridium acetobutylicum* (no. de acceso GenBank. NP348397); LS de *Paenibacillus polymyxa* (no. de acceso GenBank CAB39327); LS de *Bacillus* sp (no. de acceso GenBank BAA32083); LS de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (no. de acceso GenBank Q43998); LS de *Bacillus amyloliquefaciens* (no. de acceso GenBank P21130); LS de *Rahnella aquatilis* (no. de acceso GenBank AAK14794); LS de *Pseudomonas syringae* (no. de acceso GenBank NP792124); LS de *Pseudomonas aurantiaca* (no. de acceso GenBank AAL09386); LS de *Leuconostoc mesenteroides* (no. de acceso GenBank AAT81165). Para el análisis de la región C-terminal las secuencias

fueron: LEUM_1410 LS de *L. mesenteroides* (no. de acceso GenBank ABJ62503); LEUM_1409 LS de *L. mesenteroides* (no. de acceso GenBank ABJ62502); LEUM_1411 LS de *L. mesenteroides* (no. de acceso GenBank ABJ602504); Lmes 02000893 Dsr de *L. mesenteroides* (GenBank accession no. ZP 00063307); DsrB de *L. mesenteroides* (no. de acceso GenBank AAB95453); DsrD de *L. mesenteroides* (no. de acceso GenBank AAG61158); DsrS de *L. mesenteroides* (no. de acceso GenBank AAD10952); GtfI de *Streptococcus sobrinus* (no. de acceso GenBank BAA09792); GtfU de *Streptococcus sobrinus* (no. de acceso GenBank BAC07268); GtfI de *Streptococcus mutans* (no. de acceso GenBank BAA26113); GtfI de *Streptococcus downei* (no. de acceso GenBank P11001). Para ambos casos el E-value fue menor a 0.0001.

2.9 Caracterización enzimática de LevS recombinante.

Los ensayos de actividad fructosiltransferasa se llevaron a cabo midiendo la liberación de azúcares reductores durante el proceso de reacción con 10% de sacarosa utilizando un amortiguador de fosfatos 50 mM 30°C. El método del ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) reportado por Summer (1934), fue utilizado para determinar el poder reductor.

2.9.1 Efecto de la temperatura, pH, CaCl₂ y EDTA en la actividad de LevS.

Para determinar el efecto de la temperatura en la actividad de levS de *L. mesenteroides* NRRL B512F se llevaron a cabo ensayos a diferentes temperaturas. El intervalo de temperatura utilizado fue de 20 a 40°C en buffer fosfatos 50 mM pH 6.0. El efecto de pH en la enzima se determinó variando el pH entre 5 y 8. La termoestabilidad fue expresada como actividad residual de la enzima a lo largo del tiempo y fue determinada incubando 5 U/ml de la enzima (5-7 mg de proteína) a 25, 30 y 35 °C en buffer fosfato de potasio 50 mM pH 6. El efecto de iones metálicos como el CaCl₂ y agentes quelantes (EDTA) fueron determinados en LevS incubado 1 U/ml de enzima con Ca²⁺ de 0 a 200 μM y 0 a 80 μM de EDTA.

2.9.2 Determinación de parámetros cinéticos.

Para determinar las constantes cinéticas se llevaron a cabo reacciones a 30°C con diferentes concentraciones de sustrato (14.6 a 584.8 mM), en presencia de 1mM de CaCl₂ y 1 U/ml de enzima. Los datos fueron procesados siguiendo el método de Lineweaver-Burk. Las velocidades iniciales de reacción, se midieron por la liberación de azúcares reductores en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 6; los azúcares se midieron de manera específica utilizando un equipo de HPLC marca Waters con un detector IR con una columna aminada a 35°C. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/agua en relación 75:25, con un flujo de 1.4 mL/ min. Las muestras a analizar fueron filtradas para retirar el polímero en filtros ACRODISCO GHP 13mm x 0.45 µm.

Para determinar las constantes cinéticas de las reacciones de hidrólisis y de transferencia, se consideró que para un tiempo determinado:

sacarosa total convertida = glucosa libre

sacarosa hidrolizada = fructosa libre

sacarosa empleada para transferencia = glucosa libre – fructosa

2.10 Reacciones de aceptor

La capacidad de la enzima para llevar a cabo reacciones de aceptor se analizó incubando en buffer de fosfato de potasio con 100 g/ L de sacarosa a 30 °C y pH 6.0, maltosa como aceptor, en relación másica aceptor/ sacarosa de 1. Las reacciones fueron centrifugadas y analizadas por HPLC empleando una columna aminada en las condiciones antes descritas.

2.11 Determinación del peso molecular del polímero.

Se analizó la distribución del peso molecular de los polímeros sintetizados por la fructosiltransferasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F así como el de las versiones truncadas. Para ello, el polímero fue precipitado con dos volúmenes de etanol, dializado y finalmente liofilizado. Posteriormente, las muestras de polímeros fueron fraccionadas por HPLC empleando una columna de permeación en gel Ultrahydrogel lineal 500 a una temperatura de 35°C. Se empleó como fase móvil nitrato de sodio 100 mM a flujo de 0.9 mL / min.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Identificación de la fructosiltransferasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F.

Leuconostoc mesenteroides NRRL B512F es una bacteria ampliamente estudiada, ya que se utiliza para producir la dextransacarasa, enzima que sintetiza dextrana a partir de la sacarosa. El polímero tiene diversas aplicaciones a nivel industrial principalmente en el área médica y de separación. Durante los años setentas Robyt y sus colaboradores reportaron la presencia de fructosiltransferasas, específicamente levansacarasa, durante la producción de la dextransacarasa obtenidas de la cepa industrial de *L. mesenteroides* NRRL B512F. En un reporte posterior Robyt y col. identificaron dos levansacarasa con un peso molecular de 116 y 92 kDa pero debido a sus niveles bajos de expresión no fue caracterizada.

La identificación de las FTFs en *L. mesenteroides* NRRL B512F fue llevada a cabo en el sobrenadante de la fermentación. Por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes teñidos con azul de coomassie (Fig. 5A) se logró primordialmente identificar 3 proteínas, la primera de 170 kDa, la segunda de 116 kDa y la última de 87 kDa.

La actividad glicosiltransferasa fue identificada en geles de actividad *in situ* incubados con sacarosa observándose 3 bandas de actividad como resultado de la síntesis de polímero, como se observa en la figura 5B. Posteriormente este mismo gel fue hidrolizado con dextransasa, encontrándose que la única banda hidrolizada fue la correspondiente a la de 170 kDa lo que permitió identificar a esta enzima como una dextransacarasa (Figura 5C). Para dilucidar si las otras dos enzimas de menor peso molecular son FTFs, se realizaron geles de actividad *in situ* utilizando rafinosa como sustrato, ya que este trisacárido es un sustrato específico para las fructosiltransferasas. En éste gel se observó la presencia de dos bandas con actividad fructosiltransferasa con un peso molecular de 116 y 87 kDa (Figura 5D), lo que permitió la identificación de todas las bandas de actividad transferasa del cultivo.

3.1.1 Aislamiento del gen *levS*

3.1.2 Aislamiento de la región central del gen *levS*

El primer paso para el aislamiento del gen *levS* fue la secuenciación parcial de la proteína de mayor peso molecular, 116 kDa, ya que por antecedentes del trabajo en el grupo se supuso que la proteína de 87 kDa podría ser resultado de la proteólisis presente en las glicosiltransferasas del género *Leuconostoc*. La proteína fue cortada del gel de poliacrilamida obtenido en condiciones desnaturalizantes teñida con azul de coomassie, y a partir de ella se secuenciaron al azar dos péptidos de los fragmentos obtenidos por hidrólisis con una endoproteasa como se describe en materiales y métodos.

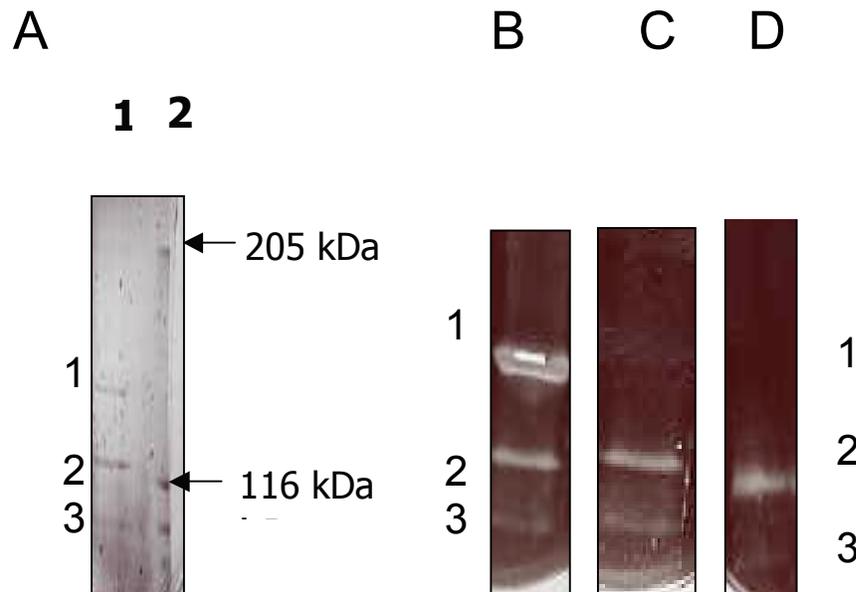


Figura 5. Identificación de las glicosiltransferasas de *L. mesenteroides* NNRL B512F por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida. A) Gel teñido con azul de coomassie carril 1; sobrenadante de la fermentación, carril 2: marcador de peso molecular. B) Zimograma de actividad incubado con 5% de sacarosa. C) Zimograma de actividad hidrolizado con dextranasa y D) Zimograma de actividad incubado con 5% de rafinosa.

Como resultado de la secuenciación se obtuvieron dos péptidos de 15 aa cada uno con la siguiente secuencia: DVADNIASLNPDTSV y VLDTVLAQGTXYDG. Estas secuencias fueron analizadas en la base de datos BLAST verificándose que correspondían la secuencia presentes en FTFs. A partir de la secuencia de estos péptidos se diseñaron dos oligonucleótidos degenerados (*Pep1* y *Pep2*).

Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 1211 pb utilizando *Pep1*, *Pep2* y DNA cromosomal de *L. mesenteroides* NRRL B512F como templado, dicho fragmento fue denominado sonda A (Figura 6B).

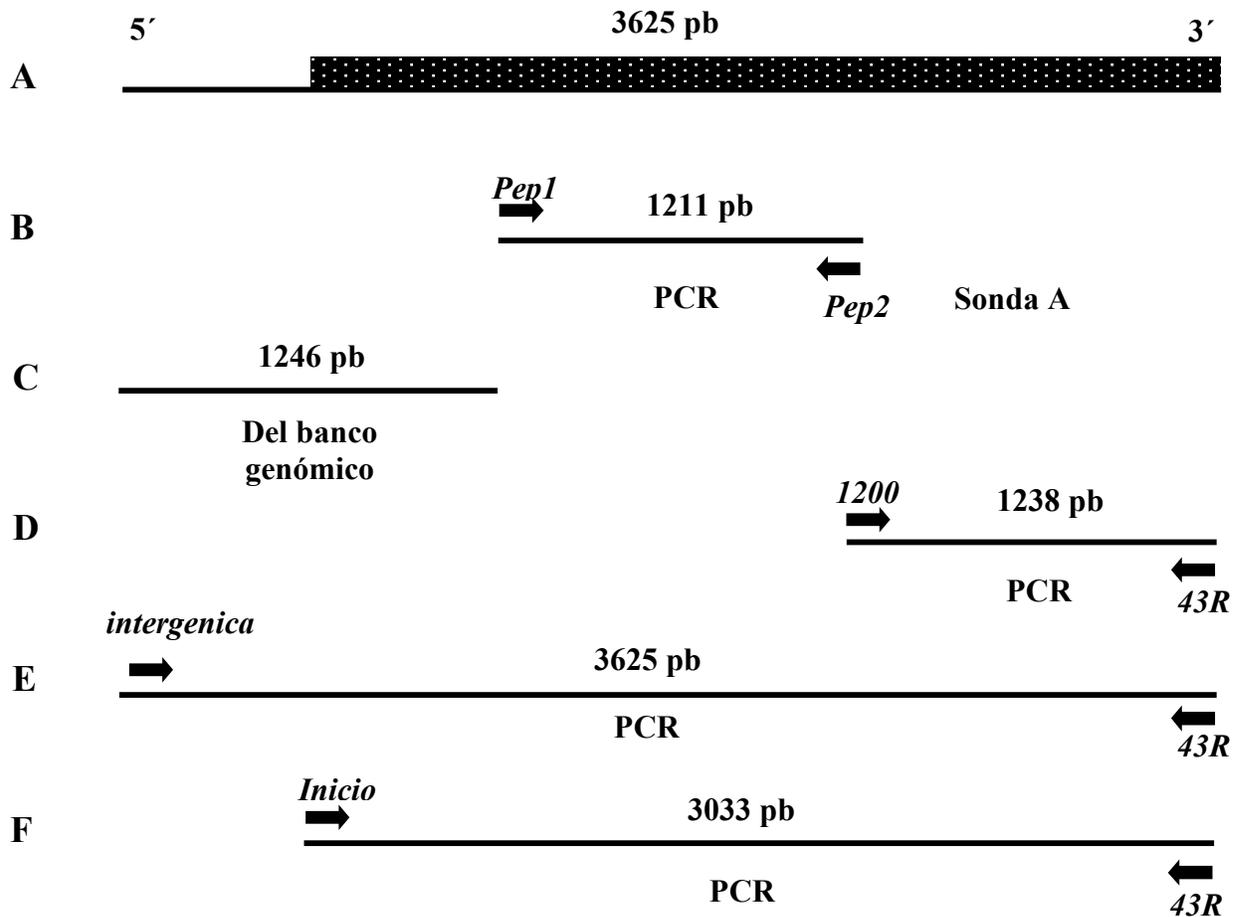


Figura 6. Estrategia utilizada para el aislamiento del gen *levS* de *L. mesenteroides* NRRL B512F.

El análisis tipo BLAST de la secuencia aminoacídica obtenida de la sonda A, mostró identidad con la región catalítica de varias FTFs como la de *Bacillus subtilis* (46%), *Lactobacillus reuteri* (48%), *Streptococcus salivarius* (47%), *Streptococcus mutans* (51%), *Lactobacillus reuteri* (51%), *Leuconostoc citreum* (51%), confirmando que este fragmento pertenecía a una FTF.

3.1.3 Aislamiento de la región 5' del gen *levS*

Para realizar el aislamiento de las regiones 5' y 3' faltantes del gen *levS*, se generó un banco genómico de *L. mesenteroides* NRRL B512F. Las clonas generadas del banco genómico fueron hibridadas mediante un análisis tipo southern blot utilizando la sonda A marcada radiactivamente con ^{32}P . Como se observa en la figura 7, dos clonas (38 y 65) hibridaron con la sonda A. Una vez secuenciadas, se encontró que éstas clonas contenían, además del fragmento usado como sonda, un fragmento de 1246 pb, en el que se localizó la región 5' del gen así como la región promotora.

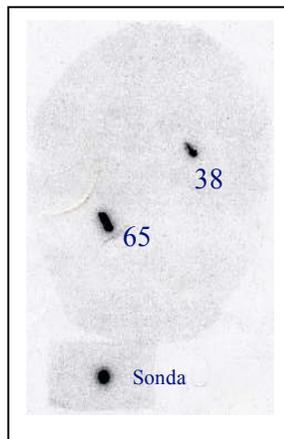


Figura 7. Análisis tipo Southern blot realizado con el banco genómico de *L. mesenteroides* NRRL B512F utilizando la sonda A marcada radiactivamente mostrada en la parte inferior de la figura.

3.1.4 Aislamiento de la región 3' del gen *levS*

Cuando el desarrollo del proyecto se encontraba en esta etapa la secuencia del genoma de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATTC 8293 fue liberada. Como se

describirá mas tarde, tres levansacararas hipotéticas fueron identificadas en el genoma. En base a la homología de la región 3' de estos genes se diseñó un oligonucleótido para obtener la región 3' codificante del gen LevS. Con el oligonucleótido *1200C* de la región 3' de la sonda A y *43R* correspondiente a la región final de una de las FTFs hipotéticas (Lmes 02002054), se amplificó por PCR un fragmento de 1238 pb utilizando DNA cromosomal de *L. mesenteroides* NRRL B512F como templado. Posteriormente, un fragmento de DNA de 3625 pb conteniendo el gen completo y la región promotora hipotética, fue obtenido por amplificación con el oligonucleótido *intergénica* diseñado de la secuencia obtenida de ésta ultima región y el oligonucleótido *43R*.

Finalmente, se diseñó un oligonucleótido *inicio* (Tabla 3) y en conjunto con el *43R* se amplificó por PCR un producto de 3033 pb, el cual corresponde al ORF completo.

3.2. Análisis de la secuencia nucleotídica de levS de *L. mesenteroides* NRRL B512F

El análisis de la secuencia del gen *levS* mostró un marco de lectura abierto (ORF) de 3066 pb iniciando en el nucleótido 557 a partir del ATG. Este ORF codifica para una FTF hipotética que fue nombrada LevS. De acuerdo con la secuencia de nucleótidos, el gen *levS* contiene 37% de G+C. El gen está precedido por una secuencia consenso del sitio de unión a ribosoma (RBS) GGAGAG, localizado 5 pb arriba del codon de inicio ATG.

Con el algoritmo Neural Network Promoter Prediction se encontraron las secuencias hipotéticas de -10 ATGATA -10 n -35 TGTAAT, localizadas 53 nucleótidos río arriba del ATG. La secuencia del gen *levS* así como de la proteína se muestran en el anexo I.

3.3 Análisis de la secuencia de aminoácidos de LevS

El gen *levS* codifica para una proteína hipotética de 1022 aminoácidos con una masa molecular teórica de 113, 410 y un punto isoelectrico de 4.74. A través de un análisis BLAST llevado a cabo con la secuencia aminoácida se encontró que LevS de *L. mesenteroides* NRRL B512F es una proteína mosaico con tres dominios con características estructurales de glucosiltransferasas y fructosiltransferasas, un fenómeno similar al reportado para la inulosacarasa (IslA), una fructosiltransferasa de *L. citreum* (Olivares y col., 2003). El dominio N-terminal de LevS está formado por 184 aminoácidos e incluye el péptido señal y una región conocida en las GTFs como la región variable. Este dominio está seguido por la región catalítica constituida por 445 aminoácidos y un tercer dominio en la región C-terminal formada por 392 aminoácidos (Figura 8). La presencia de estos dominios adicionales explica el peso molecular inusual que presenta esta fructosiltransferasa.



Figura 8. Representación esquemática de la estructura primaria de LevS de *L. mesenteroides* NRRL B512F.

3.3.1.1 Fructosiltransferasas en *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293.

Del análisis de la secuencia de LevS se encontró que presenta una alta identidad con las tres proteínas en el genoma de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/leume/leume.home.html). Con el análisis por BLAST encontramos que estas tres enzimas hipotéticas (Lmes02002054, Lmes02002055 y Lmes02002058) son similares a varias FTFs y presentan un 70% de identidad entre ellas. Los pesos moleculares predichos son 112 444, 111 575 y 111 377 kDa los cuales corresponden a 1025, 1009 y 1002 aminoácidos respectivamente. De forma sorprendente

encontramos que estas proteínas tienen similitud en su región C-terminal al dominio de unión a glucano de las GTFs.

Al liberar por completo el genoma de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* ATCC 8293 la clave de referencia originalmente asignada Lmes02002054, Lmes02002055 y Lmes02002058 fue modificada a LEUM_1410, LEUM_1409 y LEUM_1411, respectivamente. Los genes que codifican para LEUM_1410 y LEUM_1411 fueron aislados, clonados y expresados en *E. coli*. Las enzimas recombinantes fueron denominadas LevC y LevL y su caracterización demostró que son fructosiltransferasas (Olvera y col. 2006).

En la figura 9, se puede observar el esquema de la estructura primaria en el que se compara de manera global a las glucosil- y fructosiltransferasas, y en el que los dominios comunes comparten el mismo color. La presencia de 5 enzimas: LevS, IslA, LevC, LevL y LEUM_1410 con características de glucosil y fructosiltransferasas en la especie de *Leuconostoc*, nos permite concluir que se trata de una nueva sub-familia de fructosiltransferasas.

3.3.2 Análisis de la región amino terminal de LevS.

La secuencia de aminoácidos de la región amino terminal de LevS mostró un probable péptido señal con un sitio de división entre el aminoácido 30 y 31, esto de acuerdo al algoritmo diseñado por Nielsen y col., 1997 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). El péptido señal hipotético es similar al que presentan la FTF hipotética LEUM_1409 (94%), LevL (85%), así como también con la IS de *L. citreum* (82%). Debido al alto nivel de identidad que presentan en esta región, podemos sugerir que estas enzimas comparten la misma ruta de secreción en *Leuconostoc*. El dominio N-terminal incluye una región variable constituida por 153 aminoácidos, la cual es una región que no está conservada entre las GTF y cuya función es desconocida. La inulosacarasa de *L. citreum* presenta unidades de repetición en esta zona pero en LevS no se encontraron dichas unidades. Recientemente Olvera y col., reportaron la presencia de unidades repetidas en LevC una FTF de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* ATCC 8293 aunque hasta el momento no se sabe cual es la función de dichas unidades de repetición. En esta región variable, LevS muestra similitud a dos FTFs hipotéticas LEUM_1409 (32%), LevC (68%). Es interesante señalar que a través de

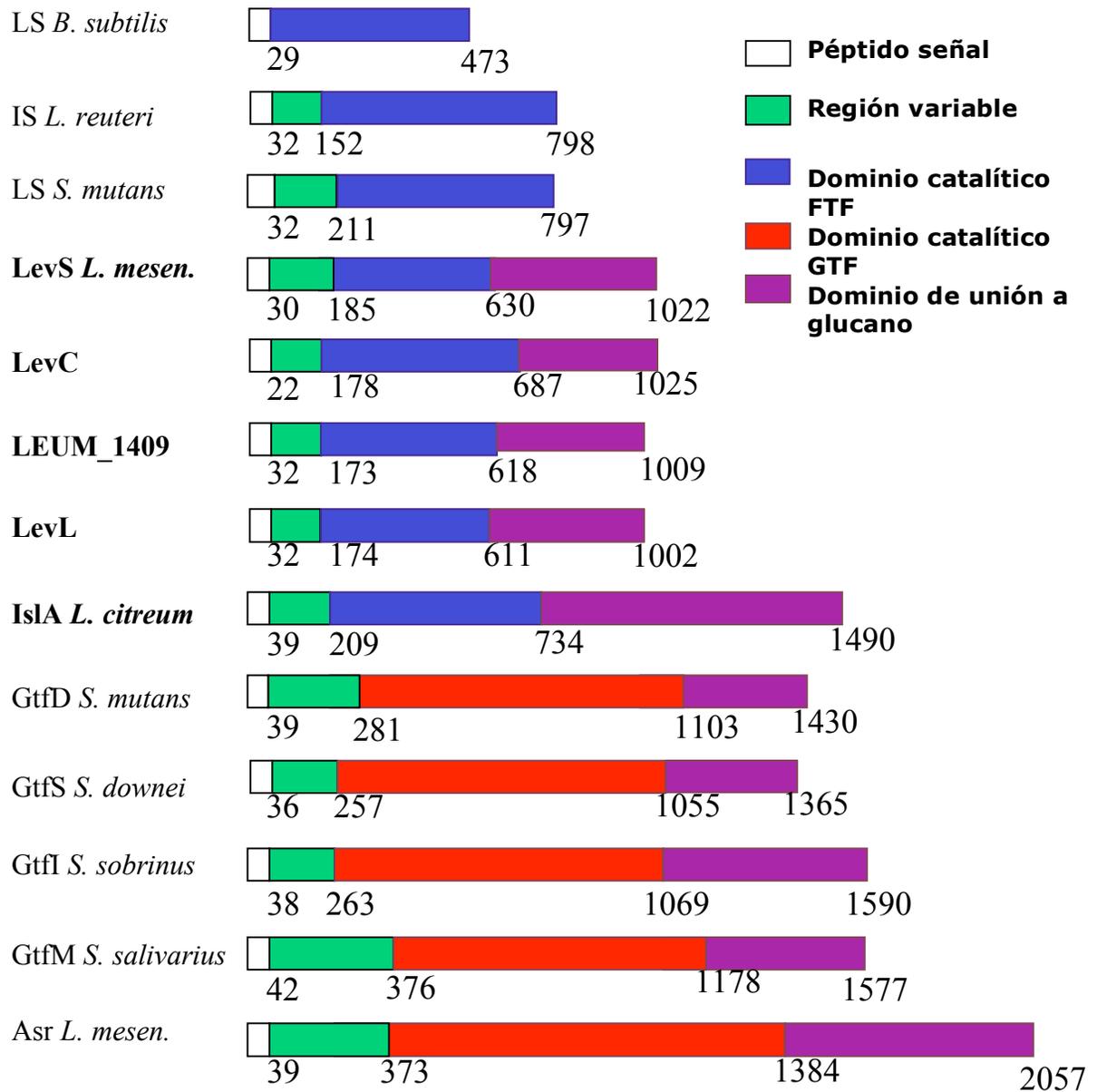


Figura 9. Comparación esquemática de la estructura primaria de las FTFs de *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus reuteri*, *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, en el que se incluye a varias glucosiltransferasas de *Streptococcus* y *Leuconostoc mesenteroides*, con las que comparten los dominios N y C-terminal.

un comparación de tipo PHI-BLAST se encontró que esta región de LevS tiene un 25% de identidad con dextranasa de *L. mesenteroides*.

3.3.3 Dominio catalítico de LevS.

El dominio catalítico de LevS está formado por 446 aminoácidos, 80 aa mas corto que la inulosacarasa de *L. citreum*, y presenta 87% identidad con LevC, 84% con la hipotética LEUM_1409 y con LevL 64%. LevS tiene un 50% de similitud con la IS de *L. citreum* (Olivares y col., 2003), 49% con la IS de *L. reuteri* (Van Hijum y col., 2002) y un 49% con la LS de *S. mutans* (Shiroza y Kuramitsu, 1988). Una similitud más baja, de alrededor del 25%, se encontró con diversas levansacarasa de bacterias Gram. negativas así como para la levansacarasa de *L. mesenteroides* (Kang y col., 2005). El dominio catalítico conserva los aminoácidos esenciales para la actividad enzimática identificados en la levansacarasa de *B. subtilis* (Meng y Futterer, 2003) y que corresponden en LevS a los ácidos aspárticos 247, 342 y al ácido glutámico 497.

3.3.4 Análisis de la región C-terminal de LevS.

El dominio C-terminal de LevS está formado por 392 aminoácidos y presenta 98% de identidad con LevC, 89% con LevL y 89% con la FTF hipotética LEUM_1409. Además presenta un 25% identidad con el dominio de unión a glucano de glucosiltransferasas de *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, y con la dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides*.

Una característica particular del dominio de unión a glucano de las GTFs es la presencia de unidades repetidas (Rusell y col., 1990), las cuales fueron descritas por primera vez en *Streptococcus sobrinus* (Ferreti y col., 1987), habiéndose ubicado fundamentalmente cuatro elementos de repetición A, B, C y D. En LevS fueron identificados tres elementos de repetición de 90 aminoácidos con un 75% de identidad entre ellos (Figura 10). Se trata de unidades de repetición dos veces mas grandes, que las reportadas en las repetidas de las GTFs.

Como se observó en el análisis de versiones truncadas de la inulosacarasa (Olivares y col., 2003) de *L. citreum*, se ha propuesto que esta región ha sido adquirida en

Leuconostoc por recombinación y que la adquisición no sólo estabiliza la enzima sino que permite también modificar su especificidad, en lo que al nivel de hidrólisis se refiere. Otra posibilidad es que la región C-terminal de LevS, pueda también estar involucrada en la unión de polímero (dextrana o levana) ya que *L. mesenteroides* NRRL B512F produce ambos polímeros. Sin embargo, estas hipótesis requieren de experimentos adicionales pues aún no es clara la función de estos dominios incluso en las GTFs.

```

768  NNQWYWFESG  KKYTGFRYYM  GTYYFFETGQ  RQESKWETAW  GMKYYVGTDG  817
858  NGGYNWFENG  KPYTGFRYYE  GTYYWVFNQV  RQNAGWREAW  GMKYYTDASG  907
948  NGGYNWFENG  KPYTGFRYYM  GTYYWVFNQV  RQNAGWREAW  GKKYYTDANG  997

818  RAVQGVQIID  GQAYDFGTNG  TFNLKGTASG  YLYSPSLSTA  857
908  RALQGIQIID  GQAYDFGTNG  TYNLKSAASG  YLYSPSYSKA  947
998  RALQGIQKID  GQYVDFGNDG  TYYLR~~~~~  ~~~~~~  1022

```

Figura 10. Alineamiento de los tres elementos de repetición en el dominio C-terminal de LevS de *L. mesenteroides* NRRL B512F.

3.4 Análisis filogenético de las glicosiltransferasas de *Leuconostoc*.

Un análisis filogenético de la región catalítica y C-terminal de las fructosiltransferasas del género *Leuconostoc* fue llevado a cabo de forma independiente, dado su carácter heterogéneo. La compilación de todas las secuencias de la región catalítica de las FTFs y sus relaciones filogenéticas son mostradas en la figura 11. Se formaron cuatro grupos de FTFs de bacterias al comparar su dominio catalítico: 1) Bacterias Gram. negativas incluyendo a la M1FT de *L. mesenteroides*; 2) *Bacillus* y *Clostridium*, 3) *Lactobacilli* y *Streptococci* y 4) *Leuconostoc*.

Esta distribución sugiere que el dominio catalítico de Isla de *L. citreum* divergió antes que las levansacarasas de *L. mesenteroides* pero no antes que las enzimas de *Streptococcus* y *Bacillus*. Sorprendentemente, la levansacarasa M1FT de *L. mesenteroides* B512 FMC fue agrupada con las bacterias Gram negativas en el primer grupo. Esta enzima presenta un 95% de identidad y 97% de similitud con la levansacarasa de *P. aurantiaca* y un 74% de identidad con *P. syringae* sugiriendo que esto podría ser resultado de una transferencia

horizontal o más probablemente una contaminación genómica en el laboratorio de Kang y col., ya que un marco de lectura abierto similar al gen M1FT no está presente en el genoma de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293.

Las relaciones filogenéticas de la región C-terminal de las FTFs y GTFs pueden ser observadas en la figura 12. En este caso, tres grupos son claramente formados: 1) GTFs de *Leuconostoc* spp., 2) GTFs de *Streptococcus* spp. y 3) FTFs de *Leuconostoc* spp. De acuerdo con la secuencia de su C-terminal las FTFs de *L. mesenteroides* pertenecen a un grupo muy distante de las GTFs de *Streptococcus* y *Leuconostoc*. Esta distribución sugiere que aunque todas ellas comparten un ancestro común, la región C-terminal de las FTFs divergió hace mucho tiempo del C-terminal de las GTFs. La región C-terminal de la inulosacarasa de *L. citreum* tiene un 80% de identidad con la misma región de la alternansacarasa; de manera interesante, ambos dominios de unión a glucano de la alternansacarasa e inulosacarasa tienen porcentajes de identidad bajos con los dominios de unión a glucano reportados para otras glucansacarosas, motivo por el cual no se pudieron agrupar en este árbol.

Con base en la estructura de LevS, de las FTFs hipotéticas en *L. mesenteroides* y de la Isla de *L. citreum* así como del resultado del análisis filogenético es posible proponer la existencia de un nuevo grupo de fructosiltransferasas mosaico las cuales combinan dominios estructurales de fructosiltransferasas y glucosiltransferasas.

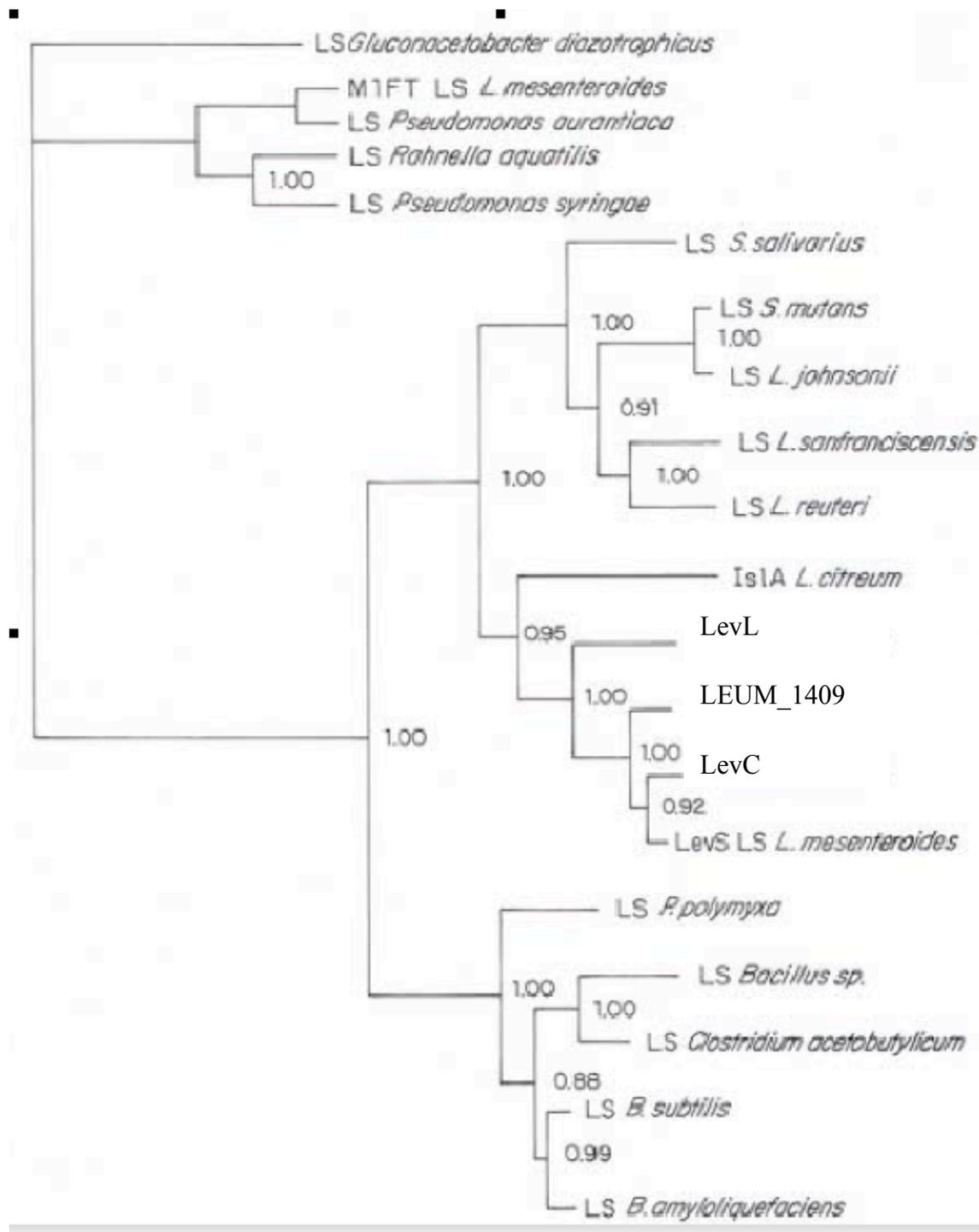


Figura 11. Análisis filogenético del dominio catalítico de 20 diferentes levansacarasas seleccionadas por BLASTP.

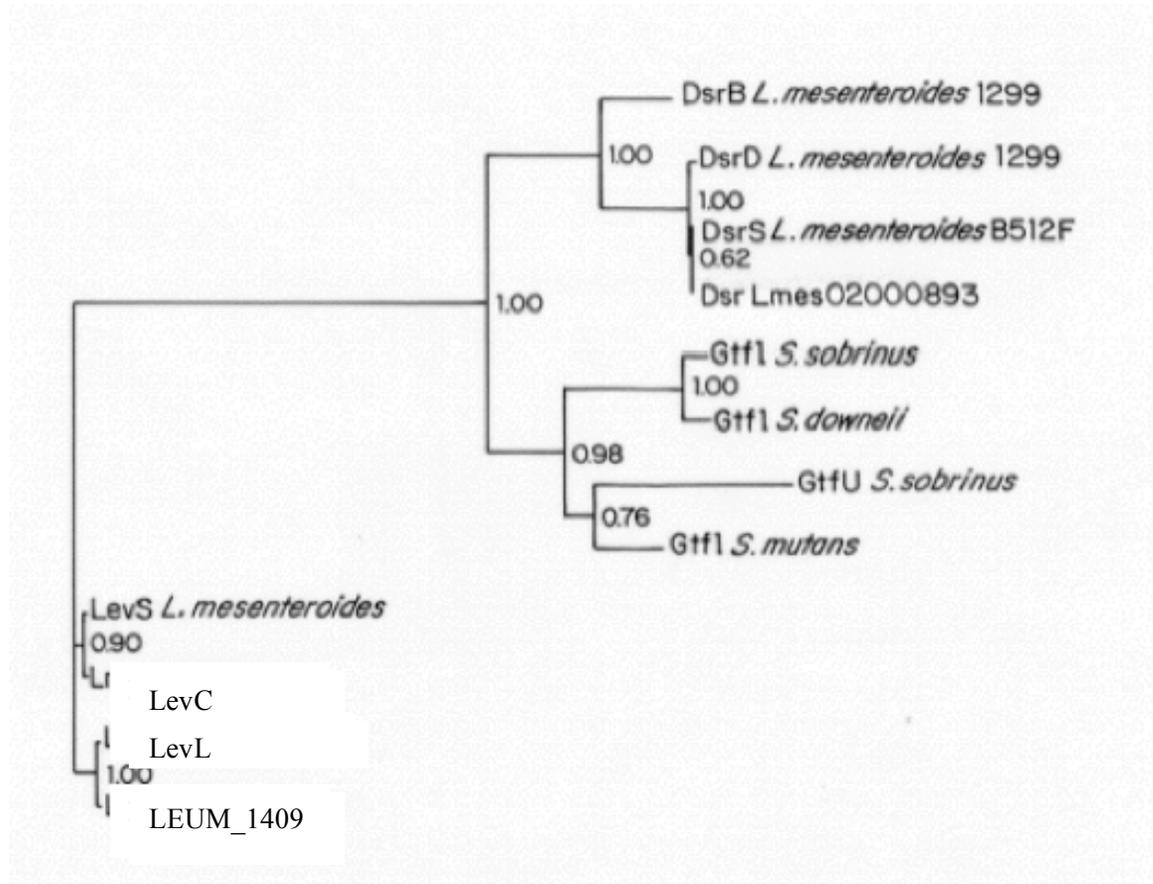


Figura 12. Análisis filogenético del dominio de unión a glucano de glicosiltransferasas de *Streptococcus* y *Leuconostoc*.

3.5 Expresión de *levS* en *E. coli*.

El gen *levS* constituido de 3066 pb, fue clonado en un vector de expresión en *E. coli* en la cepa Top10 bajo el control de un promotor inducible (*araBAD*). La actividad FTF fue determinada en presencia de sacarosa, midiendo la liberación de azúcares reductores en el extracto celular. Por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, se identificó en una primera instancia a LevS de acuerdo con el peso molecular esperado de 130 kDa en el extracto celular obtenido (figura 13A). La enzima recombinante también fue identificada por la producción del polímero *in situ* a través de geles de poliacrilamida. Se observó igualmente que la enzima es susceptible a degradación proteolítica dada la presencia de al menos seis bandas con actividad FTF observadas en el

intervalo de 90 a 130 kDa (figura 13C). Dicha degradación proteolítica es un problema común en las glicosiltransferasas que sólo se atenúa en presencia de inhibidores de proteasas, sin que logre eliminarse del todo.

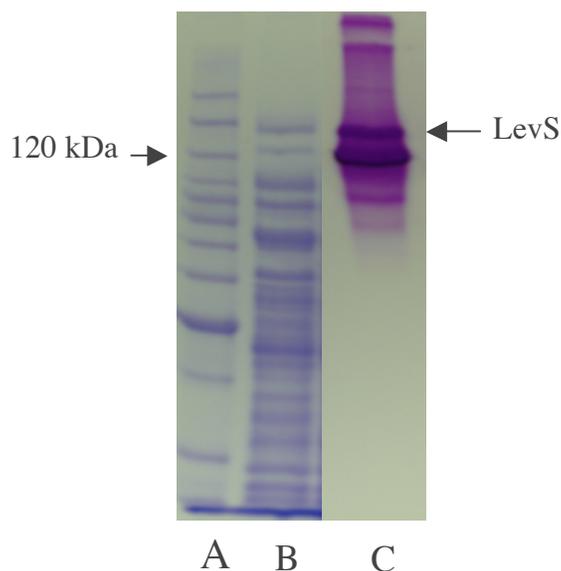
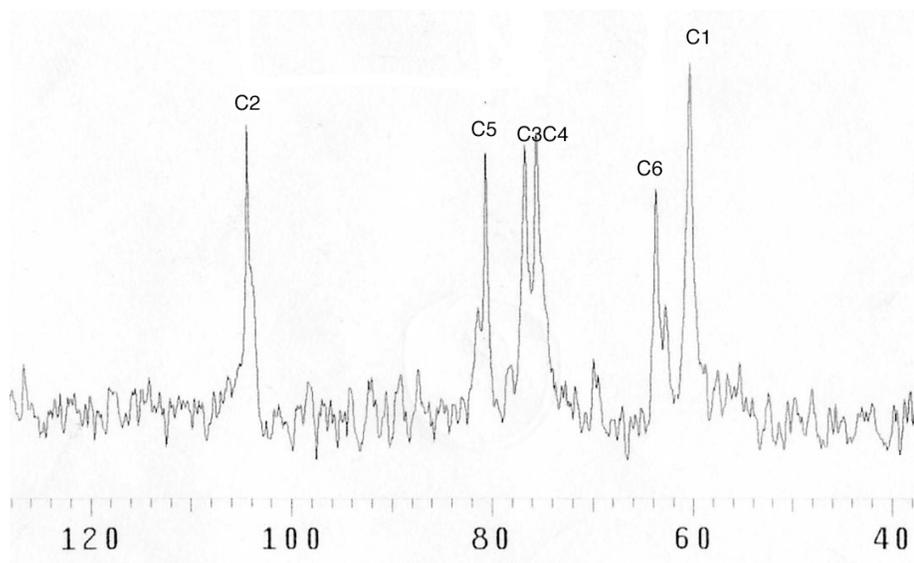


Figura 13. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en el que se puede observar la expresión heteróloga de LevS en *E. coli*. A) marcador de peso molecular, B) gel teñido con azul de coomasie y C) zimograma de actividad.

3.6 Identificación del polímero producido por LevS.

La identificación de la estructura del polímero producido por la proteína recombinante fue realizado por resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C . Como puede observarse en la figura 14A, seis principales desplazamientos fueron detectados en el espectro de resonancia de ^{13}C a 104.3, 80.453, 76.513, 75.391, 63.57 y 60.145 ppm. De acuerdo con reportes previos de RMN (Van Hijum y col., 2004), estas señales corresponden a las que emite la levana. En efecto, los desplazamientos obtenidos con el polímero son muy similares a los que genera la levana de *S. mutans* (Shimamura y col., 1987) pero difieren de la levana producida por M1FT de *L. mesenteroides* NRRL B-512FMC (Kang y col., 2005) donde una diferencia en el desplazamiento identificado para el C-2 se encuentra a 109.1 ppm en lugar de 104.3 ppm. Este análisis se encuentra detallado en la figura 14B.

A



B

Atomo de carbono	desplazamientos químicos (ppm)		
	<i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F	<i>S. mutans</i>	<i>L. mesenteroides</i> NRRL B512FMC
C-1	60.2	60.7	60.5
C-2	104.3	104.2	109.1
C-3	76.5	76.3	76.5
C-4	75.4	75.2	75.4
C-5	80.5	80.3	80.7
C-6	63.6	63.4	63.6

Figura 14. Espectro de resonancia magnética nuclear de levana producida por la levansacarasa (LevS) de *L. mesenteroides* NRRL B512F expresada en *E. coli* (A) y comparación de desplazamientos químicos de varias fructanas (B).

3.7 Caracterización bioquímica de LevS

La proteólisis es un fenómeno común que se ha observado en las glicosiltransferasas de *Leuconostoc*, aún en presencia de inhibidores de proteasas por lo que el proceso de purificación resulta un problema muy complejo. Sin embargo, en geles de poliacrilamida se observó que en extractos enzimáticos frescos la degradación proteolítica no es aún muy intensa por lo que la caracterización bioquímica se llevó a cabo en tales condiciones.

3.7.1 Efecto del pH, temperatura, CaCl₂ y EDTA en la actividad de LevS

Varias propiedades de la enzima fueron examinadas para encontrar las mejores condiciones de funcionamiento.

3.7.1.1 Perfil de pH y temperatura.

Al realizarse el perfil de pH se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 15, encontrándose que para LevS el pH óptimo es de 6, el cual es similar con lo reportado para las levansacararas de varias fuentes como *B. subtilis* (Ammar y col., 2002), *L. mesenteroides* (M1FT) (Kang y col., 2005), *Z. mobilis* (Yanase y col., 1992) y *S. salivarius* (Jacques y col., 1993), mientras que la *L. sanfranciscensis* tiene un pH óptimo de 5.4 (Tieking y col., 2005).

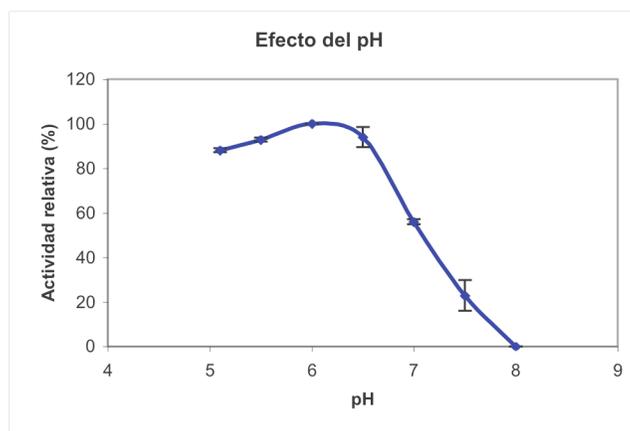


Figura 15. Perfil de actividad en función del pH para la enzima recombinante LevS.

Se estudió la influencia de la temperatura en la actividad de LevS encontrándose que se pierde rápidamente por arriba de los 35⁰C, desactivándose completamente a 40⁰C como se muestra en la figura 16. La temperatura óptima para LevS fue de 30-35⁰C dato similar al encontrado para las levansacararas recombinantes expresadas en *E. coli* de *R.*

aquatilis (Kim y col., 2001) y *L. mesenteroides* (M1FT) (Kang y col., 2005). Se han reportado temperaturas óptimas mas altas para otras enzimas, dentro de las cuales destacan *L. reuteri* cuyo óptimo alcanza los 50⁰C (Ozimek y col., 2005); los 35-45⁰C en los que opera la enzima de *L. sanfranciscensis* de forma óptima (Tieking y col., 2005), y los 60⁰C de la enzima de *Bacillus* spp (Ammar y col., 2002). LevS es muy estable a 35⁰C en la que la vida media es de 2h mientras que a 25 y 30⁰C toda la actividad se mantiene aún después de 10 h de incubación.

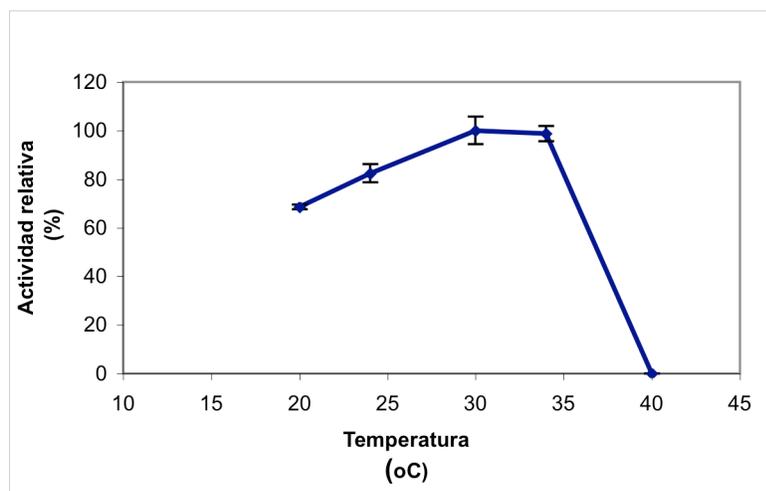


Figura 16. Efecto de la temperatura en la actividad levansacarasa de LevS.

3.7.1.2 Efecto del CaCl₂ y EDTA en LevS.

Se examinó el efecto del ion calcio y del EDTA en la LevS recombinante adicionando diferentes concentraciones de EDTA en un intervalo de 0 a 80 μ M (Figura 17), así como de Ca²⁺ de 0 a 200 μ M (Figura 18). Es interesante observar que la actividad de la enzima baja cuando se incrementa la concentración de EDTA, alcanzando una reducción del 90% a 50 μ M de EDTA. Una actividad residual igualmente baja se observó cuando en la solución contenía 80 μ M de EDTA, pero se pierde completamente con 1mM de EDTA. Se han reportado resultados similares para la LS de *S. salivarius* (Song y Jacques, 1999), donde con 1 mM de EDTA redujo la actividad enzimática hasta un 83%. Sin embargo, la levansacarasa de *L. reuteri* (Ozimek y col., 2005) y de *L. mesenteroides* (M1FT) (Kang y

col., 2005) no se ven tan afectadas ya que pierden únicamente del 10 al 20% de la actividad inicial en presencia de 1 mM de EDTA.

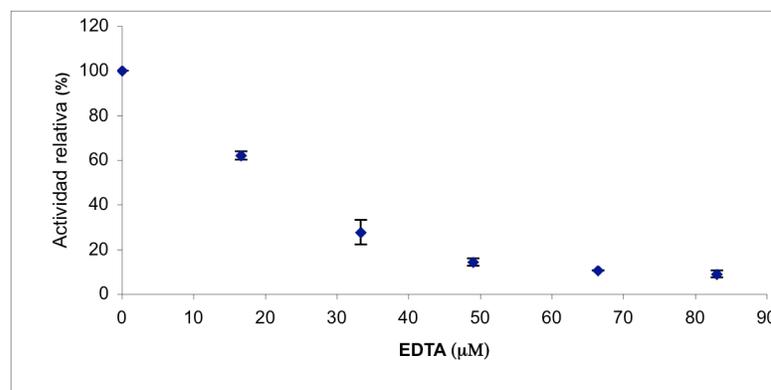


Figura 17. Efecto del EDTA en la actividad levansacarasa. Los ensayos fueron llevados a cabo a 30°C en buffer fosfatos pH 6, con 300 mM de sacarosa.

Para estudiar el efecto de los iones calcio, se adicionó 50 μM de EDTA al medio de reacción. Posteriormente, la concentración de iones Ca²⁺ fue incrementada y la actividad fue medida después de 15 min. Como puede observarse en la figura 18, se encontró una activación de LevS recombinante con 100 μM de Ca²⁺, donde se obtuvo una recuperación superior al 100% de la actividad, probablemente debido a deficiencias de Ca en la preparación original.

Se ha sugerido en la estructura tridimensional de la levansacarasa de *B. subtilis*, (Meng & Futerer) la presencia de un sitio de unión a Ca²⁺, sin embargo es un hecho que, el papel que desempeña este ion no es en la catálisis. Se ha demostrado que el Ca²⁺ y otros cationes son capaces de cambiar el equilibrio del estado desplegado de la proteína a plegado y de esta forma estabiliza a la enzima. En la levansacarasa e inulosacarasa de *L. reuteri* (Ozymek y col., 2005) el ion calcio es también un agente estabilizador.

Se estudió la termoestabilidad de LevS recombinante en presencia de 1mM de Ca²⁺ a 35°C, donde la vida media de la enzima se incrementó un 35% (2.7 h) en presencia de Ca²⁺. Un efecto similar ya fue reportado por Ozymek y col., (2005), quienes encontraron un incremento de actividad del 30% para la levansacarasa de *L. reuteri* a 50°C.

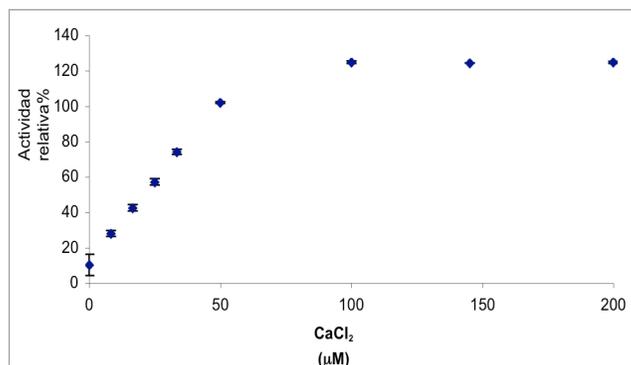


Figura 18. Efecto de activación de LevS con CaCl₂.

3.7.2 Propiedades cinéticas de LevS.

Cuando se analizó el comportamiento de la enzima en términos de la actividad total (consumo de sacarosa), se encontró que la levansacarasa recombinante mostró una cinética de tipo Michaelis-Menten. Los valores de K_m y V_{max} fueron determinados por experimentos clásicos midiendo velocidades iniciales y calculados a partir de las gráficas de Lineweaver-Burk (figura 19), resultaron ser 36.7 ± 5.4 mM y $7.5 \pm$ U/mg, respectivamente. El valor de K_m es similar a los valores reportados para otras levansacarosas tales como *G. diazotrophicus* (11.8 mM) (Hernández y col., 1995), *L. mesenteroides* (M1FT) (26.6 mM) (Kang y col., 2005), *L. sanfranciscensis* (13.1 mM) (Tieking y col., 2005) y *R. aquatilis* (50 mM) (Kim y col., 2001). Sin embargo, para las levansacarosas de *Z. mobilis* (Yanase y col., 1992) y *P. syringae* (Hettwer and Gross, 1995) se han reportado valores de K_m mas altos (160 y 122 mM respectivamente). Por otro lado, y en lo relativo a la especificidad de la enzima, a concentraciones altas de sacarosa (0.5 M) la actividad de la enzima es principalmente de síntesis de levana, aunque aún a concentraciones tan altas como 0.875 M, se mantiene un 25% de la actividad hidrolítica.

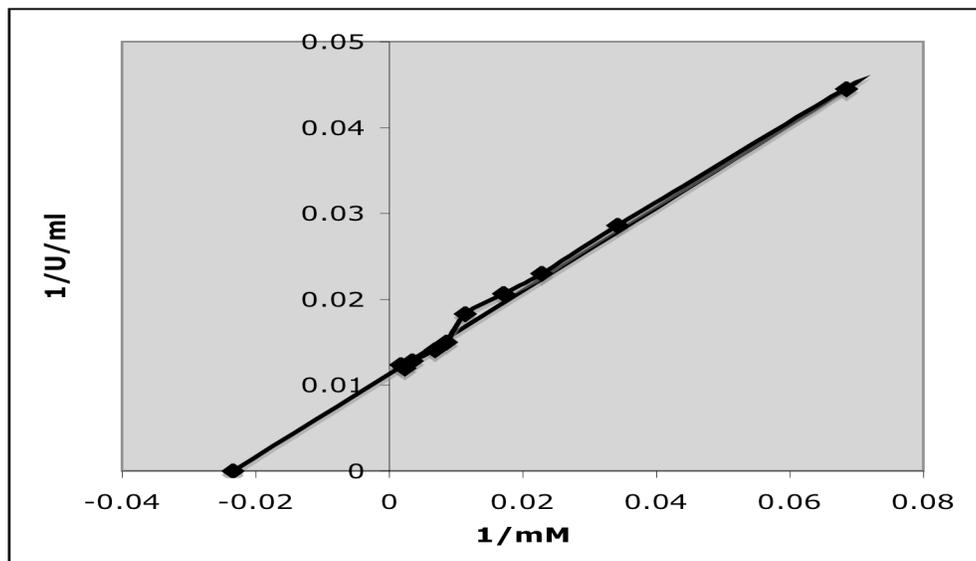


Figura 19. Regresión lineal a través del método de Lineweaver-Burk para las determinaciones de las constantes cinéticas de LevS.

El trabajo hasta aquí descrito, fue publicado en la revista *Gene* **376** 59-57 en el 2006 (Anexo 2).

3.8 Construcción de versiones truncadas de LevS.

Para investigar los efectos de los dominios adicionales (amino y carboxi terminal) de LevS como una función de la actividad y propiedades, se construyeron cuatro variantes truncadas. El diseño de éstas puede observarse de la figura 20.

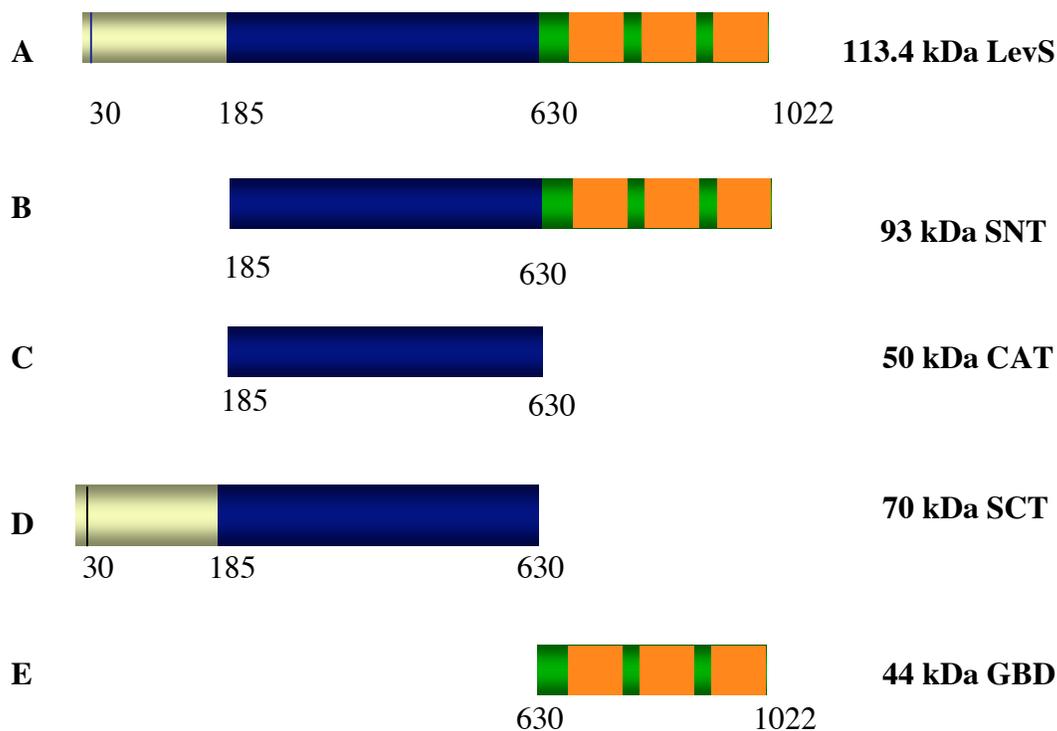


Figura 20. Esquema de las versiones truncadas de LevS las cuales fueron expresadas en *E. coli*. LevS proteína completa, SNT versión en la que se eliminó la región amino terminal, CAT construcción donde el dominio amino y C-terminal se eliminaron, SCT el dominio C-terminal fue eliminado y GBD corresponde únicamente al dominio C-terminal.

3.8.1 Versión sin C-terminal de LevS.

La región C-terminal de la levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F constituye un dominio inusual dentro de las glicosiltransferasas, ya que no presenta las unidades repetidas típicas reportadas para las GTFs (A, B, C o D). En su lugar encontramos tres elementos de 90 aminoácidos altamente conservados y que hemos denominado “repetidas S”. Para determinar los efectos estructurales del dominio C-terminal de LevS en función de actividad y especificidad, se construyó la versión truncada SCT.

Por medio de PCR se amplificó un fragmento de 1900 pb, que fue clonado en pBad/D y expresado exitosamente en *E. coli*, como puede observarse en el gel teñido con azul de coomassie de la figura 21. La proteína fue recuperada principalmente en la fracción soluble después de la extracción por choque osmótico. El peso molecular de la versión truncada fusionada a una tioredoxina en la región N-terminal y una etiqueta de His en el extremo C-terminal fue de 85 kDa. Esta versión truncada también es susceptible al efecto proteolítico antes mencionado por lo que la purificación y caracterización se llevó a cabo con extractos frescos y en presencia de inhibidores de proteasas.

La purificación se llevó a cabo a través de la etiqueta de Histidinas (His) que fueron localizadas por secuenciación de DNA en el extremo C-terminal, permitiendo su purificación por una columna de níquel con afinidad a las His utilizando imidazol como eluyente y buffer fosfatos 50 mM pH 7.2

Por medio de este método se alcanzó una purificación del 98 % y alcanzando una actividad específica de 0.28 U/mg de proteína, 17 veces menos que LevS que tiene una actividad específica de 5 U/mg de proteína. Se ha reportado que al eliminar el C-terminal de la inulosacarasa de *L. citreum* sigue conservando su capacidad transferasa aunque disminuye considerablemente, demostrando que la región C-terminal no es esencial para la catálisis pero si para su estabilidad .

El polímero producido por SCT fue analizado por resonancia magnética nuclear (RMN) de Carbono 13. Como se muestra en la figura 22, se observaron seis principales desplazamientos a 104.4, 81.08, 77.15, 76.02, 64.1 y 60.7 ppm en el espectro de RMN. Según los datos reportados, estos desplazamientos corresponden a un polímero de fructosa, y específicamente al de levana.

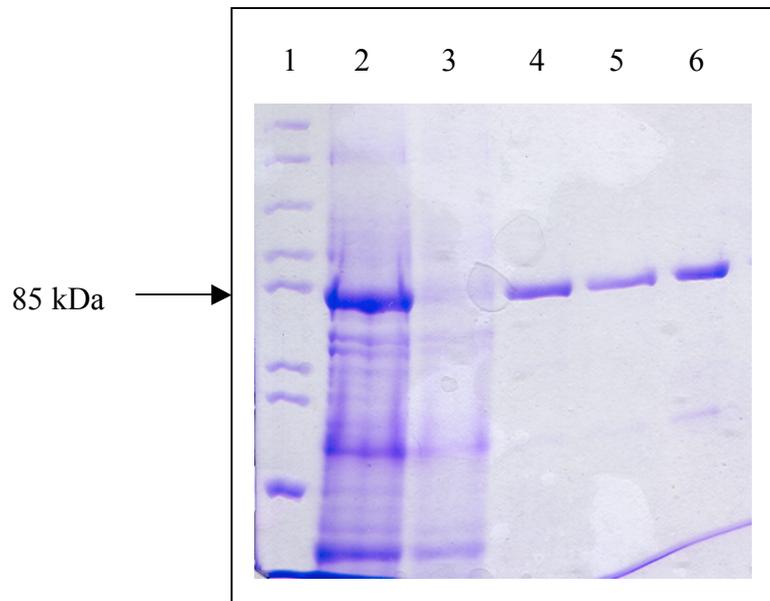


Figura 21. Gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie donde se observa el proceso de purificación de la versión truncada sin C-terminal. 1.- marcador de peso molecular, 2.- extracto enzimático sin purificar. 3.- proteínas que no se unen a la columna. 4.- elución con 30 mM de imidazol, 5.- elución con 60 mM de imidazol y 6.- 250 mM de imidazol.

La versión completa (LevS) al igual que la truncada, producen el mismo tipo de polímero desde el punto de vista del enlace químico entre las fructosas. Indicándonos que la ausencia del dominio C-terminal no produce cambios en la especificidad de la enzima con respecto al tipo de enlace del polímero.

El peso molecular de la levana producida por la proteína LevS completa y por la versión truncada SCT fue analizado por HPLC como se muestra en el cromatograma de la figura 23. El peso molecular de ambos polímeros resultó muy similar ya que para LevS es de 7.4 millones de Da, mientras que para el polímero producido por SCT fue de 6 millones de Da. En conclusión, la eliminación del dominio C-terminal tampoco produjo cambios en el tamaño

del polímero. No es posible extender esta conclusión al nivel de ramificación del polímero, ya que no se tienen establecidas las técnicas de análisis en nuestro laboratorio.

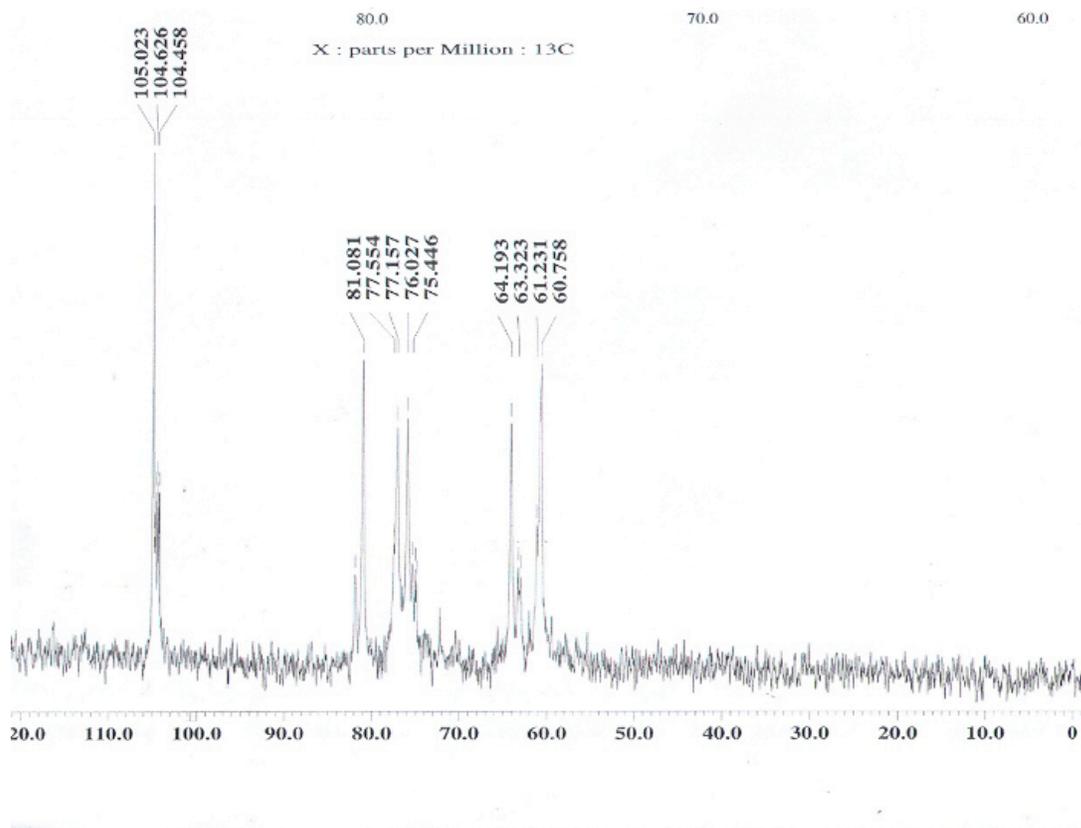
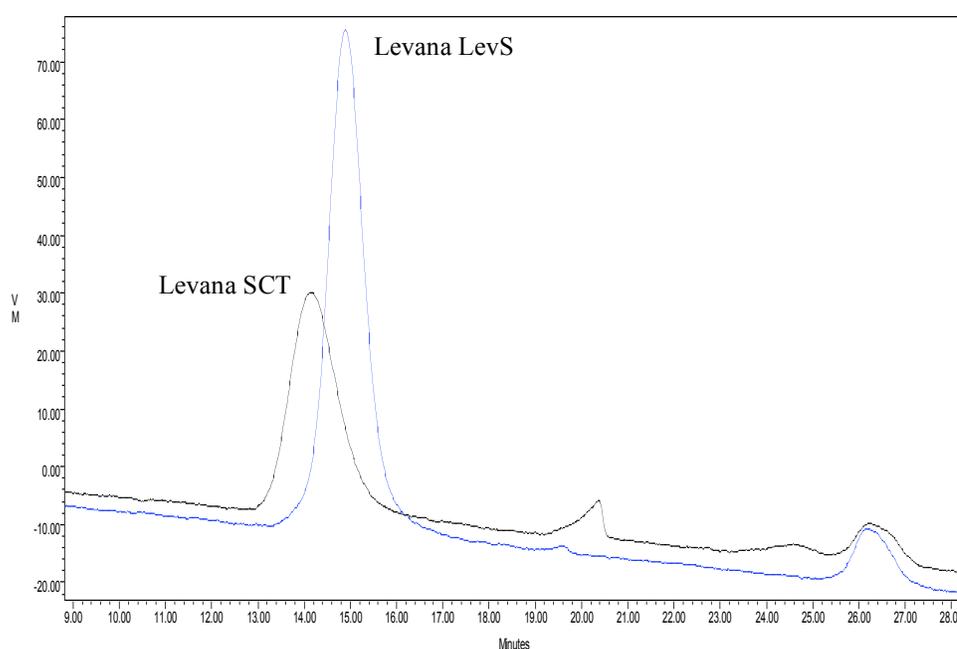


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C de la fructana producida por la versión truncada SCT de la enzima LevS de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F.

Como ya se ha mencionado, la caracterización de la especificidad de reacción se llevó a cabo midiendo la liberación del poder reductor en el medio de reacción por DNS como medida directa de su actividad, pero por HPLC para la cuantificación específica de productos. Para determinar la relación hidrólisis-transferencia, las reacciones se llevaron a cabo en buffer fosfatos 50 mM, pH 6, conteniendo 1 mM CaCl_2 , utilizando sacarosa a una concentración de 292 mM. En estas condiciones, el análisis después de 24 h de reacción mostró que la versión truncada tiene una relación hidrólisis/transferencia de 72/28 lo que representa un cambio

importante, ya que LevS a esa concentración de sacarosa la relación es de 39/61, es decir, la versión truncada se vuelve mas hidrolítica. Estos resultados sugieren que al igual que en la inulosacarasa de *L. citreum* los dominios adquiridos en las proteínas mosaico pueden generar una enzima menos hidrolítica generando una ruta mas grande de difusión para las moléculas de agua catalítica. Existen otros factores que reducen la hidrólisis y favorecen la actividad transferasa en las FTFs como el uso de solventes orgánicos o la inmovilización de la enzima. Todos ellos conservan una característica común, reducir la actividad del agua en la vecindad del sitio activo introduciendo una barrera difusional (Del Moral y col., 2007, en prensa).



70 kDa

Figura 23. Análisis del peso molecular de las fructanas producidas por LevS y SCT mediante cromatografía de permeación en gel (HPLC).

3.8.2 Versión truncada Sin N-terminal de LevS (SNT).

La región N-terminal constituida del residuo 1 al 184 está formada por el péptido señal y por la región altamente variable. como ya se mencionó, su función es desconocida.

Se obtuvo un fragmento de 2500 pb mediante PCR usando los oligonucleótidos Dire-SNT y 43R, Este fragmento fue clonado en un vector comercial (pBAD/D) y

expresado en *E. coli*. Como puede observarse en la figura 25, después del rompimiento celular fue posible identificar a través de un gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie, una proteína con el peso molecular esperado de 110 kDa, que incluye el peso correspondiente a la tioredoxina y la etiqueta de Histidinas adicionado al fragmento de LevS sin el N-terminal. Desafortunadamente la proteína recombinante de la versión truncada SNT sólo pudo obtenerse en la fracción insoluble formando cuerpos de inclusión, por lo que a pesar de numerosos intentos, no fue posible medir la actividad enzimática soluble, (figura 25A). Sin embargo, fue posible observar a través de zimogramas teñidos con el reactivo de Schiff, una proteína de menor peso molecular con actividad fructosiltransferasa usando sacarosa como sustrato. Como se puede observar en la figura 25B línea 1, la proteína de peso molecular de 110 kDa no presentó actividad, sin embargo se observa una banda de menor peso molecular (70 kDa) que sí la tiene. Dado que no hay otro origen dicha banda solo puede ser resultado de la proteólisis de la proteína de 110 kDa.

A pesar de que no fue posible medir la actividad de la versión truncada SNT, la proteína de 70 kDa sintetizó después de varios días un polímero con un peso molecular de 6.4 millones de Da. Al igual que la levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F la versión truncada produce un polímero de alto peso molecular indicándonos que la región amino terminal no afecta el tamaño del polímero. Cabe mencionar que se realizaron varias modificaciones a las condiciones de producción de la enzima para evitar la formación de cuerpos de inclusión pero en ningún caso tuvimos éxito.

El polímero sintetizado fue analizado por resonancia magnética nuclear de Carbono 13. Como se observa en la figura 24 en el espectro de RMN se generaron seis principales desplazamientos a 104.335, 80.44, 76.466, 75.337, 63.563 y 60.212 ppm. El espectro de este polímero resultó idéntico al sintetizado por la levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F, ambos identificados como levana. La eliminación de la región amino terminal tampoco afectó la especificidad del tipo de enlace, ya que sigue sintetizando el mismo tipo de polímero que la construcción completa.

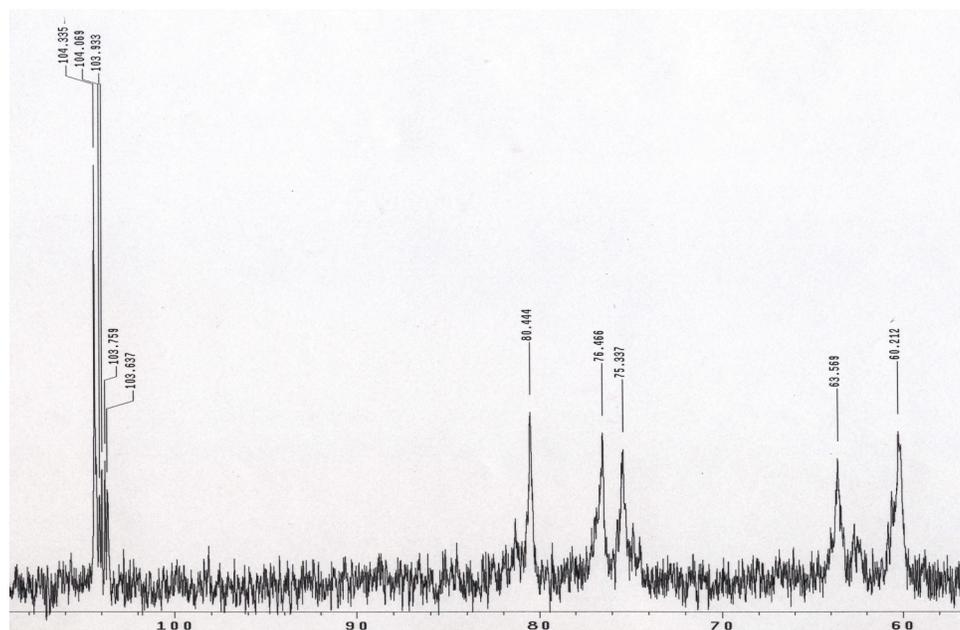


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C del polímero producido por la versión truncada SNT de la levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F.

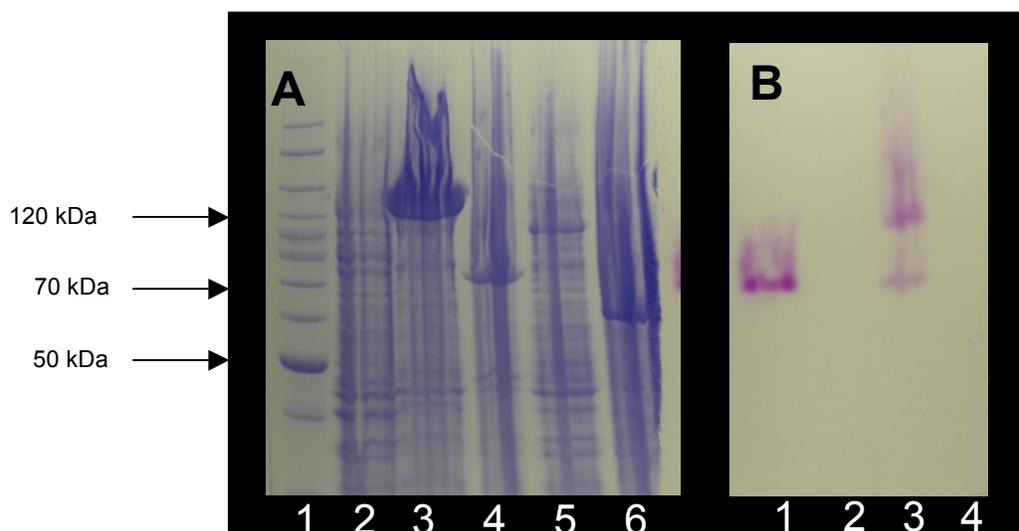


Figura 25. Electroforesis de los extractos insolubles de las versiones truncadas de LevS. Panel A) Gel de poliacrilamida teñido con azul de coomasie: 1- Marcador de peso molecular, 2- LevS, 3- Sin N-terminal (SNT), 4- Región catalítica, 5- Sin C-terminal (SCT) y 6- GBD. Panel B) Zimograma de actividad teñido con el reactivo de Schiff: 1- SNT, 2- Región catalítica, 3- SCT y 4- GBD.

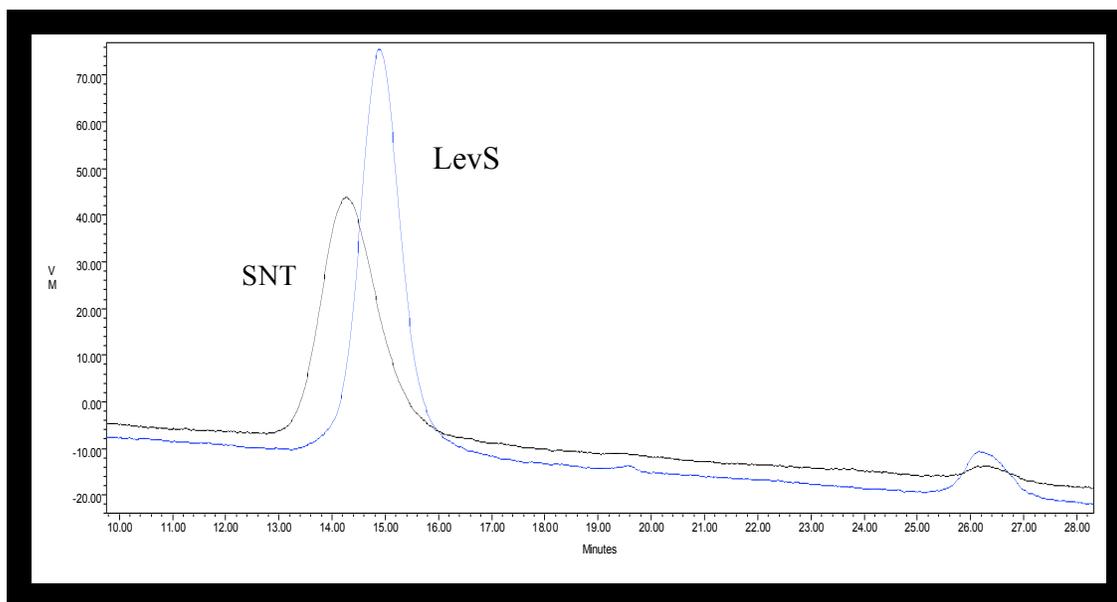


Figura 26. Diagrama de HPLC en gel de permeación que muestra la distribución de peso molecular del polímero producido por la versión truncada SNT de LevS.

3.8.3 Región catalítica de LevS.

Construimos una versión truncada de LevS que incluye únicamente el dominio catalítico por PCR eliminando la región N y C-terminal. El fragmento obtenido fue de 1300 pb las cuales codifican para una proteína de 50 kDa, que al incluir el peso molecular de la tioredoxina y la etiqueta de Histidinas resulta en una molécula de 66 kDa. Esta proteína fue expresada exitosamente en *E. coli*, como se observa en la figura 27 que muestra en un gel de poliacrilamida teñido con azul de coomasie. La proteína fue recuperada principalmente en la fracción soluble; sin embargo, no se logró detectar actividad midiendo azúcares reductores, ni incluso con los zimogramas de actividad.

En estas condiciones, no fue posible saber si la ausencia de actividad se debe a la eliminación de las regiones adicionales (N y C-terminal) o al mal plegamiento de la proteína, ya que en la inulosacarasa de *L. citreum* al eliminar estos dominios la actividad fructosiltransferasa sigue presente. Para determinar dicho fenómeno se requieren de mas

ensayos para replegar la enzima correctamente, y demostrar que a pesar de estar plegada, permanece inactiva.

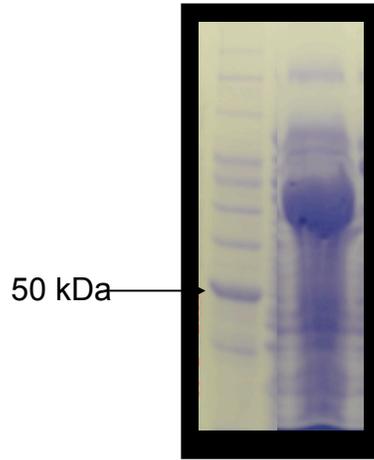


Figura 27. Gel de poliacrilamida teñido con azul de coomasie de la fracción soluble de la versión correspondiente a la región catalítica. Carril 1- Marcador de peso molecular, carril 2- fracción soluble.

CONCLUSIONES

En *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F se identificaron 2 fructosiltransferasas con pesos moleculares de 116 y 87 kDa. Se aisló la proteína de mayor peso molecular, considerando que la mas pequeña es sin duda el resultado de la proteólisis.

Se aisló el gen que codifica para la levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F (LevS). De acuerdo con la secuencia aminoacídica, LevS es una proteína mosaico que combina características de glucosiltransferasas y fructosiltransferasas. Su organización molecular nos indica que la región catalítica presenta homología a diversas fructosiltransferasas mientras que la región amino y carboxi- terminal tienen un 25% de identidad a una glucosiltransferasa, específicamente a la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F.

En el genoma de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 se identificaron 3 fructosiltransferasas: LEUM_1410, LEUM_1409 y LEUM_1411, las cuales presentan la misma estructura mosaico que LevS, que vienen unirse a la inulosacarasa de *L. citreum* (IslA) otra FTF mosaico aislada en el laboratorio en 2003.

Se propone la formación de una nueva sub-familia de fructosiltransferasas mosaico, que comparten características de glucosiltransferasas y fructosiltransferasas dicha familia está conformada por la levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F (LevS), la inulosacarasa de *L. citreum* (IslA) y las 3 fructosiltransferasas de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293.

La distribución de los árboles filogenéticos sugiere que el dominio catalítico de la inulosacarasa de *L. citreum* divergió antes que las levansacarasas de *L. mesenteroides* pero no antes que las enzimas de *Streptococcus* y *Bacillus*. La región catalítica de la levansacarasa M1FT de *L. mesenteroides* B-512FMC se agrupó en el árbol filogenético dentro de las bacterias gram negativas siendo una bacteria gram positiva, esto debido a que presenta un 95% de identidad con la levansacarasa de *P. aurantiaca* sugiriendo que la levansacarasa M1FT de *L. mesenteroides* B-512FMC reportada por Kang y colaboradores (2005) es el resultado de una transferencia horizontal o muy probablemente reportaron una contaminación de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* con una *Pseudomona*. El árbol filogenético de la región C-terminal de las fructosiltransferasas de *L. mesenteroides* sugiere

que pertenecen a un grupo distante a las GTFs de *Streptococcus* y *Leuconostoc*. Esta distribución sugiere también que aunque comparten un ancestro común la región C-terminal, de las fructosiltransferasas divergió hace mucho tiempo del C-terminal de las glucosiltransferasas.

LevS produce a partir de sacarosa un polímero de alto peso molecular (>7 millones de Da). Por resonancia magnética nuclear se identificó que es un polímero de fructosa de tipo levana.

LevS mostró una cinética de tipo Michaelis-Menten con un valor de K_m de 36.7 mM y una actividad específica de 7.5 U/mg.

Las versiones truncadas de LevS al igual que LevS sintetizaron levana de alto peso molecular con la misma estructura y peso molecular, indicándonos que la eliminación de las regiones adicionales (amino y C-terminal) de LevS no afectaron su especificidad.

PERSPECTIVAS

Caracterizar las versiones truncadas de la levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F y realizar un estudio mas detallado de las ramificaciones de los polímeros sintetizados.

Determinar la función de la región C-terminal de la levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F, el cual es el primer dominio reportado dentro de las glicosiltransferasas que presenta repetidas S.

Aislar los genes que codifican para las fructosiltransferasas hipotéticas LEUM_1410, LEUM_1409 y LEUM_1411 identificadas en el genoma de *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 así como su caracterización bioquímica, para confirmar experimentalmente el patrón inusual de la nueva subfamilia de proteínas mosaico.

Construir y caracterizar una fructosiltransferasa quimérica adicionando los dominios adicionales a una enzima constituida por un solo dominio.

Purificar y cristalizar la levansacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B512F con el fin de obtener la estructura tridimensional de la primera fructosiltransferasa mosaico.

ANEXO 1

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la levansacarasa de

***Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F**

TGT TTTAC ACAAATGGCAAAAAATATGCTATA TGTGGCTGCC TTAGCATCAGTAGCCAT 60

CATGATTGCGTTGACAATTTACCTCTCCATCAAAGAGGGCAAATTTGCACGCGAAGTCTA 120

TGATATTTGGGGATTATTGGATTTATACTCTCCATCGGCGTATTTGAATTTGTTAAAAG 180

TCATTTGGCGACATATCAACCGAGTCCTAAAGTGCAACTTGCTTTGCAAAAAGTAGCCAG 240

TACATCGCTTGGTGTGTATGTGATTCATGAATTCCTCATTATTTTGC TGAGAGAAAAGTT 300

ACATATTGCCGACAGTTCGCTGAAACACATGTTCAATTTGCCGATCAT TGTATGGTTAGC 360

ATCAACTGCTCTCGTACTAATTATTCATAAAATCCATTGCTGAATAAAATTGTATAGAT 420

TAAATAAAAAAGACGTATACGGCGTCTTTTTTATTTATGATATACGCTTAACAAGCGA 480

ATGTAATACTATTGAAATGATAAGCGTTTATACTTAACAAAGATATATTATAAGTAGTAT 540

-35

-10

AAAGTGGAGAGTTCATATGAGAAAAAGTTATAAAGGCTGGGAAATTATGGGTAGCCGG 600

RBS

Direinício

. M R K K L Y K A G K L W V A G

AGCTGCAGTGC GGCTGCAGTCGTGGGCACCCAACATTGTTAGTGCGGATACTACGAACAG
----- 660

A A V R L Q S W A P N I V S A D T T N S

TACAACTACTGCAGATGCGACTACAACATCTAGCGCGACCGAATCGAGTATTTCTCTAC
----- 720

T T T A D A T T T S S A T E S S I S S T

GGAATCAGATGACAACAAGGTAGATACTAGTAACACTGATGCGGTCACTGTTACAACAA
----- 780

E S D D N K V D T S N T D A V T V T T N

TAGTGATGATAGCAATTCTAACTCAGCAGAGACATCAAACAGCGATGCTAAGGTTACTAG
----- 840

S D D S N S N S A E T S N S D A K V T S

TAACTACTGCTCAGAAGGATGAGGCAATAAAAAGCTGAAACCACAAATAATCAAGATAC
----- 900

N N T A Q K D E A I K A E T T N N Q D T

AACATCAACTACCGCAGTAGCTGAAACAAAAACAGCAGTTAATACGTCTGAATCAGAAAG
----- 960

T S T T A V A E T K T A V N T S E S E S

TGGTAGTAATAACGAACAGTTGGCCGAAACTGCTACAGATAATGCAAAAGTAAATGATGC
----- 1020

G S N N E Q L A E T A T D N A K V N D A

GTCTAGTCAGAAGCAATCAACTCCATCTGTAGAAAACTAGATGATAGTGTTCAAAAGA
----- 1080

S S Q K Q S T P S V E K L D D S V S K D

TTTGAATTCAAAAACAACCGTTGTCCTAAAAATGCTGATGGTACGTCAACAACTAACAT
----- 1140



L N S K T T V V T K N A D G T S T T N M

GACTTATGCTAATTTAAAGGATGTTGCTGACAATATTGCTAGTTTAAATCCAGACACATC
----- 1200



T Y A N L K D V A D N I A S L N P D T S

TGTTCCTTATTTTAAATGCTGATGCGATTAAAAATTTGCCAGCAATGACAACGGCAGATGC
----- 1260



Y P Y F N A D A I K N L P A M T T A D A

ACAGACTGGTCAAATTCAAGACTTGGATGTTTGGGATTCTTGGGCGTTACAAGATGCAAA
----- 1320

Q T G Q I Q D L D V W D S W A L Q D A K

AACTGGTGCTGTTGCAAATTATCATGGCTATAATATCGTGTTTGCCTGGCTGGTTATCC
----- 1380

T G A V A N Y H G Y N I V F A L A G Y P

TAAAGAAGATAACGATCAACATATTTATATGCTCTACACTAAGTATGGTGATACAGCATT 1440

K E D N D Q H I Y M L Y T K Y G D T A L

AAATAATTGGAAAAATGCTGGCCCTGTTTTGGTTTCAATGCGAAATGGAATGAGCAACA 1500

N N W K N A G P Y F G F N A K W N E Q Q

ATGGTCTGGATCCGCCACTGTCAATGATGATGACAGCATTCAATTGTTCTACACAAAGAC 1560

W S G S A T V N D D D S I Q L F Y T K T

AGATCAACCTAATACAGTACAACGTTTAGCAACCGCTAATCTATCAATGACATATACAGA 1620

D Q P N T V Q R L A T A N L S M T Y T D

TACGGAAGTATATGTTGCCAAGGTAAATGATGATCATGTACTTTTTGCTGGGGATGGAGA 1680

T E V Y V A K V N D D H V L F A G D G E

GTATTATCAAACCTTACAAACAGTGGGTGGACGCAGGTTACTATACGACTGGTGATAACTT 1740

Y Y Q T L Q Q W V D A G Y Y T T G D N F

TACCATGCGTGATCCTCATGTTATCGAAGTAAACGGAGAACGCTACTTAGCTTTCGAAGC 1800

T M R D P H V I E V N G E R Y L A F E A

TAATACCGGTACAAACAATTATCAAAGTGATGATGCCGTAAATGACGATACATATTATGG 1860

N T G T N N Y Q S D D A V N D D T Y Y G

CGGAACAGAAGAATTTAATCAACAAGCCAAAGTTGATACACTACAGAACCCAGATAAACT 1920

G T E E F N Q Q A K V D T L Q N P D K L

GAAACTATCAAAAAAGGCTAATGGTGCGATTGGCCTGATTAATTTGACTAAAGATCAAAA 1980

K L S K K A N G A I G L I K L T K D Q N

TAATCCTACAGTTGCTCAAGTTTACTCACCACTTCTAGCAGCTAATGGTATTACCGATGA 2040

N P T V A Q V Y S P L L A A N G I T D E

AATCGAACGTGCTAATATTGTGCCATTGAACGGGAAATTTTATCTATTTACAGATACACG 2100

I E R A N I V P L N G K F Y L F T D T R

TTTGAGTAAGAGTGTTGTGCCAACAGCTGATTTTAAATATTAATGTTGGTATGATGGGTTA 2160

L S K S Y V P T A D F N I N Y G M M G Y

TGTTTCAGATAGCTTATTTGGACCTTATACACCGTTGAATGGTAGCGGTAGTGTGGTTAC 2220

V S D S L F G P Y T P L N G S G S V V T

TGGGACGCAATTATTTACTTCTAGAAGTACGATTCATATTATGCAGTACCCGTTGA 2280

G T Q L F T S R T D T Y S Y Y A V P V E

GGGACGTAGTGATTTATTATTGGTCACTTCATATATGAGTAATCGTAATGAAAAAGCTGG 2340

G R S D L L L V T S Y M S N R N E K A G

GACAGGAATGAATGCCACGTTTGCACCATCATTTTTGATTCAAATAAGTGCTGATGGTAT 2400

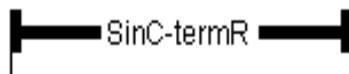


T G M N A T F A P S F L I Q I S A D G M

GAGCACAAAAGTATTGGATACTGTTTTAGCTCAAGGTACATGGACTTATGATGGCAAAAAG 2460



S T K V L D T V L A Q G T W T Y D G K S



CGCTAGCGTTGAGGAACTTGTGGGAAATAAAGCAACATCAGAATTAAC TGATATGAAAAT 2520

A S V E E L V G N K A T S E L T D M K I

TGGTTGGGTTGACAATAAGTTTTATGTTGATAATGAATTAGCCAATGGCTATGTCTACGA 2580

G W V D N K F Y V D N E L A N G Y V Y D

CTATATCAATACTAGTTATTATTTGTTTAAAAATGGTGTTCGCCTAAGTGGTGTGCAAAC 2640

Y I N T S Y Y L F K N G V R L S G Y Q T

CTATGCAAATTCATATTATTATTTTCGATCCAGTAACATATAAAAAGAGTTGATAATGAGAT 2700

Y A N S Y Y Y F D P V T Y K R V D N E I

TCATCAAGATAACTGCGGAAGAAATATTACTTCGGTAATGACGGCCGTGTGAAGCAAGG 2760

H Q D N T G K K Y Y F G N D G R V K Q G

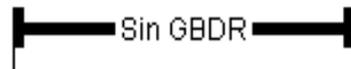
CCAATTTGCTGTGAATGGTGTGCTTATAACTTTGGTAACGATAAAACCTATTATGAGCG 2820

Q F A V N G V A Y N F G N D K T Y Y E R

AGGTTTTGCATCAGGTTACTTACAAGATGTAACGGATAACAATCAGTGGTACTGGTTTGA 2880

G F A S G Y L Q D V T D N N Q W Y W F E

AAGTGGTAAAAAGTACACTGGGTCCCGTTATTATATGGGCACATATTATTTCTTTGAAAC 2940



S G K K Y T G F R Y Y M G T Y Y F F E T

AGGACAACGTCAAGAGAGTAAGTGGGAAACAGCCTGGGGTATGAAGTATTACGTTGGTAC 3000

G Q R Q E S K W E T A W G M K Y Y V G T

TGATGGTCGTGCAGTACAAGGCGTTCAAATTATTGATGGCCAAGCCTATGACTTTGGTAC
----- 3060

D G R A Y Q G V Q I I D G Q A Y D F G T

GAATGGAACCTTCAACTTGAAGGGGACAGCGAGTGGCTACTTGTACTCACCATCATTGTC
----- 3120

N G T F N L K G T A S G Y L Y S P S L S

AACAGCGAATGGTGGTTATAATTGGTTTGAGAATGGTAAGCCATATACAGGTTCCGCTA
----- 3180

T A N G G Y N W F E N G K P Y T G F R Y

CTACGAAGGTACTIONTACTGGTTTGTGAACGGTGTTCGTCAAATGCTGGTTGGCGTGA
----- 3240

Y E G T Y Y W F V N G V R Q N A G W R E

AGCTTGGGGCATGAAGTATTATACAGATGCTAGTGGTCGTGCATTGCAAGGTATCCAAAT
----- 3300

A W G M K Y Y T D A S G R A L Q G I Q I

CATTGATGGCCAAGCCTATGACTTTGGTACAAATGGTACGTATAATTTGAAGAGTGCAGC
----- 3360

I D G Q A Y D F G T N G T Y N L K S A A

GAGTGGCTATTTGTACTCACCAAGCTATTCAAAGGCCAATGGTGGTTATAACTGGTTTGA
----- 3420

S G Y L Y S P S Y S K A N G G Y N W F E

GAATGGTAAGCCATATACAGGCTTCCGTTATTACATGGGCACATATTACTGGTTCGTGAA

3480

N G K P Y T G F R Y Y M G T Y Y W F Y N

TGGTGTTCGTCAA AATGCAGGATGGCGTGAAGCATGGGGCAAGAAGTATTATACAGATGC

3540

G Y R Q N A G W R E A W G K K Y Y T D A

CAATGGTCGAGCATTACAAGGTATTCAA AAGATAGATGGTCAGCAATATAATTTGGTAA

3600

43R

N G R A L Q G I Q K I D G Q Q Y N F G N

TGATGGCACATATTACTTACGTTAA

3625

43R

D G T Y Y L R

BIBLIOGRAFIA

1. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program, *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3462.
2. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (2001) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. USA.
3. Ammar, Y. B., Matubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, P., Pongsawasdi, P., and N. Minamiura. 2002. Characterization of thermostable levansucrase from *Bacillus sp.* TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *J. Biotechnol.* **99**: 111-119.
4. Arrieta J., L. Hernández, A Coego and V Suárez. 1996. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiology* **142**: 1077-1085.
5. Bezzate S, Steinmetz M, Aymerich S. 1994. Cloning, sequencing, and disruption of a levanase gene of *Bacillus polymyxa* CF43. *J Bacteriol.* April **176** (8):2177-83.
6. Bosch, T. Tamura, N. Tamura, W. Baumeister and L.-O. Essen. 2007. The -propeller domain of the trilobed protease from *Pyrococcus furiosus* reveals an open Velcro topology. *J Acta Cryst.* **D63**, 179-187
7. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* **72**:248-254.

8. Chambert, R., Treboul, G., y Dedonder, R. 1974. Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **41**: 285-300.
9. Chambert, R., M. C. Rain-Guion, ade M. F. Petit-Glatron. 1992. Readthrough of the *Bacillus subtilis* stop codon produces an extended enzyme displaying a higher polymerase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1132**:145-153.
10. Del Moral-Ventura S., Olvera-Carranza C. Rodríguez-Alegría Ma Elena and López-Munguía A. 2007. Functional role of the additional domains in inulosucrase (IslA) from *Leuconostoc citreum* CW28. En Prensa.
11. Devulapalle, K. S., S. D. Goodman, Q. Gao, A. Hemsley, and G. Mooser. 1997. Knowledge-based model of a glucosyltransferase from the oral bacterial group of mutans streptococci. *Protein Sci.* **6**:2489–2493.
12. Edgar, Robert C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32** (5), 1792-97.
13. Han Y.W. Microbial Levan (1990). *Advances in Applied Microbiology* **35**: 171-194.
14. Hernandez, L. Arrieta, J., Menéndez, C., Vazquez, R., Coego, A., Suarez, V., Selman, G., Petit-Glatron, M. F., and R. Chambert. 1995. Isolation and enzymatic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* **309**:113-118.
15. Hettwer, U., and M. R. Gross. 1995. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **177**: 2834-2839.
16. Hettwer U, Jaeckel FR, Boch J, Meyer M, Rudolph K, Ullrich MS. 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.* Sep; **64** (9):3180-7.
17. Heyer, A.G., Wendenburg, R. 2001. Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (1): 363-370
18. Hirayama, M., Sumi, N. y Hidaka, H. 1989. Purification and properties of a fructooligosaccharides- producing beta- fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agr Biol Chem.* **53**: 668-674.
19. Jacques NA. 1993. The fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*. *New Phytol.* **123**: 429-435.
20. Kang HK, Seo MY, Seo ES, Kim D, Chung SY, Kimura A, Day DF, Robyt JF. 2005. Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* Jan **21**;1727(1):5-15.
21. Kang, S.A., Hong, K., Jang, K.-H. (2006). Altered mRNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis* *Journal of Nutritional Biochemistry* **17** (6): 419-426.
22. Kralj, S., G. H. Van Geel-Schutten, M. M. G. Dondorff, S. Kirsanovs, M. J. E. C. Van Der Maarel, and L. Dijkhuizen. 2004. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology* **150**:3681–3690.
23. Kim, K.H., Chung, C.B., Kim, Y.H., Kim, K.S., Han, C.S., Kim, C.H. 2005. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Cosmetic Science* **56** (6): 395-406.

24. Kyono K, Yanase H, Tonomura K, Kawasaki H, Sakai T. 1995. Cloning and characterization of *Zymomonas mobilis* genes encoding extracellular levansucrase and invertase. *Biosci Biotechnol Biochem.* Feb; **59** (2):289-93.
25. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
26. Meng, G y Fütterer, K. 2003. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struct Biol.* **10**: 935-41.
27. Miller, A. W., and J. F. Robyt. 1986. Functional molecular size and structure of dextransucrase by radiation inactivation and gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* **870**(2):198-203.
28. Monchois, V., Willemont, R., and P. Monsan. 1999. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**:131-151.
29. Monsan, P. and Paul, F. 1995. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microb. Rev.* **16**:187-192.
30. Muramatsu, M. y Nakakuki, T. 1995. Enzymatic synthesis of novel fructosyl and oligofructosyl trehaloses by *Aspergillus sydowi* beta- fructofuranosidase. *Biosci Biotech Biochem.* **59**: 208-212.
31. Oláh, A., Papp, Z., Szentirmai, A. 1993. Inulin formation of penicillin producing industrial *Penicillium chrysogenum* strains. *Acta Microbiologica Hungarica* **40** (4): 379-386
32. Olivares-Illana V, Wachter-Odarte C, Le Borgne S, Lopez-Munguia 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.* Feb; **28** (2):112-7.

33. Olivares, A. López-Munguía and C. Olvera (2003), Molecular Characterization of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a Fructosyltransferase within a Glucosyltransferase, *J. Bacteriol.* **185** pp. 3606–3612.
34. Olvera, C. Centeno-Leija, S. Lopez-Munguia, A. 2007. Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 *Antonie Van Leeuwenhoek* 92 11-20.
35. Ozimek LK, van Hijum SA, van Koningsveld GA, van Der Maarel MJ, van Geel-Schutten GH, Dijkhuizen L. 2004. Site-directed mutagenesis study of the three catalytic residues of the fructosyltransferases of *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS Lett.* Feb 27; **560** (1-3): 131-3.
36. Ozimek LK, Euverink GJ, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L. 2005. Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Lett.* Feb **14**; 579 (5): 1124-8.
37. Patel, V., Saunders, G., Bucke, C. 1994 Production of fructooligosaccharides by *Fusarium oxysporum*. *Biotechnology Letters* **16** (11): 1139-1144.
38. Pérez-Oseguera M. A., L Güereca and A. López-Munguía. (1996). Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **45**: 465-471.
39. Pons T, Hernandez L, Batista FR, Chinae G. 2000. Prediction of a common beta-propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Sci.* Nov; **9** (11):2285-91.
40. Rairakhwada, D., Pal, A.K., Bhatena, Z.P., Sahu, N.P., Jha, A., Mukherjee, S.C. (2007). Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and

survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles, *Fish and Shellfish Immunology* **22** (5): 477-486

41. Rehm, J., Willmitzer y Heyer, A. 1998. Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J Bacteriol.* **180**: 1305-1310.
42. Ritsema, T. y Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plant and humans. *Curr Opin Plant Biol.* **6**: 223-230.
43. Robyt, J. F. and T. F. Walseth. 1979. Production, purification, and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydr Res.* **68**(1):95-111.
44. Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* **19**:1572-4.
45. Rozen, R., G. Bachrach, M. Bronshteyn, I. Gedalia and D. Steinberg. 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.
46. Rozen R, Steinberg D, Bachrach G (2004). *Streptococcus mutans* fructosyltransferase interaction with glucans. *FEMS Microbiol Lett* **32**(1):39–43
47. Russell, R. R. 1990. Molecular genetics of glucan metabolism in oral *streptococci*. *Arch. Oral. Biol.* (**35**) 53S-58S.
48. Sato S, Kuramitsu HK. 1986. Isolation and characterization of a fructosyltransferase gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Infect Immun.* Apr;**52** (1):166-70.

49. Shimamura, A., Tsuboi, K., Nagase, T., Ito, M., Tsumori, H., and H. Mukasa. 1987. Structural determination of D-fructans from *Streptococcus mutans*, serotype d, c, e and f strains, by ¹³C-NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **165**:150-154.
50. Shiroza and Kuramitsu, 1988 T. Shiroza and H.K. Kuramitsu, Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions, *J. Bacteriol.* **170** (1988) (2): 810–816.
51. Song, D. D., and N. A. Jacques. 1999. Purification and enzymic properties of fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem. J.* 341: 285-291.
52. Summer, J. Y Howell, S. (1935). A method for determination of saccharase activity. *J. Biol. Chem.* 108: 51-54.
53. Steinmetz, M., D. Le coq, S. Aymerich, G. Gonzy-Treboul, and P. Gay. 1985. The DNA sequence of the gene for the secreted *Bacillus subtilis* enzyme levansucrase and its genetic control sites. *Mol. Gen. Genet.* **200**:220-228.
54. Tang LB, Lenstra R, Borchert TV, Nagarajan V. 1990. Isolation and characterization of levansucrase-encoding gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Gene.* Nov **30**; 96 (1) :89-93.
55. Tieking, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F., and M. G. Ganzle. 2005. Molecular and functional characterization of a levansucrase from sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**:655-663.
56. van Hijum SA, Bonting K, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L. 2001 . Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiol Lett.* Dec **18**;205(2):323-8.

57. van Hijum, H. van Geel-Schutten, H. Rahaoui, M. van der Maarel and L. Dijkhuizen, Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesized high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides, *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (2002), pp. 4390–4398.
58. van Hijum SA, Szalowska E, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L. Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*. 2004 Mar; **150** (Pt 3):621-30.
59. van Hijum SA, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L, van Geel-Schutten IG (2006) Structure–function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**(1):157–176.
60. Wada, T., Ohguchi, M. y Iwai, Y. 2003. A novel enzyme of *Bacillus* sp. 217C-11 that produces Inulin from sucrose. *Biosci Biotechnol Biochem.* **67**: 1327-1334.
61. Yanase, H., Iwata, M., Nakahigashi, R., Kita, K., and K. Tonomura. 1992. Purification, crystallization and properties of the extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 1335-1336.
62. Vallete P, V Pelenc, Z Djouzi, C Andrieux, F Paul, P Monsan and O Syllit. (1993) Bioavailability of new synthesized glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *J Sci Food Agri* **62**: 121-127.