



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

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

**Diseño, construcción y caracterización de
fructosiltransferasas quiméricas con alta
especificidad para la transfructosilación**

TESIS

Que para obtener el grado académico de
Maestra en Ciencias

Presenta:

QFB Sara Guillermina Centeno Leija

Tutor:

Dra. Clarita Olvera Carranza



Cuernavaca, Mor., Marzo 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de tecnología de enzimas del **Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis** del **Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México**. Bajo la tutoría de la **Dra. Clarita Olvera Carranza** y con la supervisión del **Dr. Agustín López-Munguía Canales**.



Todos mis logros estarán siempre dedicados a ustedes. Gracias por estar conmigo y compartir la dicha de ser una familia. En cada momento de este tiempo lejos, mi corazón y mi mente están entregados:

A mi Madre,

A mi hermano Alejandro,

A mi hermano Carlos

Agradezco

A la Dra. Clarita Olvera y al Dr. Agustín López-Munguía por haberme permitido llevar a cabo este trabajo bajo su asesoría, por compartir sus conocimientos y por su apoyo durante mi estancia en su laboratorio. Gracias por su confianza

A los miembros del comité tutora, por las sugerencias que contribuyeron a mejorar este trabajo:

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Dra. Maricarmen Quirazco Baruch

A los miembros revisores de la tesis, por sus atinadas observaciones:

Dra. Gloria Saab Rincón

Dra. Marcela Ayala Aceves

Dr. Norberto Cruz García

Dr. Lorenzo Segovia Forcella

A la M.C. María Elena Rodríguez Alegría por su excelente asesoría técnica.

Al M.C. Julio César Fabián Macedo por su valiosa ayuda para la purificación de la enzima.

Al T.L. Fernando González y T.L. Aurelia Ocampo por el extraordinario apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A Dios.

A mi madre, por ser mi ejemplo de vida, esfuerzo, tesón, valentía y coraje. Gracias por estar conmigo en todo momento.

A "Piguics", por ser mi amigo, mi hermano y mi cómplice. Gracias por tu compañía y por regalarme los mejores momentos de mi vida. A "Canyos" por estar presente aunque no lo exprese.

Al Dr. Agustín López-Munguía por que siempre tuvo la puerta abierta para mis dudas. Por la preocupación que siempre mostró por mi bienestar. Gracias por su confianza.

A Clarita por acojarme y porque siempre creyó en mí. Porque siempre tuvo para mí una real y sincera amistad.

A la familia Nerio, por su apoyo durante toda mi carrera y por tomarme como parte de la familia. A Anita por los ratos juntas. A Yoli, Tere y Nena por nunca dejarme sola. Al Sr. Nerio por sus palabras de aliento y buenos consejos. A la Sra. Nerio por invitarme a su mesa a comer. A Josito porque siempre estuvo y estará en mi mente.

A mis amigos LCQ: Chuyito, Julio Rico, Diego y Carlitos. Los quiero mucho.

A ti Hervey que siempre estarás en mi corazón aunque te hayas adelantado en el camino. Dios te bendiga amigo mío.

A todos los López: María, Sandrita y Arlette por escucharme y apoyarme. Por los momentos burlones y por las chamaqueadas. A Ángela porque siempre tuvo un buen consejo para mí. A Fersito y Gina porque me han brindado su amistad. A Edmundo y a Alex por "Ulio" y el albañil. Y a Hectorito por que el tiempo que estuvo, supo ser un buen amigo. Doña Aure, Judit gracias por esas mañanas en el desayuno y por su amistad.

A William, Mau, Yimy, Germán, Toño Serrato y Vane, Luis Caspeta, Cristina y toda la lista interminable de personas que me han ofrecido su sincera amistad en el Instituto.

A Julia, por las risas, el llanto, las mi-vi-aventuras y todo el tiempo que ha dedicado para que yo sea feliz. GRACIAS

Índice de contenido

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCION	3
3.	ANTECEDENTES.....	5
3.1	FRUCTANAS	5
3.1.1	Usos y aplicaciones	6
3.2	FRUCTOSILTRANSFERASAS	8
3.3	ESTRUCTURA DE LAS FRUCTOSILTRANSFERASAS	11
3.3.1	Región amino terminal.....	12
3.3.2	Dominio catalítico	12
3.3.2.1	Sitio de unión a calcio	15
3.3.3	Región carboxilo-terminal.....	15
3.4	MECANISMO DE REACCIÓN.....	16
3.4.1	Hidrólisis vs Transferencia.....	19
3.5	FRUCTOSILTRANSFERASAS DE <i>Leuconostoc sp.</i>	21
3.5.1	Inulosacarasa de <i>Leuconostoc citreum</i> CW28 (IsIA).....	21
3.5.2	Levansacarasa de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	22
3.5.3	Relación de la estructura-función de las FTF's quiméricas	23
3.6	GENERACIÓN DE NUEVAS FUNCIONES POR LA COMBINACIÓN DE DOMINIOS.....	25
4.	HIPOTESIS	27
5.	OBJETIVO.....	27
5.1	Objetivos particulares	27
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1	Cepas y vectores	28
6.2	Condiciones y medios de cultivo.....	28
6.3	Preparación de células para ensayos de contacto.....	29
6.4	CONSTRUCCIÓN DE LAS QUIMERAS	30
6.4.1	Amplificación y fusión de los genes	30

6.4.1.1	PCR PRIMARIA.....	30
6.4.1.2	PCR SECUNDARIA.....	31
6.4.1.3	PCR DE REAMPLIFICACIÓN.....	32
6.5	CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	33
6.5.1	Vector de expresión.....	33
6.5.2	Transformación.....	33
6.5.3	Secuenciación del inserto.....	33
6.6	EXPRESION HETERÓLOGA DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	33
6.6.1	Expresión.....	33
6.6.2	Cuantificación de proteína.....	34
6.6.3	Análisis de las proteínas recombinantes.....	34
6.6.4	Tinción con azul de Coomassie para visualización de proteína.....	34
6.6.4.1	Geles de Actividad in situ.....	34
6.7	ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE LOS C-TERMINAL.....	35
6.7.1	Ensayos de anclaje a células.....	35
6.7.2	Purificación de las quimeras a partir de cuerpos inclusión.....	36
6.7.3	Programas de reconocimiento de familia y estructura terciarias.....	36
6.8	ANÁLISIS DE ACTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD.....	36
6.8.1	Determinaciones cinéticas.....	36
6.8.2	Determinación de la relación hidrólisis/ transferencia.....	37
6.8.3	Estudios de las reacciones de aceptor.....	37
6.8.4	Determinación de la actividad enzimática por azúcares reductores.....	38
6.8.5	Determinación de la actividad enzimática por HPLC.....	38
6.8.6	Ensayos de estabilidad a la temperatura.....	38
7.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	39
7.1	Diseño de las quimeras.....	39
7.1.1	Quimeras SacB-C-IsIA y SacB-Tn-IsIA.....	40
7.1.2	Quimeras SacB-C-LevC y SacB-Tn-LevC.....	41
7.1.3	Quimeras SacB-DsrP.....	42
7.2	Construcción, clonación y expresión de las quimeras de SacB.....	43
7.3	Determinación de la termoestabilidad.....	46
7.4	Efecto de los dominios sobre la eficiencia de la reacción de transferencia.....	48

7.5	Estudio del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad transferasa.	51
7.6	Efecto de los dominios sobre la reacción de transferencia a otros aceptores.....	55
7.7	Estudio cinético de la reacción de transferencia e hidrólisis.....	58
7.7.1	Purificación de las quimeras SacB-Tn-IsIA y SacB-Tn-LevC.....	58
7.7.2	Ensayos cinéticos	59
8.	CONCLUSIONES	62
9.	ANEXOS	63
9.1.1	Ensayos de anclaje a células.....	63
9.1.2	Ensayos realizados con la quimera SacB-C-DsrP	63
9.1.3	Ensayos de desorción de la quimera SacB-C-DsrP y SacB ancladas a la pared celular	64
9.1.4	Ensayos realizados con la quimera SacB-C-DsrP	65
10.	BIBLIOGRAFIA	67

Índice de figuras

Figura 1. Representación de la estructura de la inulina (A) y levana (B).....	5
Figura 2. Reacciones catalizadas por las fructosiltransferasas	9
Figura 3. Representación esquemática de la estructura general de las fructosiltransferasas bacterianas.	11
Figura 4. Modelo tridimensional de la estructura β -propela de 5 hojas que adoptan la levansacarasa SacB de <i>B. subtilis</i> (a) y la levansacarasa LsdA de <i>G. diazotrophicus</i> (b).	13
Figura 5. Distancias y contactos entre la levansacarasa de <i>B. subtilis</i> y la sacarosa.. ..	13
Figura 6. Distancias y contactos entre la levansacarasa de <i>B. subtilis</i> y la rafinosa.. ..	14
Figura 7. Modelo del mecanismo Ping-Pong Bi Bi propuesto para la levansacarasa.	16
Figura 8. Modelo del mecanismo de doble desplazamiento propuesto para las FTF's.	17
Figura 9. Esquema de la estructura primaria de las FTF's de <i>Leuconostoc</i> sp.....	21
Figura 10. Esquema de las versiones truncadas de la inulosacarasa IslA de <i>L. citreum</i> CW28.....	23
Figura 11. Esquema de la estrategia para la fusión de los genes.	32
Figura 12. Esquema de la quimeras generadas a partir del dominio catalítico de la levansacarasa SacB y la fusión de los C-terminal de las FTF's de <i>Leuconostoc</i> sp y el C-terminal de DsrP, una GTF.....	39
Figura 13. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie (A) y zimogramas de actividad in situ (B) de 1) SacB (50kDa) 2) SacB-C-IslA (150kDa). 3) SacB-Tn-IslA (80kDa). 4) SacB-C-LevC (100kDa). 5) SacB-Tn-LevC (65kDa) y 6) SacB-C-DsrP (85kDa)	43
Figura 14. Relación hidrólisis/transferencia en la reacción de SacB y sus quimeras con sacarosa. Se muestra el porcentaje de conversión de sacarosa referente al porcentaje transferido (color oscuro) y el porcentaje de sustrato hidrolizado (color claro). 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5u/mL y ~100% de conversión.	49
Figura 15. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la reacción de transferencia de (▲) SacB, (●) SacB-C-IslA, (◆) SacB-Tn-IslA, (▣) SacB-C-LevC y (■) SacB-Tn-LevC. Se midió la cantidad de fructosa libre y transferida al final de cada reacción (0.5U/mL, 37°C y pH 6).	52
Figura 16. Alineamiento tipo clustal de las regiones de transición de IslA, LevC y el CBM de la endoinulinasa de <i>Arthrobacter</i> (No. acceso AJ131562). En negritas y sombreado los residuos aromáticos implicados en la interacción del sustrato-solvente.	54
Figura 17. Especificidad de la reacción de transfructosilación en presencia de xilosa (A) y maltosa (B) de la levansacarasa SacB y las quimeras SacB-C-IslA, SacB-Tn-IslA, SacB-C-LevC y SacB-Tn-LevC. Transferencia al aceptor (negro), transferencia al polímero (gris), hidrólisis (blanco). (0.5U/mL, 37°C y pH 6).....	56

Figura 18. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie de las quimeras purificadas. **1)** SacB-Tn-LevC (65kDa), **2)** SacB-Tn-IslA (80kDa), **3)** SacB (50kDa), **M)** marcador de peso..... **58**

Figura 19. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y de actividad in situ de los ensayos de contacto de las células IBT-PQ con las enzimas SacB-C-DsrP (**A**) y SacB (**B**). Tinción Coomassie de **1)** Marcador de peso molecular. **2)** Células IBT-PQ. **3)** Extracto de la enzima libre. **4)** Células IBT-PQ después del contacto con la enzima. Actividad in situ de: **2A)** Células IBT-PQ; **3A)** Extracto de la enzima; **4A)** Células IBT-PQ después del contacto con la enzima. **63**

Figura 20. Geles de actividad in situ SDS-PAGE. **A)** Ensayo de despegado de la enzima SacB unida a células. **B)** Ensayo de despegado de la enzima SacB-C-DsrP unida a células. **1.** Extracto de la enzima libre, **2.** Células IBT-PQ. Células IBT-PQ después de contacto con la enzima y lavadas con: **3.** 0.3M de NaCl; **4.** 0.6M de NaCl; **5.** 0.9M de NaCl; **6.** 1.2M de NaCl; **7.** 1.5M de NaCl..... **64**

Figura 21. Ensayos de contacto de las quimeras. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie de SacB-Tn-IslA (**A**) y de SacB-C-IslA (**C**). Geles SDS-PAGE de actividad in situ de SacB-Tn-IslA (**B**) y SacB-C-IslA (**D**). **1)** Células CW28 antes del contacto. **2)** Extracto de la quimera antes del contacto. **3)** Extracto de la quimera después del contacto. **4)** Células CW28 después del contacto que muestra en un círculo la presencia de la quimera..... **65**

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Propiedades cinéticas y bioquímicas de la inulosacarasa IslA de L. citreum CW28 y sus versiones truncadas.</i>	24
Tabla 2. <i>Medio sólido Luria Bertani (LB) para el aislamiento de E. coli transformadas.</i>	28
Tabla 3. <i>Medio SOC para la recuperación de células E. coli después del tratamiento térmico para transformarlas.</i>	29
Tabla 4. <i>Medio YT2X para la producción de enzimas recombinantes en E. coli TOP 10.</i>	29
Tabla 5. <i>Composición del medio de Leuconostoc mesenteroides (LM).</i>	29
Tabla 6. <i>Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y fusión de los genes.</i> ...	30
Tabla 7. <i>Condiciones de los ciclos en la reacción de PCR para la amplificación de los genes a fusionar.</i>	31
Tabla 8. <i>Condiciones de los ciclos en la reacción de PCR para la amplificación de los genes a fusionar.</i>	31
Tabla 9. <i>Tamaño, peso molecular y actividad de la fracción soluble de SacB y de sus quimeras construidas.</i>	44
Tabla 10. <i>Tiempo de vida media de SacB y sus quimeras.</i>	46
Tabla 11. <i>Parámetros cinéticos de la levansacarasa SacB y sus quimeras SacB-Tn-IslA y SacB-Tn-LevC.</i>	60
Tabla 12. <i>Actividad específica de las células CW28 después del contacto con los extractos de SacB-C-IslA, SacB-Tn-IslA y SacB.</i>	66

1. RESUMEN

La levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis*, es una fructosiltransferasa (FTF) unidominio que destaca en este tipo de enzimas por su estabilidad y sus propiedades cinéticas. Cataliza la transferencia de residuos fructosilo a partir de sacarosa para la síntesis de levana (polímero de fructosa) y fructósidos que tienen una amplia demanda en el mercado. Sin embargo, su eficiencia para efectuar reacciones de transfructosilación está limitada porque también hidroliza el sustrato, por lo que eliminar su actividad hidrolítica sería deseable. Una subfamilia de FTF's multidominio del género *Leuconostoc sp* estudiada en nuestro laboratorio, posee dominios N- y C-terminal con identidad a glucosiltransferasas (GTF's), y se caracteriza por mantener una alta tasa de transferencia para la síntesis de polímero. Ensayos realizados en nuestro grupo de trabajo indican que el dominio C-terminal influye sobre su alta eficiencia para la transfructosilación, específicamente el fragmento denominado "región de transición". En este trabajo se exploró la posibilidad de disminuir la actividad hidrolítica de la levansacarasa SacB de *B. subtilis* por medio de la fusión de un dominio C-terminal, ya sea de las FTF's multidominio y de sus regiones de transición, o de una GTF. Los resultados demuestran que mientras SacB transfiere al polímero el 50% del sustrato a altas concentraciones de sacarosa, las quimeras de SacB a las que se fusionó el C-terminal completo de FTF's multidominio transfieren un promedio del 85% y mantienen una mínima tasa de hidrólisis a bajas concentraciones de sustrato. Así mismo, las versiones quiméricas de SacB que poseen únicamente la región de transición alcanzan la misma eficiencia que las versiones con el C-terminal completo, lo que pone de manifiesto que esta región es suficiente para favorecer la actividad transferasa. Por otra parte, por medio de la evaluación bioquímica de las quimeras, se demostró que la fusión de estos dominios

no afecta la estabilidad de SacB ni altera su capacidad de transferencia a otros aceptores. Es de llamar la atención que una evaluación del comportamiento cinético lleva a la conclusión de que al adicionar las regiones de transición a SacB, se aumenta la velocidad específica de transferencia, lo que sugiere que el efecto de este dominio es por un ajuste estructural que favorece la afinidad hacia la molécula de polímero y con ello un aumento en la tasa de transferencia. Por otro lado, no se logró el mismo efecto con la fusión del C-terminal de la GTF, a pesar de la homología estructural que comparten con los dominios C-terminal de las FTF multidominio, demostrando que el efecto sobre la actividad transferasa va más allá de la estructura, aunque hasta el momento se desconoce la explicación. Se obtuvieron quimeras de SacB que con la fusión de un fragmento del C-terminal de FTF's multidominio son capaces de utilizar de forma eficiente la sacarosa para la síntesis de polímero y fructósidos sin perder su alta estabilidad y su capacidad de transferencia a otros aceptores.

2. INTRODUCCION

Los productos fructosilados como las fructanas, fructooligosacáridos y fructósidos son productos de un alto valor agregado y tienen un gran interés en la industria farmacéutica y alimenticia, así como en el área médica y nutricional.

Las enzimas bacterianas que sintetizan estos productos son llamadas fructosiltransferasas y catalizan la transferencia de residuos fructosilo de una molécula de sacarosa o rafinosa a una molécula aceptora. Sin embargo la actividad transferasa está limitada por la reacción de hidrólisis de sustrato, que es otra de las actividades que llevan a cabo las FTF's, cuando el agua compite como aceptor con otras sustancias del medio, disminuyen los rendimientos de la síntesis de fructósidos. Dentro de las FTF's se distinguen dos tipos de enzimas: las levansacarasas y las inulosacarasas. Las levansacarasas catalizan la síntesis de fructanas en las que cada monómero de fructosa está unido mediante enlaces β -2,6 y llegan a contener ramificaciones por medio de enlaces β -2,1. El polímero derivado es conocido como levana y tiene diversas aplicaciones en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética.

La inulosacarasa, el otro tipo de FTF's cataliza la síntesis del polímero inulina, que a diferencia de la levana tiene enlaces β -2,1 en la cadena principal y ramificaciones β -2,6. Este polímero y sus fructooligosacáridos se utilizan principalmente como nutracéuticos.

La estructura general de las FTF's consiste en un dominio catalítico en forma de β -propela de cinco hojas que en algunas enzimas de bacterias gram positivas contiene una región C-terminal de anclaje a pared celular denominado LPXTG (Rathsam y Jaques 1998). Una subfamilia de FTF's del género *Leuconostoc sp*, reportada por nuestro grupo de trabajo, posee regiones que flanquean al dominio catalítico con identidad a dominios N- y C-terminal de GTF's (enzimas que transfieren el residuo

glucosilo de la sacarosa). Cuatro miembros conforman esta subfamilia de quimeras naturales: la inulosacarasa **IsIA** de *L. citreum* CW28 (Olivares *et al.* 2003), la levansacarasa **LevS** de *L. mesenteroides* B512F (Morales *et al.* 2006) y las levansacarosas **LevC** y **LevL** de *L. mesenteroides ssp mesenteroides* ATCC 8293 (Olvera-Carranza *et al.* 2007). A diferencia de las FTF's convencionales, éstas quimeras resultan más específicas para la síntesis de polímero y la transferencia al agua (hidrólisis) se ve reducida. Estudios realizados sobre versiones truncadas de la inulosacarasa IsIA (del Moral *et al.* 2008) revelaron que estos dominios le confieren estabilidad y mayor capacidad de transfructosilación ya que estas dos propiedades se vieron afectadas al eliminar el C-terminal, particularmente la región de transición. Se ha propuesto, que la región de transición podría interactuar con el dominio catalítico favoreciendo la formación de una vía larga que dificulta la accesibilidad de la molécula de agua al sitio activo donde se ubica el residuo fructosilo, lo que disminuye su transferencia al agua y favorece la transferencia hacia el polímero (del Moral *et al.* 2008).

Si bien, las FTF's multidominio de *Leuconostoc sp* son menos hidrolíticas y por tanto más eficientes en la reacción de transfructosilación, existen FTF's unidominio que son capaces de transferir la fructosa con mayor facilidad a otros aceptores y son más robustas que las FTF's multidominio. Un claro ejemplo es la levansacarasa SacB de *B. subtilis* que es considerada una enzima versátil dadas sus características de alta estabilidad, solubilidad y moléculas aceptoras a las que es capaz de fructosilar. Sin embargo, al igual que el resto de las FTF's unidominio, los rendimientos en la síntesis de sus productos se afectan por la alta actividad hidrolítica. Por tanto, resulta interesante explorar la hipótesis de aprovechar la estructura robusta de SacB y la especificidad que confieren los dominios de las FTF's de *Leuconostoc sp* y combinar ambos en una sola estructura.

3. ANTECEDENTES

3.1 FRUCTANAS

Las fructanas son homopolisacáridos hidrosolubles de β -D-fructofuranosa sintetizados a partir de sacarosa. Cuando en la cadena principal cada monómero está unido por enlaces β -2,1 la fructana es llamada inulina, si se encuentran unidos por enlaces β -2,6 se le denomina levana (figura 1). La inulina puede estar ramificada mediante enlaces β -2,6 y la levana por enlaces β -2,1. Dependiendo de la enzima productora las fructanas pueden alcanzar diversos grados de polimerización y pueden o no estar ramificadas. Si el grado de polimerización es menor de 10 unidades, las fructanas son llamadas fructooligosacáridos o FOS.

Las fructanas son sintetizadas de forma natural por plantas como los cereales, agaves, pastos y plantas ornamentales, por hongos principalmente del género *Aspergillus*, así como por una gran diversidad de bacterias tanto gram positivas como gram negativas. Las funciones que cubren estos polímeros en plantas y hongos son como reserva de carbohidratos y protección contra la desecación y estrés a bajas temperaturas (Vijn y Smeekens 1999).

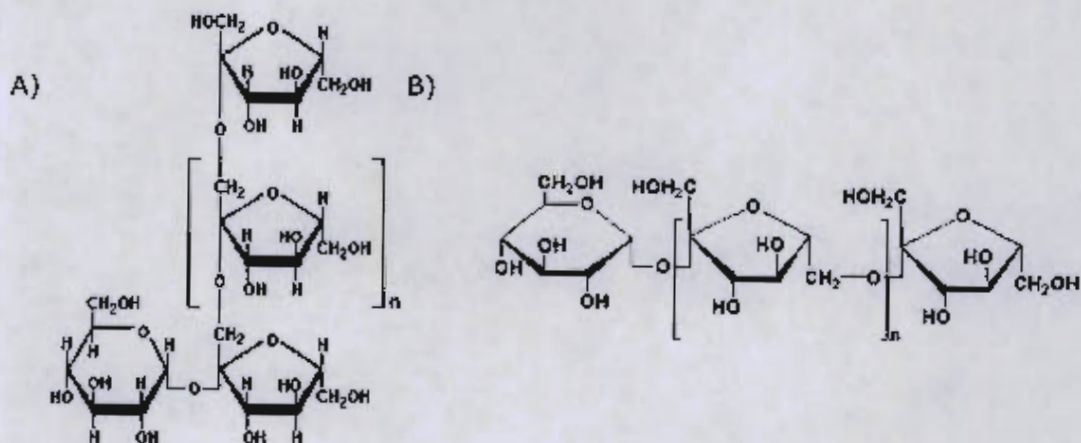


Figura 1. Representación de la estructura de la inulina (A) y levana (B)

Las fructanas de origen vegetal son mezclas con diferentes grados de polimerización, pero son usualmente de bajo peso molecular (<300 unidades). Las producidas por bacterias son generalmente polímeros de alto peso molecular y con mayor frecuencia de tipo levana (2×10^4 a 50×10^6 Da).

En general, las fructanas son homopolímeros naturales en los que los anillos furano de la fructosa tienen una mayor flexibilidad que los anillos pirano que se encuentran en la mayoría de los polisacáridos de reserva. Las uniones β -2,6 de las moléculas de levana son flexibles y tienden a girar hacia la izquierda mientras que los de inulina hacia la derecha. Son polímeros amorfos y microcristalinos.

La solubilidad de las fructanas en agua fría es variable, pero en general son muy solubles en agua caliente e insolubles en alcohol etílico absoluto. Poseen una glucosa al inicio de la cadena cuando la sacarosa actúa como iniciador. Son susceptibles a la hidrólisis por ácidos y por hidrolasas específicas producidas de hongos. Su peso molecular y su viscosidad dependen del número de unidades en la cadena principal, y de las ramificaciones que a su vez varían según el tipo de enzima que las producen. Generalmente su viscosidad en soluciones acuosas incrementa cuando varias sales están presentes, pero decrece drásticamente con la temperatura (Han, 1990).

Los FOS de inulina tienen un sabor dulce, mientras que las fructanas de cadena larga ya sea de inulina o levana forman emulsiones con una textura similar a la que forman las grasas y poseen un sabor neutro (Vijn y Smeekens, 1999).

3.1.1 Usos y aplicaciones

La inulina y los FOS son ingredientes de los denominados alimentos funcionales y son considerados como nutracéuticos. Ambos resisten la degradación en el tracto digestivo y posteriormente son fermentados en el colon provocando una estimulación selectiva de bacterias benéficas como las bifidobacterias, por lo que se les clasifica como prebióticos. El hecho de que no sean totalmente digeribles también las hace interesantes desde el punto de vista dietético, por lo que los FOS son utilizados como sustituto de azúcar y la inulina se emplea como sustituto de grasa (mayonesas "light" y quesos "bajos en calorías"), además de que mejora la sensación al paladar de algunos productos lácteos fermentados, postres como

gelatinas y helados, productos horneados como galletas y pasteles y fórmulas de alimento para infantes (Roberfroid. 2000).

La levana por su parte, es ampliamente utilizada en la industria alimenticia y farmacéutica por sus características químicas y estructurales. En la industria lechera se adiciona en productos como yogurts, crema y postres derivados de la leche ya que pueden actuar como texturizantes y estabilizantes que incrementan la viscosidad y la capacidad de retención del agua. De esta forma brindan firmeza y cremosidad al producto final (Duboc y Mollet 2001).

En el área clínica, algunos estudios revelaron que la levana es un buen agente antitumoral, ya que activa la liberación de citotoxinas inhibidoras del crecimiento celular (Lifely. 1988). Además, se ha reportado que la administración de levana a ratas ejerce efectos que contrarrestan la obesidad y disminuye los niveles de lípidos, puesto que inhibe la lipogénesis y estimula la lipólisis (Kang *et al.* 2006). Se ha demostrado la capacidad de las levanas de alto peso molecular como agente hipocolesterolémico (Yamamoto *et al.* 1999). Kim y colaboradores (2005) realizaron un estudio con la levana producida por *Zymomonas mobilis* en el que determinaron que ésta ejerce una acción anti-inflamatoria una vez que la piel está irritada, además de que favorece la proliferación celular aplicándola sobre la piel, por lo que sugieren que podría ser utilizado como un agente cosmético. Industrialmente la levana se ha propuesto en la elaboración de gomas, sustituto de plasma en sangre; y por las características reológicas que proporciona a soluciones acuosas ayuda en las formulaciones como agente encapsulante y como portador de sabores y fragancias (Han 1990).

3.2 FRUCTOSILTRANSFERASAS

Las fructanas son sintetizadas por enzimas llamadas fructosiltransferasas (FTF's) (E.C. 2.4.1.) que catalizan la transferencia de residuos fructosilo de una molécula donadora a una molécula aceptora. Utilizan principalmente a la sacarosa como molécula donadora ya que posee un grupo fructosilo no sustituido unido a un grupo aldósil, aunque también puede utilizar a la rafinosa (Dedonder R. 1966., Tiekling M. *et al* 2005., Ozimek L. *et al*. 2006). La energía almacenada en el enlace glicosídico de la sacarosa permite la transferencia eficiente de un residuo D-fructosilo para la formación del producto por lo que no requiere de cofactores ni compuestos fosforilados de alta energía para la reacción (Chambert y Gonzy-Tréboul 1976). Como moléculas aceptoras pueden actuar aquellas que posean un grupo hidroxilo como alcoholes, monosacáridos, sacarosa, rafinosa, fructana y agua. Se pueden llevar a cabo tres reacciones diferentes dependiendo de la molécula aceptora:

- 1) Hidrólisis del sustrato, cuando el agua es usada como aceptor (actividad hidrolasa). En el caso de la sacarosa se libera glucosa y fructosa al medio de reacción.
- 2) Reacción de transfructosilación cuando la sacarosa, los FOS o las cadenas de fructana actúan como aceptor (actividad transferasa). Dependiendo de la enzima se producen fructooligosacáridos o un polímero de fructosa (fructana) de distintos grados de polimerización.
- 3) Síntesis de fructósidos, cuando la transfructosilación ocurre hacia moléculas adicionadas al medio de reacción y que pueden actuar como aceptor fructosilo, tales como monosacáridos, oligosacáridos y alcoholes como el metanol o glicerol (Dedonder R. 1966., Tanaka T. *et al* 1981., Tiekling M. *et al*. 2005., Waldherr F. *et al*. 2008).

La figura 2 esquematiza las reacciones llevadas a cabo por las FTF's, donde se ejemplifica también la reacción de aceptor con la maltosa.

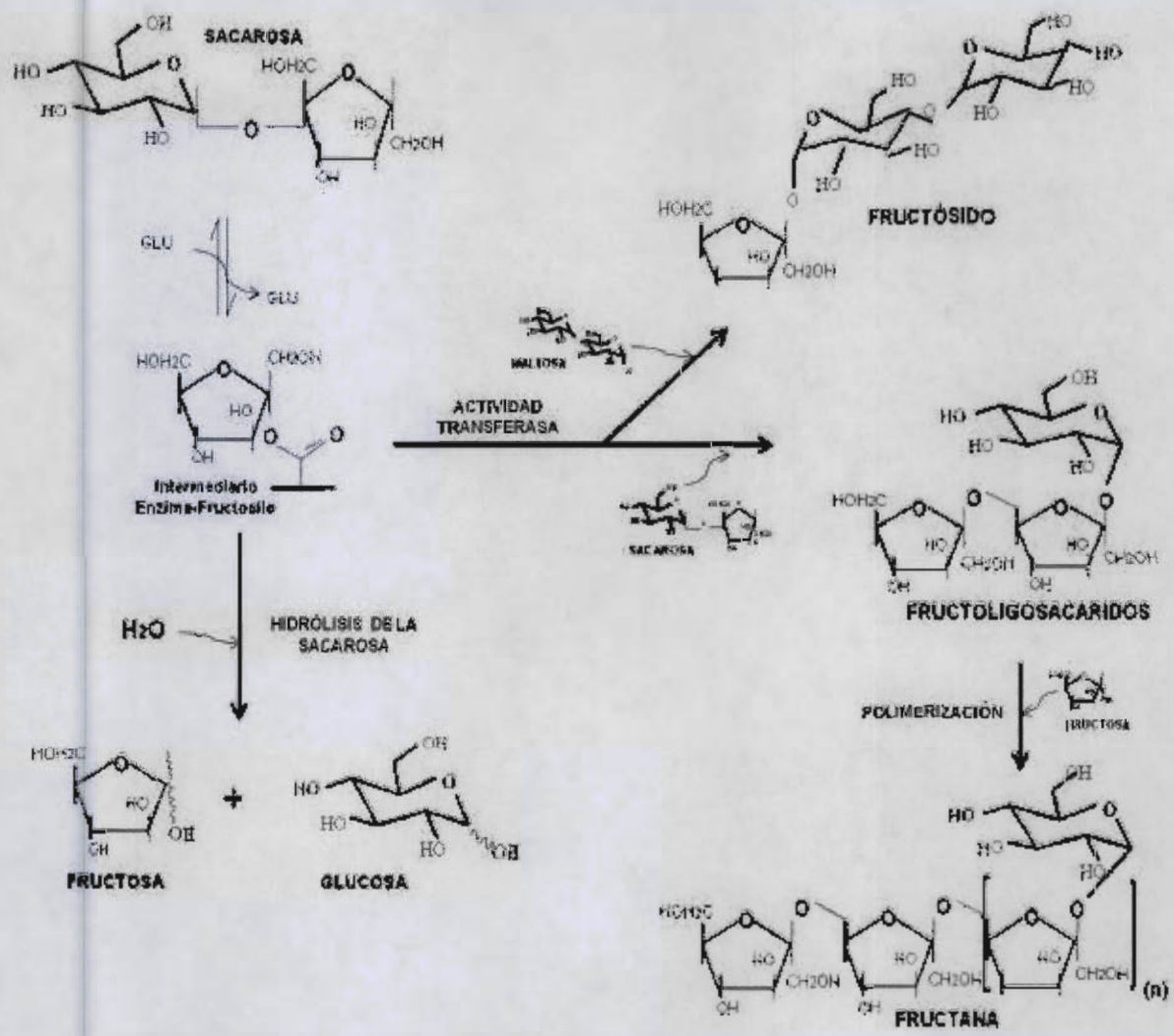


Figura 2. Reacciones catalizadas por las fructosiltransferasas (adaptado de esquema de Martínez-Fleites et al. 2005)

En el reino vegetal, las fructanas están presentes en alrededor de un 15% de plantas, y su síntesis es llevada a cabo por la acción concertada de varias enzimas. El primer paso de la síntesis involucra la formación del trisacárido 1-kestosa por medio de la transferencia de un residuo de fructosa a la sacarosa realizado por la enzima 1-SST (sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa). En el segundo paso, la enzima 1-FFT intercambia residuos fructosilo de fructana a fructana y así, se sintetizan fructanas de diversos grados de polimerización que llegan a ser de hasta

200 unidades. Otra enzima como la 6-SST da a las fructanas de origen vegetal una estructura heterogénea, sintetizando oligofructanas con enlaces β -2,6 (6-kestosa) (Duchateau *et al.* 1995)

Las fructanas bacterianas requieren solamente de una FTF's para su síntesis y se dividen en inulosacarosas y levansacarosas, que sintetizan inulina y levana respectivamente. Existe una gran variedad de bacterias que producen FTF's con actividad levansacarasa. Entre las gram positivas se ha reportado a *Bacillus subtilis*, *B. circulans*, *B. amyloliquefaciens* y *B. megaterium* además de *Lactobacillus reuteri*, *L. sanfranciscensis* y *L. panis*, *Leuconostoc mesenteroides* y algunas especies de *Streptococcus*. Entre las gram negativas reportadas destacan *Zymomonas mobilis*, *Erwinia herbicola* y *E. amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *P. pv. phaseolicola*, *Rahnella aquatilis* y *Gluconacetobacter diazotrophicus*. La función fisiológica de la levana en estos microorganismos está principalmente asociada a la de adhesión a su nicho, lo que para algunas especies es un factor de patogenicidad que facilita la infección e invasión. Los exopolisacáridos de *Streptococcus*, entre los que se encuentran glucanas y la levanas, están implicados en la formación de placa dentobacteriana, donde los polímeros de glucosa y fructosa participan en la adhesión de las bacterias a la superficie del diente (Rozen *et al.* 2001); *Erwinia amylovora*, que es un fitopatógeno, activa genes de infección que expresan levansacarosas, las que le confieren virulencia ya que favorecen la invasión (Zhao *et al.* 2005).

A diferencia de las levansacarosas, la actividad inulosacarasa no es frecuente en bacterias. De hecho la inulina y los FOS son en su mayoría producidos por enzimas de plantas y algunas especies de hongos. Entre las bacterias reportadas como productoras de inulosacarosas están *Streptococcus mutans* (Shiroza y Karanitzu, 1988), *Lactobacillus reuteri* (Van Geel. *et al.* 1999; Van Hijum *et al.* 2002), *Leuconostoc citreum* (Olivares *et al.* 2003), *Bacillus sp.* (Wada *et al.* 2003) y *Lactobacillus jonsonii* (Anwar *et al.* 2008).

3.3 ESTRUCTURA DE LAS FRUCTOSILTRANSFERASAS

Las fructosiltransferasas bacterianas están clasificadas dentro de la familia 68 de las glicosilhidrolasas (GH68), en esta familia se incluye a las invertasas de *Zymomonas mobilis* y *Bacillus sp.* (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/cazy/families.html>). Las proteínas que están consideradas dentro de las glicosilhidrolasas, comprenden una gran diversidad de plegamientos y sustratos específicos; en su catálisis participan residuos ácidos que actúan como donadores de protones y nucleófilos o bases en general; la ruptura de los enlaces glucosídicos tiene una estereoquímica tal que se retiene la configuración anomérica (Pons *et al.* 2004).

En general es posible dividir a las FTF's en dos grandes grupos: unidominio y multidominio y su estructura primaria depende del tipo de microorganismo que las producen. Las FTF's de bacterias gram negativas tienen un peso molecular que varía entre 45 y 65kDa, están constituidas por un solo dominio catalítico de 500 a 800 aminoácidos (aa). En contraste, las FTF's de microorganismos gram positivos alcanzan pesos moleculares de hasta 170kDa ya que su estructura primaria está distribuida en tres regiones bien definidas que incluyen al dominio catalítico. Una excepción son las FTF's producidas por el género *Bacillus* y algunas de *Streptococcus*, ya que, al igual que las gram negativas, solo poseen un dominio (Figura 3).

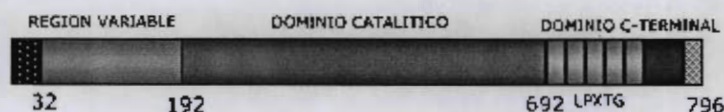


Figura 3. Representación esquemática de la estructura general de las fructosiltransferasas bacterianas.

La estructura primaria de las bacterias gram positivas consta de:

3.3.1 Región amino terminal

Contiene el péptido señal (~35aa) que transporta a la enzima hacia la superficie celular para ser translocada al exterior de la célula una vez que ha sido procesada. Le sigue una secuencia altamente variable de 100 a 200aa cuya función se desconoce. Análisis de secuencia primaria revelan que la levansacarasa de *Lactobacillus sanfranciscensis* posee 7 elementos de repetición (DNATSGSTKQESSIAN) que poseen identidad con otras proteínas de secreción o que están localizadas en la superficie celular (Tieking *et al.* 2005).

3.3.2 Dominio catalítico

Este dominio se encuentra conservado en las FTF's y consta de aproximadamente 500aa. La estructura cristalográfica de las levansacarasas SacB de *B. subtilis* y LsdA de *G. diazotrophicus* fue determinada a una resolución de 1.5 y 2.5 Å respectivamente. Las estructuras revelan que comparten un plegamiento conservado, el cual tiene una estructura tipo β -propela de 5 hojas que adopta una topología en "W" de 4 hebras β -antiparalelas y que posee una cavidad central en forma de embudo en cuyo centro se encuentran los residuos catalíticos (figura 4) (Meng y Fütterer 2003; Martínez-Fleites *et al.* 2005).

Derivado de la estructura cristalográfica se sabe que las cinco secuencias motivo mayormente conservadas en la familia 68GH (VWD, EWSG, RDP, DEIER y TYS) forman parte de la cavidad central y solo DEIER pertenece a un asa o "loop". Dentro de estos cinco motivos destacan tres residuos ácidos invariables que en la levansacarasa de *B. subtilis* son: los residuos catalíticos Asp86 en el motivo VWD y Glu342 en el motivo DEIER. El Asp247 que se encuentra en el motivo RDP participa estabilizando al residuo fructosilo (Meng y Fütterer 2003).

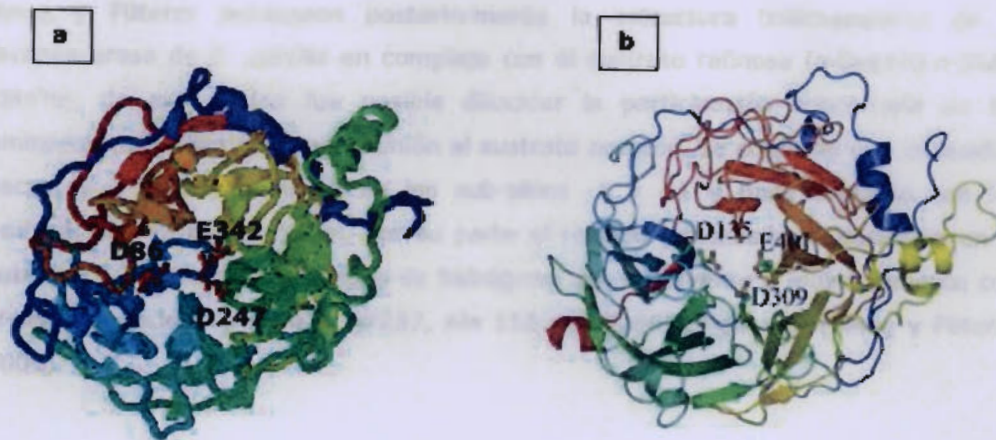


Figura 4. Modelo tridimensional de la estructura β -propela de 5 hojas que adoptan la levansacarasa SacB de *B. subtilis* (a) y la levansacarasa LsdA de *G. diazotrophicus* (b), también se muestran los residuos catalíticos con su correspondiente nomenclatura.

A partir de la estructura tridimensional de la levansacarasa SacB de *B. subtilis* en complejo con la sacarosa fue posible identificar los aminoácidos que dirigen el posicionamiento correcto del sustrato donador. El Asp247 y el Trp85 resultan clave para el acomodo de la molécula de fructosa que se posiciona en el sub-sitio -1 (nomenclatura de Davies 1997). El residuo glucosilo se posiciona en el sub-sitio +1 y es coordinado por la Arg360, Glu340 y la Arg246 principalmente (figura 5) (Meng y Fütterer 2003).

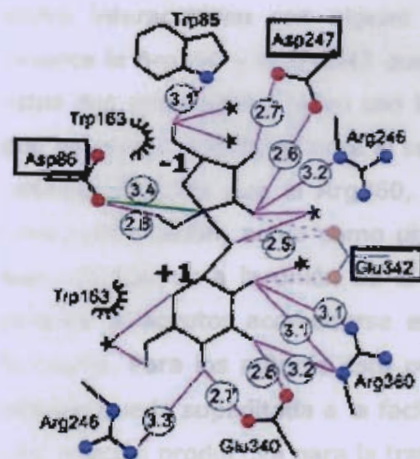


Figura 5. Distancias y contactos entre la levansacarasa de *B. subtilis* y la sacarosa. En recuadro los aminoácidos catalíticos. Las líneas en color magenta continuas y punteadas indican puentes de hidrógeno, en círculos están sus distancias. Los números -1 y +1 indican el sub-sitio de la cavidad catalítica.

Meng y Fütterer publicaron posteriormente la estructura tridimensional de la levansacarasa de *B. subtilis* en complejo con el sustrato rafinosa (α -Gal(1-6) α -Glu(1-2) β -Fru), de esta forma fue posible dilucidar la participación concertada de los aminoácidos involucrados en la unión al sustrato aceptor. Se confirmó que el residuo sacarosa (Fru-Glu) se ubica en los sub-sitios -1 y +1 y hace contacto con los aminoácidos ya mencionados, por su parte el residuo galactosilo se posiciona en el sub-sitio +2 a través de puentes de hidrógeno con el solvente e indirectamente con otros aminoácidos (Asn242, Tyr237, Ala 116 y Arg246) (Figura 6) (Meng y Fütterer 2008).

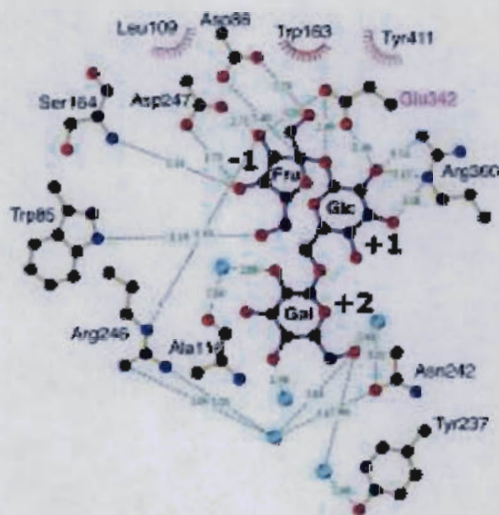


Figura 6. Distancias y contactos entre la levansacarasa de *B. subtilis* y la rafinosa. Los puentes de hidrógeno están indicados por líneas verdes punteadas, los residuos que interactúan por medio de fuerzas de van der Waals o hidrofóbicas se esquematizan como pelnes rojos doblados. Las esferas azules representan moléculas de agua. Los números -1, +1 y +2 indican el sub-sitio en la cavidad catalítica.

Se observó, que las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman el sitio activo interactúan con alguno de los tres sub-sitios de forma independiente, excepto la Arg360 y el Glu342 que participan en al menos dos sub-sitios. En efecto, estos dos aminoácidos junto con la Asn242 intervienen en una red de interacciones que posicionan correctamente al sustrato aceptor y donador (Figura 6). La estructura también muestra que la Arg360, cuya función está relacionada con el proceso de transfructosilación, actúa como un "ancla" alternando entre dos tipos de rotámeros que contribuyen a la unión de la molécula donadora o aceptor. Dicha flexibilidad permite al aceptor acomodarse en distintas orientaciones con respecto al residuo fructosilo. Para los autores esto permite inferir que la afinidad de unión al sustrato aceptor queda supeditada a la facilidad con que esta "ancla" acomode al sustrato en una posición productiva para la transfructosilación (Meng y Fütterer 2008).

3.3.2.1 Sitio de unión a calcio

Las FTF's de bacterias gram positivas poseen una fuerte dependencia del ión calcio para su actividad. Su papel funcional se ha demostrado utilizando varias enzimas del género *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* mediante la incorporación de Ca^{+2} y subsecuente extracción con EDTA (Jaques 1984; Song y Jaques 1999; Morales et al. 2006; Waldherr et al. 2008; Anwar et al. 2008; del Moral et al. 2008). La estructura tridimensional revela que en la levansacarasa de *B. subtilis*, el Asp339 presente en el motivo DEIER coordina directamente a un ión Ca^{+2} (Meng y Futerer 2003); la mutación del correspondiente residuo en las FTF de *Lactobacillus reuteri* permitió observar que el ión tiene una influencia importante en la estructura de la enzima actuando sobre el plegamiento de la proteína, proporcionándole mayor estabilidad, lo que redundaba en una mayor capacidad catalítica de la enzima (Ozimek et al. 2005). Por otro lado, el alineamiento de la secuencia de los miembros de la familia GH68 revela que los residuos involucrados en la unión a Ca^{+2} están ausentes en las proteínas de bacterias gram negativas (Ozimek et al. 2005). La estructura cristalográfica de la levansacarasa de *G. diazotrophicus* indica la formación de un puente disulfuro que aparentemente ejerce un efecto similar al del sitio de unión a calcio en la estabilidad de la enzima (Martínez-Fleites et al. 2005).

3.3.3 Region carboxilo-terminal

Las FTF's asociadas a la superficie celular como las del género *Lactobacillus* y la levansacarasa de *Streptococcus salivarius* poseen una región C-terminal de aproximadamente 100 aa que presenta secuencias repetidas tipo LPXTG (figura 3), seguidas de una región altamente hidrofóbica que finaliza en un tallo de tres aminoácidos cargados positivamente (Rathsam et al. 1993; van Hijum et al. 2002; Tiekink et al. 2005; Anwar et al. 2008; Waldherr et al. 2008). La participación directa de esta región en el anclaje a la pared celular ha sido demostrada en la levansacarasa de *Streptococcus salivarius*, ya que las versiones truncadas en el C-terminal pierden su capacidad de asociarse a las células (Rathsam y Jaques 1998). El motivo LPXTG ha sido estudiado ampliamente en otras proteínas no relacionadas a FTF's de especies tales como *Actinomyces*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Se sabe que la asociación a la superficie celular es por medio de la unión covalente al péptido glicano de la pared celular (Navarre y Schneewind 1999).

3.4 MECANISMO DE REACCIÓN

Estudios realizados en las levansacarasas de *B. subtilis*, *S. salivarius* y *G. diazotrophicus* sobre el mecanismo de reacción, indican que éste se ajusta a un modelo cinético tipo Ping-Pong Bi Bi (Figura 7). La reacción completa se lleva a cabo en dos pasos mediante un mecanismo de doble desplazamiento que implica la formación y subsecuente hidrólisis de un intermediario covalente enzima-fructosilo (Chambert R. *et al.* 1974, Hernández *et al.* 1995, Song y Jacques 1999). De acuerdo con dicho mecanismo la enzima forma un complejo enzima-sustrato (ES) que posteriormente da lugar a un intermediario covalente enzima-fructosilo (EF). Finalmente el residuo fructosilo es transferido a la molécula aceptora, aumentando el grado de polimerización cuando la molécula aceptora es una cadena de levana.

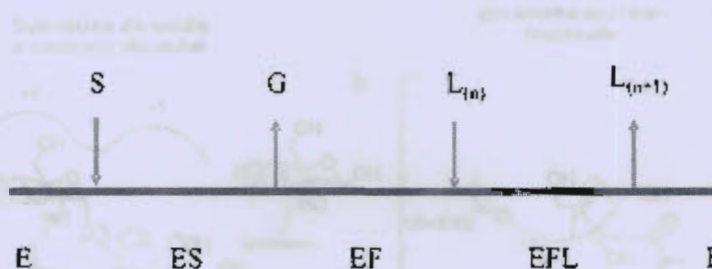


Figura 7. Modelo del mecanismo Ping-Pong Bi Bi (Notación de Cleland) propuesto para la levansacarasa. E: enzima; S: sacarosa; G: glucosa; F: residuo fructosilo; L(n): levana con "n" residuos de fructosa.

Basados en los requerimientos estructurales para la catálisis y la geometría del sitio activo, es posible describir lo que ocurre durante el mecanismo. En los primeros pasos de la reacción, el sustrato donador (sacarosa) se une a los sub-sitios -1 y +1 del sitio activo. El grupo β -carboxilo del Asp86 realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono 2 de la fructosa y forma un intermediario covalente enzima-fructosilo (EF) a través de un enlace glucosilo-éster en el sub-sitio -1. Subsecuentemente el Glu342 protona al grupo glucosilo saliente que entonces es liberado del sub-sitio +1 de la enzima (Figura 8a). La reacción anterior da lugar a la unión α de la fructosa con la proteína, invirtiendo la configuración. Tomando en cuenta que las levansacarasas catalizan la reacción de transfructosilación con retención de la configuración, ocurre entonces un mecanismo de doble desplazamiento, en el que hay una segunda inversión de la configuración de la fructosa al liberarse del complejo EF (Figura 8b).

En el segundo paso de la reacción del mecanismo de doble desplazamiento, el sustrato aceptor se une ahora al sub-sitio +1 a través de la coordinación principal con la Arg360 y al sub-sitio +2 por una coordinación secundaria con la Asn242, de esta manera el grupo ácido desprotonado del Glu342 sustrae un protón del carbono anomérico del aceptor, lo que da lugar a un anión altamente reactivo que realiza un ataque nucleofílico sobre el enlace éster del complejo EF para que finalmente el residuo fructosilo unido a la enzima sea transferido al aceptor y se alargue la cadena ((Figuras 8c y 8d). Por otro lado, cuando ocurre solamente la hidrólisis del sustrato donador (sacarosa o rafinosa) la molécula de agua, reacciona con el intermediario enzima-fructosilo liberando a la fructosa (Chambert *et al* 1974; Meng y Fütterer 2003 y 2008).

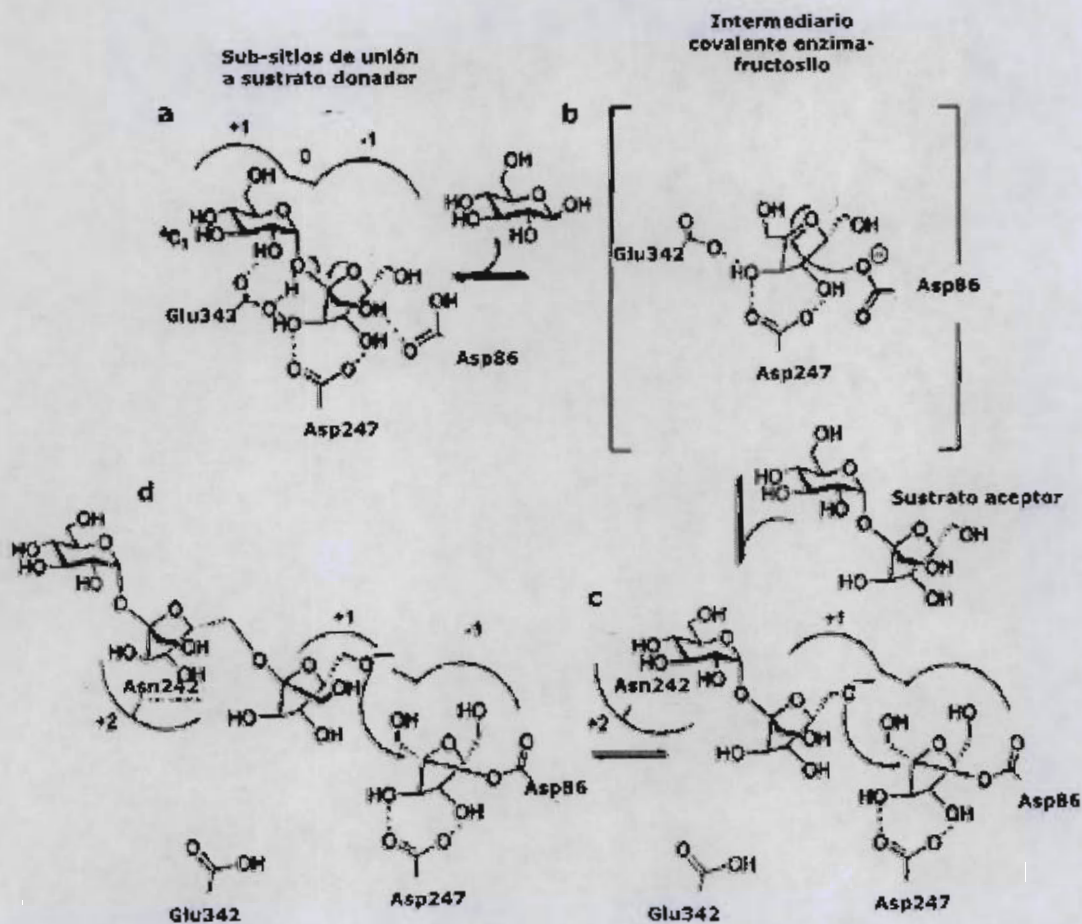


Figura 8. Modelo del mecanismo de doble desplazamiento propuesto para las FTF's (Adaptado de artículo de Homann *et al* 2007).

Datos cinéticos y estructurales realizados en la levansacarasa de *B. subtilis* y *Z. mobilis* permiten identificar a los aminoácidos que han sido señalados como los residuos catalíticos que participan en la ruptura del enlace glicosídico de la sacarosa ya que su alteración disminuye drásticamente la actividad (Meng y Fütterer 2008; Yanase *et al* 2002).

Por otra parte, se ha relacionado el papel de la Arg360 de *B. subtilis* (His296 *Z. mobilis*) con la capacidad de transfructosilación ya que su mutación disminuye drásticamente la capacidad de transfructosilación pero no la actividad de hidrólisis. Se ha sugerido que este residuo actúa como un sitio de unión y reconocimiento para el sustrato aceptor ya que la fuerte carga positiva de la cadena lateral de la Arg360 (His296 *Z. mobilis*) obliga al sustrato a posicionarse en una orientación productiva hacia los aminoácidos catalíticos, originando así la transfructosilación (Chambert y Petit-Glatron 1991; Yanase *et al.* 2002; Lin *et al* 2008).

Una vez que ha ocurrido la transfructosilación la elongación de la cadena podría ocurrir por medio de tres mecanismos diferentes:

- a. **Crecimiento procesivo de una cadena:** Los residuos de fructosa son agregados sucesivamente a la misma cadena de polímero que permanece asociada a la enzima, hasta que concluye la síntesis.
- b. **Crecimiento no procesivo múltiple:** El residuo fructosilo se une al azar a cualquier molécula de polímero aceptor, liberándola al medio después de cada adición.
- c. **Crecimiento multirepetitivo:** Los residuos fructosilo se agregan en grupos de más de uno a la molécula aceptor.

Ozimek y colaboradores (2006) proponen que la levansacarasa de *Lactobacillus reuteri* que sintetiza únicamente polímero lleva a cabo la síntesis a través de un mecanismo procesivo. Por su parte, la inulosacarasa de *L. reuteri* utiliza un mecanismo no-procesivo ya que sintetiza mayormente fructooligosacáridos. El autor plantea, que esta diferencia puede deberse a que las FTF's que utilizan mecanismos procesivos poseen una mayor afinidad por las cadenas de polímero que las FTF's que utilizan mecanismos no procesivos, lo que permite a la enzima agregar sucesivamente los monómeros de fructosa a la misma cadena asociada a la misma enzima.

En diversos trabajos se ha propuesto que la función del sub-sitio +2 es la de orientar al aceptor en una posición óptima que le permita una transfructosilación mediante un mecanismo procesivo (polimerización) (Ozimek *et al* 2006; Homann *et al* 2007). Esta hipótesis es apoyada por los trabajos realizados por Homann en los que la alteración de la Asn252 en la levansacarasa de *Bacillus megaterium* (Asn242 en *B. subtilis*), produce una mutante que pierde la capacidad de sintetizar polímero y solamente produce oligosacáridos, de igual forma la enzima mantiene su K_M y su k_{cat} intactas. Homann además realizó un análisis tridimensional superponiendo los sub-sitios +2 de una levansacarasa que sólo sintetiza polímero (SacB de *B. subtilis*) y el de una levansacarasa que mayormente sintetiza fructooligosacáridos (LsdA de *G. diazotrophicus*), el cuál reveló que la Asn306 de LsdA (Asn242 en SacB) se encuentra en una posición que afecta el espacio estérico del sub-sitio +2, lo que disminuye la afinidad por la cadena de polímero y podría dar lugar a un mecanismo no-procesivo de síntesis de fructooligosacáridos (Homann *et al.* 2007).

3.4.1 Hidrólisis vs Transferencia

Dada la competencia entre la molécula de agua y la molécula aceptora, la eficiencia de la actividad transferasa siempre está limitada por la reacción de hidrólisis, aunque se sabe que altas concentraciones de sustrato favorecen la transfructosilación. Una alta afinidad de unión del aceptor podría disminuir este efecto, sin embargo, la geometría del sitio activo indica una interacción débil con el aceptor en los sub-sitios +1 y +2 (Meng y Fütterer 2008). Según Meng y Fütterer esto explica porqué se requiere de altas concentraciones de sustrato para que ocurra la transferencia de manera eficiente (>250mM).

Diversos trabajos se han enfocado en aumentar la eficiencia de la transfructosilación modificando las condiciones de reacción. Se sabe que el uso de altas concentraciones de sacarosa o la adición de fructana al medio de reacción mejora la disponibilidad de las moléculas aceptoras, lo que disminuye la actividad de hidrólisis (Tanaka *et al.* 1979; Euzenat *et al.* 1997; Song and Jaques 1999; Ammar *et al.* 2002). De igual forma, es posible modular el rendimiento a través de la temperatura, ya que la actividad transferasa se ve favorecida a bajas temperaturas (Jang 1992; Euzenat *et al.* 1997; Ammar, 2002). Por otro lado, la síntesis en presencia de solventes orgánicos aumentan el rendimiento de producción de polímero ya que disminuye la

3.5 FRUCTOSILTRANSFERASAS DE *Leuconostoc sp.*

El grupo de biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM reportó la existencia de una nueva subfamilia de FTF's provenientes del género *Leuconostoc* (Figura 9). Su dominio catalítico está flanqueado por regiones con identidad a dominios N-terminal y C-terminal de GTF's, que son enzimas que transfieren los residuos glucosilo de la sacarosa. La conclusión es que se trata de quimeras naturales que combinan características estructurales de FTF's y GTF's.

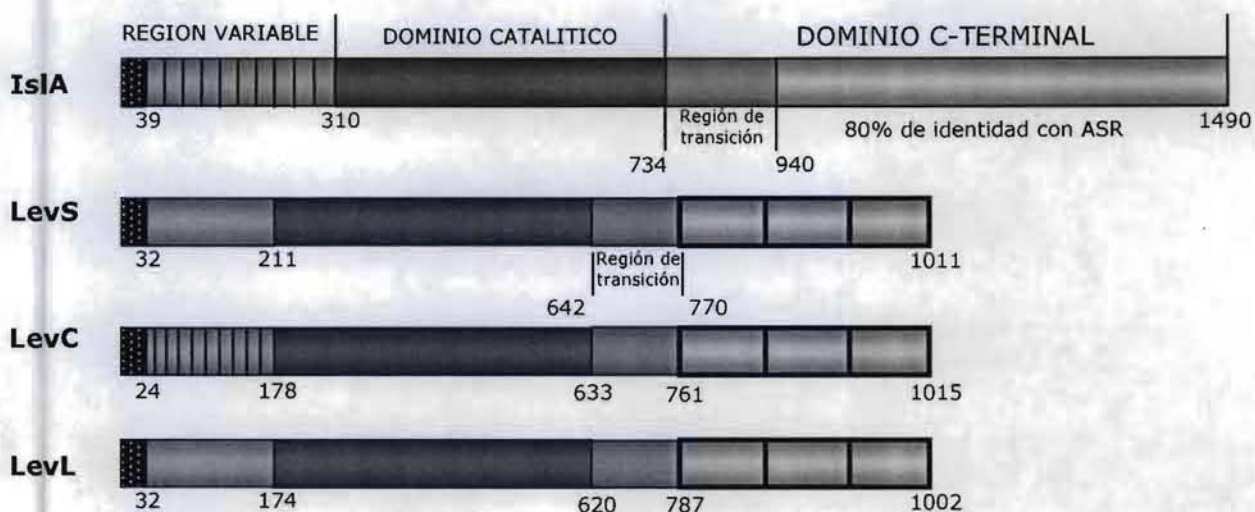


Figura 9. Esquema de la estructura primaria de las FTF's de *Leuconostoc sp.*

3.5.1 Inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28 (IslA)

En 2003, fue aislada del pozol (una bebida fermentada maya) una inulosacarasa de 165KDa asociada a pared celular de *Leuconostoc citreum* CW28 (IslA) (figura 9), el peso molecular más alto reportado hasta esa fecha para FTF's (Olivares *et al.* 2003). De forma interesante su dominio N-terminal presenta una homología del 40% con la región variable de una GTF, la alternansacarasa (ASR) de *L. mesenteroides* NRRL B-1355. Además, el dominio N-terminal cuenta con 10 secuencias repetidas de 12aa

(KDSKVATSELA) (Olvera *et al.* 2007) y su dominio catalítico corresponde a FTF's conocidas. Su largo dominio C-terminal presenta una alta similitud con el C-terminal de la ASR, los primeros 206aa son llamados "región de transición" ya que solo posee una identidad del 25% con ASR mientras que los 550aa restantes comparten el 80% de la secuencia del C-terminal de ASR. Se ha demostrado que en Isla este dominio juega un papel importante en el anclaje a pared celular, ya que en su ausencia la enzima no tiene la capacidad de asociarse a las células de *L. citreum*. Dicha propiedad se atribuye a que posee un 26% de identidad con la región de unión a pared celular de la amidasa Ami de *Listeria monocytogenes* que contiene 8 módulos GW (del Moral *et al.* 2008).

3.5.2 Levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides*

Morales y cols. (2006) reportaron el aislamiento de un segundo gen de estas características en *Leuconostoc mesenteroides* B512F, con 3033 pb que codifican para una proteína de 1022 aminoácidos correspondiente a una levansacarasa de un peso molecular de 111 kDa (LevS) (figura 9). La estructura primaria de la proteína presenta un patrón similar a la inulosacarasa Isla en el que su dominio N-terminal incluye una región variable que tiene un 25% de identidad con una GTF de *Leuconostoc mesenteroides*. El dominio catalítico tiene identidad con las FTF's de las especies de *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Por otro lado, el dominio C-terminal es similar al dominio C-terminal de GTF's de algunas especies de *Streptococcus* y *Leuconostoc*. Este dominio posee una región de transición de 128 aa seguida por tres secuencias repetidas de 90 aminoácidos cuya función no ha sido estudiada.

Basados en el análisis de la secuencia de *levS*, el grupo de trabajo logró aislar dos levansacarasa (LevC y LevL) de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* ATCC 8293 con las mismas características químicas. LevC y LevL presentan una disposición de dominios adicionales que flanquean a su dominio catalítico (figura 9). La región N-terminal específicamente de LevC presenta una serie de 10 secuencias repetidas de 13 aminoácidos similares al motivo "T" de GTF's. Por otro lado el dominio C-terminal de ambas enzimas es idéntico al de LevS (Olvera *et al.* 2007).

3.5.3 Relación de la estructura-función de las FTF's quiméricas

Una característica particular de las FTF's quiméricas de *Leuconostoc sp.* es su alta eficiencia para la síntesis de polímero aún a bajas concentraciones de sustrato (<250mM sacarosa) (Olivares *et al.* 2003; Morales *et al.* 2006; Olvera *et al.* 2007). Esto contrasta con las FTF's hasta entonces descritas que presentan una alta actividad hidrolítica. Estudios realizados con el fin de analizar si los dominios adicionales de las quimeras están relacionados con esta habilidad, llevaron a la construcción de tres versiones truncadas en los dominios N y C-terminal de la inulosacarasa IsIA (Olivares *et al.* 2003; del Moral *et al.* 2008) (figura 10).



Figura 10. Esquema de las versiones truncadas de la inulosacarasa IsIA de *L. citreum* CW28 diseñadas y caracterizadas por Del Moral (2008).

En la versión IsIA2 se eliminó la sección del C-terminal que posee un 80% de identidad con ASR, mientras que en la versión IsIA3 se eliminó la "región de transición" dejando sólo el dominio catalítico con la región N-terminal. En la tercera versión truncada (IsIA4) únicamente se mantuvo el dominio catalítico, tal y como se presenta en las FTF's de bacterias gram negativas. Los ensayos revelaron que todas las formas truncadas retienen la capacidad para producir inulina, lo que demuestra que las regiones eliminadas no influyen en la especificidad (tipo de enlace) ni en la habilidad para sintetizar polímero. Sin embargo, se observó que la capacidad de transferir fructosa al polímero disminuyó, en beneficio de la transferencia al agua, disminuyendo también la afinidad (K_M) hacia el sustrato. Estos cambios se observan al eliminar el dominio C-terminal, pero particularmente cuando se elimina la "región de transición" (IsIA3) (tabla 1), lo que indica que la adquisición del dominio C-

terminal resulta en una mejora en la eficiencia para la síntesis del polímero y que la "región de transición" es clave para dicho cambio.

Tabla 1. Propiedades cinéticas y bioquímicas de la inulosacarasa IsIA de *L. citreum* CW28 y sus versiones truncadas (del Moral et al. 2008)

<i>Version truncada</i>	<i>T optima (°C)</i>	<i>Vida media 35°C (min)</i>	<i>hidrólisis/ transferencia (%)</i>	<i>K_M (mM)</i>	<i>k_{cat} (s⁻¹)</i>	<i>k_{cat}/K_M (mM⁻¹s⁻¹)</i>
IsIA	35	-	40/60	38	25	0.65
IsIA2	35	407	38/62	24	28.19	1.17
IsIA3	30	346	61/39	-	-	-
IsIA4	30	128	70/30	142	105	0.73

Por otra parte, se demostró que el recorte de la enzima por sus extremos N y C-terminal (IsIA4), ocurre en detrimento en la estabilidad a la temperatura (tabla 1), lo que deja claro el efecto que estos dominios tienen en la estabilidad de la proteína. En este sentido, se estudió la influencia de los dominios sobre la estructura de la proteína por medio de ensayos de plegamiento. Tanto la enzima completa como las versiones truncadas fueron sometidas a diferentes concentraciones de EDTA para eliminar el Ca⁺² y favorecer el desplegamiento de la enzima. Se observó que las formas truncadas IsIA3 e IsIA4, se inactivan modificando su estructura terciaria cuando es eliminado el Ca²⁺, contrario a lo que sucede con la enzima completa (IsIA) y la truncada del C-terminal (IsIA2) ya que en ellas no se observa un cambio significativo en la estructura terciaria. Esto señala que los dominios adicionales le confieren rigidez a la estructura de la enzima, generando una mayor estabilidad a pesar de la ausencia de calcio. Posiblemente estos dominios interactúan con la β-propela generando una nueva conformación que favorece un mecanismo de transglicosilación. Los autores proponen que la "región de transición" podría interactuar con el dominio catalítico favoreciendo la formación de una vía larga que dificulta la accesibilidad de la molécula de agua al sitio activo, lo que disminuye la hidrólisis del sustrato y aumenta la transferencia hacia el polímero (del Moral et al. 2008).

Dadas las características estructurales y de alta eficiencia en los otros miembros de la sub-familia de FTF's de *Leuconostoc* sp. (LevS, LevC y LevL), no se descarta una función similar de los dominios adicionales en las FTF's señaladas, aunque no se han realizado estudios para demostrarlo.

3.6 GENERACIÓN DE NUEVAS FUNCIONES POR LA COMBINACIÓN DE DOMINIOS

Según la base de datos "Structural Classification of Proteins" (SCOP), los dominios son unidades evolutivas independientes que pueden por sí mismos tener una función o contribuir a la función de una proteína multidominio. El acoplamiento de dominios se origina durante el proceso de evolución por la inserción, eliminación o intercambio de genes (Vogel *et al.* 2004). Esta combinación proporciona una cadena de funciones que puede actuar ya sea de forma independiente, en conjunto o conferir el marco estructural para la evolución de funciones completamente nuevas. De esta forma, un dominio adicional sirve para expandir, alterar o modular la funcionalidad de una proteína (Bashton y Cothia 2007).

La exploración de este campo ha llevado a diversos grupos de trabajo a utilizar el modelo evolutivo de acoplamiento de dominios para generar proteínas con nuevas y mejores propiedades, a través de la fusión de dominios funcionales. A continuación se mencionan algunos ejemplos.

Las β -glucosidasas, catalizan la hidrólisis de alquil y aril- β -glucósidos así como glicósido que sólo tienen residuos de carbohidrato como la celobiosa (oligosacárido). La región C-terminal de estas enzimas es clave para su actividad. Fueron construidas enzimas quimeras con actividad β -glucosidasa de *Cellvibrio gilvus* a través de la sustitución de segmentos homólogos de la región C-terminal de una β -glucosidasa de *Agrobacterium tumefaciens* termoestable. Gracias a esta quimera, se logró modificar la actividad óptima y aumentar la estabilidad al pH y la temperatura. Así mismo se observó un aumento del 40% en la actividad de la enzima (Singh y Hayashi 1995). De forma similar, fue sustituido un fragmento del C-terminal de una β -glucosidasa de *Thermotoga marítima* altamente termoestable con actividad transglicosilasa por regiones del C-terminal de la β -glucosidasa de *C. gilvus*, las quimeras mejoraron dos veces la capacidad de transglicosilación, lo que permitió a los autores sugerir que los residuos clave en la actividad de transferencia se encontraban en este segmento (Goyal *et al.* 2002).

La fusión de enzimas con actividades simultáneas permite el uso integral de sustratos para ser mejor aprovechados. Un claro ejemplo es la creación de una proteína bi-funcional a partir de la fusión de una β -amilasa (BA) de *Clostridium thermosulfurogenes* con una trealosa sintetasa (TS) de *Thermus thermophilus*. Las proteínas quedaron enlazadas por medio de una región "linker" de 10 aa para

permitir un libre plegamiento. La proteína recombinante cataliza reacciones secuenciales en las que el almidón es hidrolizado para formar maltosa y ésta a su vez es convertida a trealosa (utilizado ampliamente como crioprotector). La estabilidad y la eficiencia catalítica de la quimera resultaron mayores a las obtenidas cuando ambas enzimas se aplicaron conjuntamente. Además lograron minimizar el porcentaje de hidrólisis de maltosa (reacción secundaria de BA) ya que el efecto de proximidad de sustratos por la cercanía de sitios activos permitió la entrada inmediata de la maltosa al sitio activo de la TS. De esta manera, los autores lograron obtener una enzima híbrido con una alta eficiencia para sintetizar trealosa a partir de almidón (Wang 2007).

Es claro que la fusión de dominios es una herramienta útil para mejorar y expandir las propiedades enzimáticas, estabilidad y funcionalidad de una proteína y que esta estrategia puede ser aprovechada para las FTF's. La creación de una FTF altamente estable, con altos rendimientos de producción y con una actividad versátil hacia la síntesis de productos puede llegar a ser concebida por medio de la fusión de dominios. A pesar de que las fructosiltransferasas multidominio del género *Leuconostoc sp.* tienen una alta eficiencia hacia la transferencia al polímero, no son capaces de transferir el residuo fructosilo a otras moléculas aceptoras (Olivares 2002) y poseen una baja estabilidad. Caso contrario, la levansacarasa SacB de *B. subtilis* de un solo dominio, posee una actividad versátil ya que además de sintetizar polímero utiliza a xilosa y maltosa como moléculas aceptoras (Ortiz-Soto 2008) y posee una alta estabilidad. Sin embargo, el rendimiento de la síntesis de sus productos se ve afectado por la alta tasa de hidrólisis del sustrato. De lo anterior resulta interesante combinar las características de la levansacarasa SacB y la alta eficiencia de transfructosilación que el C-terminal de las fructosiltransferasas multidominio pudieran conferirle, con el fin último de producir una enzima altamente eficiente para la transferencia, estable y con la capacidad de transfructosilar diversos aceptores.

Por otro lado, dado que estos dominios poseen homología estructural con las glucosiltransferasas, resulta interesante explorar si es posible modificar la capacidad de transferencia de una FTF unidominio con un C-terminal que comparta identidad con las fructosiltransferasas multidominio. Finalmente las construcciones en las que la fusión se lleve a cabo con el C-terminal de las FTF's multidominio que no ha sido estudiadas (LevS, LevC y LevL) probablemente nos permitiría obtener evidencias sobre su papel funcional.

4. HIPOTESIS

Es posible modificar la actividad y especificidad de una fructosiltransferasa unidominio por medio de la fusión de dominios C-terminal de las FTF's multidominio o GTF's de *Leuconostoc sp.*

5. OBJETIVO

Estudiar el efecto sobre la especificidad y actividad de la levansacarasa SacB de *B. subtilis* al fusionar los dominios C-terminal de FTF's de *Leuconostoc sp.* y sus regiones de transición, así como el C-terminal de una GTF.

5.1 Objetivos particulares

- Construcción de quimeras de SacB, clonación y expresión en *E. coli*.
- Purificación de las quimeras recombinantes.
- Determinar las propiedades bioquímicas y las constantes cinéticas de las quimeras purificadas.
- Determinar la especificidad de reacción (hidrólisis /transferencia) de las quimeras.
- Determinar la capacidad de las quimeras para realizar la transferencia del residuo fructosilo hacia otros aceptores.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas y vectores

Se utilizó como cepa hospedera a *Escherichia coli* TOP 10 con el genotipo: *F mcrA* $\Delta(mrr-hsrRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1* *deoR* *araD139* $\Delta(ara-leu)7697$ *galN* *galK* *rpsL* (*StrR*) *endA1* *nupG* (Invitrogen).

El gen de la levansacarasa *sacB* de *Bacillus subtilis* se encuentra insertado en el vector de expresión pET-22b(+) inducible por IPTG. La cepa *E. coli* BL21 (B F⁻ omp T hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ (DE3) *endA* Hte [argU ileY leuW Cam^r]) fue transformada con el vector.

Los genes de la dextransacarasa DsrP de *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ, la levansacarasa LevC de *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 y la inulosacarasa Isla de *Leuconostoc citreum* CW28 se encuentran insertados en el vector de expresión TOPO/pBad (*araC*). Para la propagación de los vectores se utilizó la cepa TOP10.

6.2 Condiciones y medios de cultivo.

Para aislamiento en medio sólido se utilizó el agar Luria Bertani (tabla 2) a 37°C. La recuperación de las células después de la transformación se llevó a cabo en medio líquido SOC (tabla 3) a una temperatura de 37°C por una hora. Para el crecimiento celular y la expresión de los genes se utilizó el medio YT2X (tabla 4); las células fueron propagadas a 37°C con una agitación de 250rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.5 unidades. Posteriormente se adicionó 0.020% de arabinosa como inductor y las células se incubaron a 19°C con una agitación de 180 rpm durante 4 horas.

Tabla 2. Medio sólido Luria Bertani (LB) para el aislamiento de *E. coli* transformadas.

Reactivo	Concentración (g/L)
<i>Bactotripton</i>	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
Ampicilina*	200 µg/ml
Agar	15

*Antibiótico de acuerdo al gen de resistencia del plásmido insertado para una presión selectiva

Tabla 3. Medio SOC para la recuperación de células *E. coli* después del tratamiento térmico para transformarlas.

Reactivo	Concentración (g/L)
Triptona	20
Extracto de levadura	5
NaCl	0.5
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucosa	20 mM

Tabla 4. Medio YT2X para la producción de enzimas recombinantes en *E. coli* TOP 10.

Reactivo	Concentración (g/L)
Bactotriptona	16
Extracto de levadura	10
NaCl	5
Ampicilina*	200 µg/ml

*Antibiótico de acuerdo al gen de resistencia del plásmido insertado para una presión selectiva

6.3 Preparación de células para ensayos de contacto

Las interacciones y estudios de anclaje a pared celular se llevaron a cabo en las cepas de *L. mesenteroides* IBT-PQ. Las células se propagaron en el medio para *L. mesenteroides* (LM) (tabla 5) a 30° C y un pH de 7 con una agitación de 200 rpm, hasta alcanzar una DO_{600nm} de 7 unidades y/o un pH de 5.0. Para evitar la expresión de glicosiltransferasas se utilizó xilosa como fuente de carbono en la cepa IBT-PQ y glucosa para la cepa CW28.

Tabla 5. Composición del medio de *Leuconostoc mesenteroides* (LM).

Reactivo	Concentración (g/L)
NaCl	0.01
Extracto de levadura	20
K ₂ HPO ₄	20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.02
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.01
Xilosa o Glucosa	20

6.4 CONSTRUCCIÓN DE LAS QUIMERAS

6.4.1 Amplificación y fusión de los genes

6.4.1.1 PCR PRIMARIA.

Mediante la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se amplificaron los fragmentos *sacB*, *c-islA*, *tn-islA*, *c-levC*, *tn-levC* y *c-dsrP*. Como templados se utilizaron los plásmidos mencionados anteriormente y como oligonucleótidos las secuencias enlistadas en la tabla 6. Para la amplificación se utilizó la enzima *Expand High Fidelity* (ROCHE). Los productos de PCR fueron purificados en cada etapa utilizando el kit "High Pure PCR Product Purification" (ROCHE Cat. No. 1 732 668) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y fusión de los genes.

Lugar de alineamiento	Secuencia del oligo	Complementa con	Sitio de restricción
sacB			
Directo	cat gcc atg ggg aag cca tat aag gaa aca tac ggc	---	NcoI: ccatgg
Reverso 1	ata tgt cat ccc ttt gtt aac tgt taa ttg tcc ttg	5' C-DsrP	---
Reverso 2	acc aac taa ttc ttt gtt aac tgt taa ttg tcc ttg	5' C-LevC	---
Reverso 3	atc atc tcc cca ttt gtt aac tgt taa ttg tcc ttg	5' C-IsIA/Tn-IsIA	---
C-IsIA			
Directo	aca gtt aac aaa tgg gga gat gat cac tct ata g	3' sacB	---
Reverso	ccg ctc gag agc ttg cea agc acg ctt atc aat	---	XhoI:ctc gag
Tn-IsIA			
Directo	aca gtt aac aaa tgg gga gat gat cac tct ata g	3' sacB	---
Reverso	ccg ctc gag agc att taa atc gcg tga aaa gct	---	XhoI:ctc gag
C-LevC			
Directo	aca gtt aac aaa gaa tta gtt ggt aca aaa gct act	3' sacB	---
Reverso	tcc atc gag ctc acg taa gta ata tgt gcc atc a	---	XhoI:ctc gag
Tn-LevC			
Directo	aca gtt aac aaa gaa tta gtt ggt aca aaa gct act	3' sacB	---
Reverso	ccg ctc gag atc cgt tac atc ttg taa gta acc	---	Xho I:ctc gag
C-DsrP			
Directo	aca gtt aac aaa ggg atg aca tat tat tct aca agt	3' sacB	---
Reverso	ccg ctc gag gct ttt aat cag ctc tcc aga att	---	Xho I:ctc gag

Las reacciones se llevaron a cabo con 100µM de dNTP's, 20pM de cada uno de los oligonucleótidos y 0.75mM de Mg²⁺. Para evaluar las mejores condiciones de temperatura de alineamiento de los oligonucleotidos, se realizó una PCR bajo gradientes de temperatura de 54, 56, 58, 60, 62 y 64°C. Las reacciones se

realizaron en un termociclador Touchgene Gradient (TECHNE). Las condiciones de la reacción de PCR se especifican en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de los ciclos en la reacción de PCR para la amplificación de los genes a fusionar.

CONDICIONES DE LOS CICLOS DE AMPLIFICACIÓN			
ETAPA	No. DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización	1	95°C	5 min
Desnaturalización (apertura)	35	95°C	45 seg
alineamiento		58°C	45 seg
extensión		72°C	Δ
extensión final	1	72°C	10min

Δ: Tiempo dependiente del tamaño del fragmento a amplificar.

6.4.1.2 PCR SECUNDARIA.

Para lograr las fusiones: *sacb-c-ista sacb-tr-ista sacb-c-levc*, *sacb-tr-levc* y *sacb-c-dsrp*, los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de cada fragmento (PCR primaria) contienen en un extremo la secuencia complementaria al fragmento con el que se van a fusionar. Los productos de la PCR primaria actúan como mega oligonucleótidos de secuencias complementarias entre sí. Estos productos purificados se utilizaron como templados en una PCR secundaria para fusionar las cadenas durante la etapa de alineamiento (figura 11).

Las mejores condiciones de fusión se determinaron por medio de un gradiente escalonado de temperatura de alineamiento, una buena fusión es lograda utilizando una relación equimolar de los fragmentos a fusionar. Se utilizó la polimerasa Expand y no se utilizaron oligonucleótidos extras para la reacción. Las condiciones de reacción se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de los ciclos en la reacción de PCR para la amplificación de los genes a fusionar.

CONDICIONES DE LOS CICLOS DE AMPLIFICACIÓN			
ETAPA	No. DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización	1	95°C	5 min
Desnaturalización (apertura)	25	95°C	45 seg
alineamiento		58°C	45 seg
extensión		72°C	Δ
extensión final	1	72°C	5min

Δ: Tiempo dependiente del tamaño del fragmento a amplificar.

6.4.1.3 PCR DE REAMPLIFICACIÓN

Con el fin de asegurar una amplificación completa de las quimeras, se realizó una tercera reacción con los productos de fusión purificados y utilizando los oligonucleótidos de los extremos 5' y 3' de cada construcción. Las condiciones utilizadas fueron las mismas que en la PCR primaria.

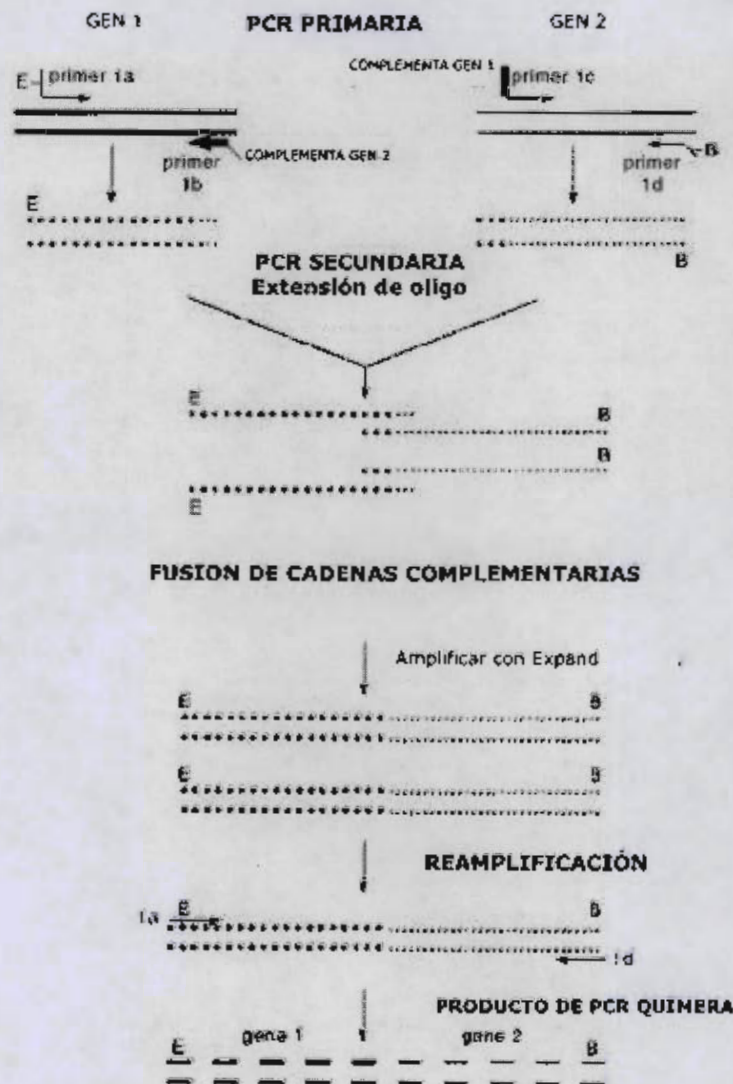


Figura 11. Esquema de la estrategia para la fusión de los genes. Adaptado de Current Protocols in Molecular Biology.

6.5 CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

6.5.1 Vector de expresión

Los genes fusionados se insertaron en el vector pBAD /TOPO^R Thio Fusion Expression kit (Invitrogen). Este vector presenta un gen de resistencia a ampicilina útil para la selección de colonias positivas y un promotor de arabinosa que promueve la transcripción del gen clonado. Así mismo al ser transcrito el inserto, se fusiona una etiqueta de 6 histidinas en el extremo 3' lo que facilita su purificación por columnas de afinidad.

6.5.2 Transformación

La cepa *E. coli* TOP 10 electrocompetente fue transformada por electroporación y recuperada en medio líquido SOC a 37°C y 250rpm durante 1 hora.

Para la selección de transformantes positivas se aislaron colonias en placas de agar LB / ampicilina a 37°C después de 12 horas de incubación.

6.5.3 Secuenciación del inserto

Las secuenciación de insertos se realizó en un secuenciador automático Applied Biosystem 3100 en la Unidad de Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias fueron analizadas por BLAST de la página de la "National Center For Biotechnology Information" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast>).

6.6 EXPRESION HETERÓLOGA DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

6.6.1 Expresión

La expresión de las proteínas se llevó a cabo en un litro de caldo YT2X suplementado con ampicilina (200 µg/ml) utilizando una concentración de arabinosa de 0.02%. Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron con amortiguador de fosfatos 50mM de pH 6.0. Las proteínas recombinantes se obtuvieron por medio de prensado celular (*French press*) en un volumen de 10mL.

6.6.2 Cuantificación de proteína

La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford utilizando el kit Bio-Rad "protein assay" CA 94547 y el método de Lowry (Bradford MM 1976). Se utilizó como patrón albúmina sérica bovina (fracción V, SIGMA).

6.6.3 Análisis de las proteínas recombinantes

Las proteínas presentes tanto en la fracción soluble como insoluble del cultivo celular fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando una cámara Mighty small II con 15 mA para la migración.

Como gel concentrador se utilizó acrilamida al 4% con pH 6.4 y como gel separador acrilamida al 10% con pH 8.8.

6.6.4 Tinción con azul de Coomassie para visualización de proteína

Solución tñidora (ácido acético 10%, metanol 30% y azul de Coomassie al 0.2%).....	30 minutos
Solución desteñidora I (metanol al 50%, ácido acético al 10%)	20min (x2)
Solución desteñidora II (metanol al 5%, ácido acético al 1%)	indefinido

6.6.4.1 Geles de Actividad *in situ*.

Después de la migración de las proteínas por electroforesis se dió a los geles un tratamiento de 3 lavados de 20 minutos con una solución amortiguadora Tween (amortiguador de fosfatos 50mMm pH 6.5 + Tween 80 al 2% + CaCl₂ 1mM) que actúa lavando el SDS y permitiendo así que la proteína se renaturalice adquiriendo su conformación activa. Posteriormente los geles se incubaron con sacarosa al 10%. El tiempo de incubación se estableció hasta la visualización de polímero.

6.7 ANALISIS DE LA FUNCIÓN DE LOS C-TERMINAL

6.7.1 Ensayos de anclaje a células

Para demostrar que el C-terminal de DsrP y el C-terminal de IsIA tienen y conservan la función de unirse a células, se realizaron ensayos de contacto con las células de *L. mesenteroides* IBT-PQ con la quimera SacB-C-DsrP y con las células de *L. citreum* CW28 con las quimeras SacB-Tn-IsIA y SacB-C-IsIA.

Las células fueron obtenidas a partir de cultivos de 500mL en medio LM, con xilosa o glucosa como fuente de carbono, para evitar que la sacarosa induzca la producción de glicosiltransferasas que interfieran con el análisis. Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron 3 veces con 3 volúmenes de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6. El contacto se llevó a cabo utilizando el extracto de las quimeras obtenido por prensado y SacB como control.

En un 1mL de solución amortiguadora de fosfatos 50mM pH 6 se pusieron en contacto los extractos de las quimeras con las células IBT-PQ o CW28. Se utilizó una relación de proteína 1:1 (2.5mg/2.5mg) para el caso de los contactos con IBT-PQ y en el caso de las células CW28 se utilizó una relación 1:2 (5mg/7.5mg). La mezcla se incubó por 12 horas a 20°C. Posteriormente se centrifugó a 12000rpm 3 minutos y la pastilla celular se lavó vigorosamente 6 veces con 5 volúmenes de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6.

Con el fin de comparar la fuerza iónica necesaria para despegar la quimera SacB-C-DsrP y la levansacarasa SacB de las células IBT-PQ se realizó un análisis con un gradiente escalonado de NaCl. Después del contacto con los extractos de cada enzima, se tomaron muestras para lavarlas con diferentes concentraciones de NaCl (0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 M). Los lavados se realizaron por agitación durante 10 minutos. Las células fueron centrifugadas y se recuperó el sobrenadante. Por último, las células se lavaron 3 veces con una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6.

6.7.2 Purificación de las quimeras a partir de cuerpos inclusión

Después de la expresión heteróloga y el rompimiento celular, La fracción insoluble fue obtenida y lavada 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos 50mM. La purificación de las quimeras a partir de los cuerpos de inclusión se llevó a cabo utilizando el kit de purificación "BugBuster" Protein Extraction Reagent™ (Novagen 70584-4) y siguiendo las instrucciones del proveedor. Los cuerpos de inclusión fueron recuperados en solución amortiguadora de fosfatos 50mM. Una vez purificados los cuerpos de inclusión fueron resuspendidos suavemente en 10 volúmenes de una solución de Cloruro de Guanidina 6M (GdnHCl) a pH 6.5. Posteriormente las muestras fueron dializadas subsecuentemente en GdnHCl 3M y 2M. Los últimos dos pases fueron dializados en GdnHCl 1 y 0.5M suplementado con arginina 200mM y CaCl₂1mM. La diálisis se realizó a 4°C con agitación y con 5 volúmenes de solución dializante. La muestra final fue centrifugada a 10,000rpm.

6.7.3 Programas de reconocimiento de familia y estructura terciarias

En el análisis bioinformático y estructural de las FTF's y quimeras se emplearon los siguientes programas:

<http://pfam.janelia.org/>

<http://www.expasy.ch/tools/>

HHpred: <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>.

3D-PSSM: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/>

6.8 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD

6.8.1 Determinaciones cinéticas

Con el objetivo de evaluar las propiedades cinéticas de las quimeras expresadas y la levansacarasa SacB nativa, se realizaron reacciones a 37°C con diferentes concentraciones de sacarosa en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6 y 1 mM de CaCl₂. Las velocidades iniciales de reacción se midieron mediante la liberación de azúcares reductores y por la medición en HPLC de fructosa, glucosa y sacarosa residual. La concentración de glucosa libre es resultado de la actividad total, y es una medida del consumo de sacarosa. La concentración de fructosa libre corresponde

a la reacción de hidrólisis, por lo que la diferencia entre las concentraciones de glucosa y fructosa indican la concentración de fructosa que es transferida al polímero, lo que nos da la reacción de transferencia en cualquier momento de la reacción, en resumen:

$$[\text{GLUCOSA}] = [\text{SACAROSA CONSUMIDA}] \alpha \text{ ACTIVIDAD TOTAL}$$

$$[\text{FRUCTOSA}] = [\text{SACAROSA HIDROLIZADA}] \alpha \text{ HIDRÓLISIS}$$

$$[\text{GLUCOSA} - \text{FRUCTOSA}] = [\text{FRUCTOSA TRANSFERIDA}] \alpha \text{ TRANSFERENCIA}$$

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

6.8.2 Determinación de la relación hidrólisis/ transferencia

Se analizó la especificidad enzimática hacia la hidrólisis y transferencia del sustrato por medio de ensayos en los que se utilizaron diferentes concentraciones de sacarosa (12, 5, 2.5, 1, 0.8, 0.7, 0.5 y 0.3%) a 37°C en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 6 y 0.5 U/mL. Las mediciones se llevaron a cabo en la etapa de velocidad inicial y cuando el 100% de sacarosa fue consumida. En el ensayo se utilizó a SacB como control.

Para la determinación, se midieron las concentraciones de fructosa y glucosa en el medio de reacción. Para valores de glucosa y fructosa libres medidos en un determinado tiempo podemos concluir que:

$$\text{Actividad Total} = \text{Glucosa libre/t}$$

$$\% \text{ Transferencia} = (\text{GLU-FRU})/\text{GLU} * 100$$

$$\% \text{ Hidrólisis} = 100 - \% \text{ Transferencia}$$

6.8.3 Estudios de las reacciones de aceptor

Para evaluar la capacidad de la enzima para transferir el residuo fructosilo hacia aceptores se utilizó a la xilosa y maltosa como molécula modelo. Las reacciones se realizaron en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 6.0 con 120 g/L de sacarosa y 120 g/L de xilosa o maltosa a 37°C con 0.5 U/mL durante 21 horas.

6.8.4 Determinación de la actividad enzimática por azúcares reductores

El ensayo de la actividad global de las levansacarosas quiméricas se realizó midiendo la velocidad de consumo de sacarosa, por medio de los azúcares reductores liberados. Una unidad de actividad es igual a una μmol de equivalentes de glucosa liberados en un minuto. La reacción se realizó en presencia de sacarosa al 12% a 37°C en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 6. El poder reductor se determinó por el método del ácido 3,5- dinitrosalisílico (DNS).

6.8.5 Determinación de la actividad enzimática por HPLC

La cuantificación de los productos de reacción fructosa y glucosa libre y sacarosa residual fue llevada a cabo en un equipo de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) de Waters con un detector de IR 410 (*Differential refractometer*). Se utilizó una columna aminada para determinación de carbohidratos (4.6 x 250mm) a 35°C . Como fase móvil se utilizó acetonitrilo:agua en relación 80:20.

6.8.6 Ensayos de estabilidad a la temperatura

El estudio de la estabilidad a la temperatura se llevó a cabo en presencia de 120 g/L de sacarosa en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM y CaCl_2 1 mM a una temperatura de 50°C . Para la reacción se utilizaron los extractos de SacB y sus quimeras. Los ensayos se realizaron con 10 unidades totales de actividad para cada extracto y ajustando a un volumen final de 250 μL con extracto de un cultivo de *E.coli* libre de expresión. Se midió la actividad residual a diferentes intervalos de tiempo.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Diseño de las quimeras

Con el fin de determinar si es posible modificar la eficiencia de transfructosilación de la levansacarasa SacB de *B. subtilis*, fueron diseñadas diversas quimeras con los dominios C-terminal de FTF's de *Leuconostoc sp.* Se construyó también una quimera con el C-terminal de DsrP, una GTF con alto grado de identidad y homología con el C-terminal de las FTF's de *Leuconostoc sp.* En la figura 12 se esquematizan las cinco quimeras construidas para este trabajo.

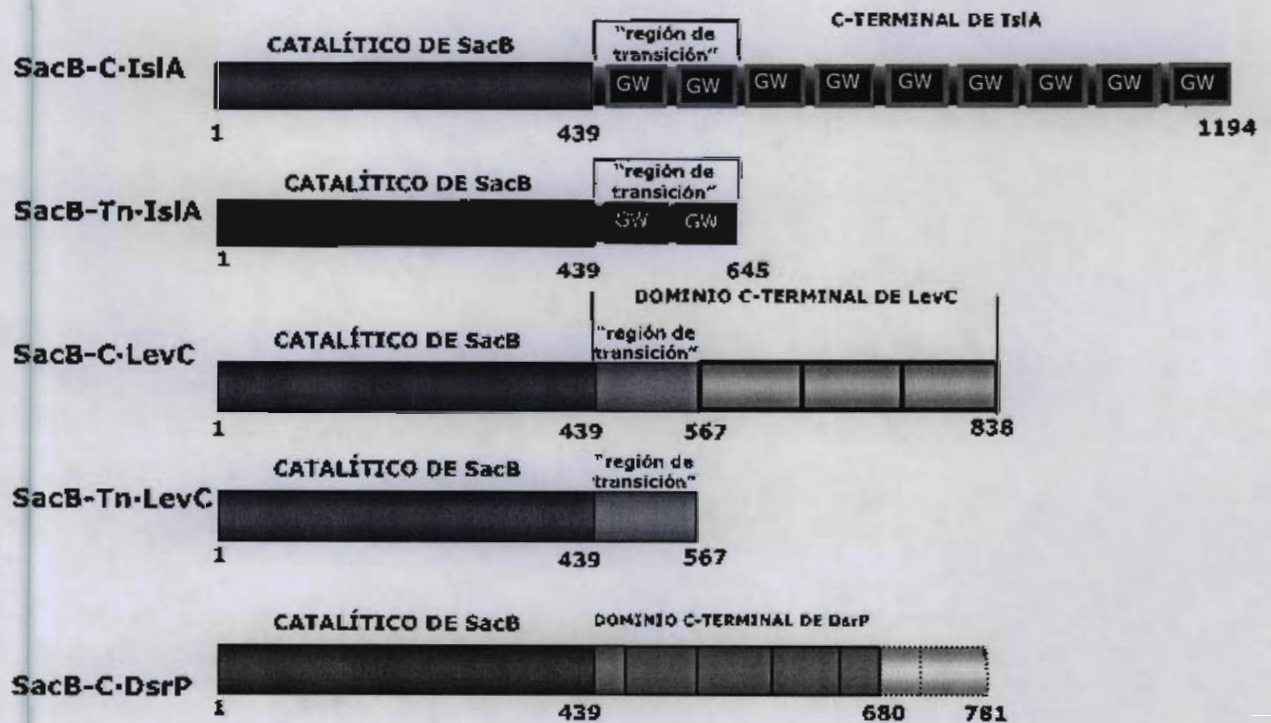


Figura 12. Esquema de las quimeras generadas a partir del dominio catalítico de la levansacarasa SacB y la fusión de los C-terminal de las FTF's de *Leuconostoc sp.* y el C-terminal de DsrP, una GTF.

7.1.1 Quimeras SacB-C-IsIA y SacB-Tn-IsIA

Nos propusimos fusionar el C-terminal de la inulosacarasa IsIA, la primera FTF multidominio aislada y modelo de estudio para definir el papel que juegan los dominios adicionales en la función de la proteína. Los ensayos realizados con versiones truncadas de la enzima IsIA indican que el dominio C-terminal está involucrado, entre otras funciones, en la eficiencia de la transfructosilación, específicamente su "región de transición" (del Moral *et al.* 2008). Por tal razón se decidió construir dos quimeras utilizando la "región de transición" (SacB-TnIsIA) y el C-terminal completo de IsIA (SacB-C-IsIA) (figura 12).

Con el fin de conocer el plegamiento del dominio C-terminal y su región de transición una vez fusionados a SacB, nos dimos a la tarea de buscar estructuras homólogas con diversos programas. El dominio C-terminal de IsIA es homólogo a los módulos GW de unión a ácidos lipoteicóicos de la internalina InIB y amidasa Ami de *Listeria monocytogenes* (Jonquières *et al.* 1999); la estructura de estos módulos asemejan un barril abierto de 5 hojas beta. Un alineamiento clustal W indica que el C-terminal completo de IsIA posee 9 módulos GW (figura 12), equivalente a Ami que tiene 8 (Braun *et al.* 1997). Los dos primeros módulos GW de IsIA corresponden a la "región de transición" definida por Olivares (2003), aunque el primer GW no está bien definido. Los 7 motivos GW restantes son equivalentes al C-terminal de la alternansacarasa ASR, la GTF que comparte un 80% de identidad en este dominio con IsIA. Según la estructura cristalográfica de la internalina InIB cada módulo se pliega de forma independiente (Marino M. *et al.* 2002), lo que sugiere que la fusión del dominio catalítico de SacB al dominio C-terminal de IsIA y su "región de transición" no afectará el plegamiento de las proteínas una vez fusionadas. De hecho el dominio C-terminal de IsIA ha sido expresado de forma independiente y conserva su funcionalidad y plegamiento (del Moral *et al.* 2008).

7.1.2 Quimeras SacB-C-LevC y SacB-Tn-LevC

Otro dominio seleccionado, fue el C-terminal de las levansacararas de *L. mesenteroides* (LevS, LevC y LevL), ya que se propone posee una influencia sobre la transfructosilación similar al del C-terminal de IsIA. Por tal motivo se construyeron dos quimeras más, fusionando el dominio catalítico de SacB con la "región de transición" de LevC (SacB-TnLevC) y el C-terminal completo (SacB-C-LevC) (figura 12).

El análisis con BLAST revela que la región de transición de las levansacararas multidominio LevS, LevC y LevL de *L. mesenteroides* posee en promedio 126aa que en LevC abarca del aminoácido 633 al 759. Su dominio C-terminal comparte del 30% de identidad con dominios C-terminal de GTF's (Morales *et al.* 2007, Olvera *et al.* 2007). Fue posible definir además, que tienen 83% de identidad con el dominio CW de la lisozima M1 (1,4-beta-N-acetylmuramidase) de *L. mesenteroides ssp mesenteroides* ATCC 8293.

El motivo CW (ngWikdn.gnWYYfdsdGkm) contiene residuos aromáticos conservados y glicinas (mayúsculas) distribuidos de forma repetitiva en tándem que son encontradas en proteínas asociadas a células como las toxinas de *Clostridium* y *Streptococcus sp* (<http://pfam.janelia.org/family?entry=PF01473>). El análisis de reconocimiento de familias (<http://pfam.janelia.org/>) indica que el C-terminal de las levansacararas multidominio contiene al menos 8 motivos CW a lo largo de su secuencia y se observó que la región de transición contiene dos. Al igual que los módulos GW, cada módulo CW se pliega de forma independiente (Fernández Torneo *et al.* 2001). Es posible que en este caso, la fusión tampoco altere el plegamiento de las proteínas independientes.

7.1.3 Quimeras SacB-DsrP

Finalmente, el parecido estructural del dominio C-terminal de las FTF's de *Leuconostoc sp* con dominios C-terminal de otras GTF's hace suponer que la fusión de un dominio de GTF podría también llegar a influir en la especificidad de reacción de SacB. Para estudiar este efecto, se eligió el dominio C-terminal de la dextransacarasa DsrP de la cepa *L. mesenteroides* IBT-PQ. Este dominio en particular comparte cerca de un 35% de identidad en secuencia con los dominios C-terminal de las levansacarasa multidominio de *L. mesenteroides* (LevS, LevC y LevL) y estas a su vez comparten una identidad similar con otros C-terminal de GTF's del género *Leuconostoc* y *Streptococcus* (Morales-Arrieta *et al.* 2006). Estos antecedentes, así como la disponibilidad de la cepa en el grupo de trabajo llevó a elegir este dominio para fusionarlo a la levansacarasa SacB de *B. subtilis* (SacB-C-DsrP) (figura 12). Por otro lado, el análisis estructural hecho por Olvera en 2007, revela que la región C-terminal de DsrP es un dominio constituido por 5 motivos CW involucrados en el anclaje de la enzima DsrP a la pared celular de *L. mesenteroides* IBT-PQ, posiblemente por la interacción con los ácidos teicoicos. Los 5 motivos forman una estructura "solenoid" capaz de mantener su funcionalidad cuando es expresado de forma independiente, lo que sugiere que la fusión con SacB puede realizarse de manera que no afectará el plegamiento de los dominios independientes.

Otro aspecto tomado en cuenta para todas las construcciones es que en un sistema de proteínas multidominio es requerida una región entre dominios (región de "linker") para permitir el plegamiento independiente de las proteínas, sobre todo si se trata de proteínas con dominios aledaños a sitios activos (Han *et al.* 2007). Por esta razón se dejó la secuencia "linker" original de cada dominio C-terminal, la cual fue definida por la delimitación de dominios.

7.2 Construcción, clonación y expresión de las quimeras de SacB

Con el objetivo de construir las cinco quimeras diseñadas, se utilizó la técnica de fusión por megaprimer para unir el gen correspondiente al dominio catalítico de *sacB* con los diferentes C-terminales y las regiones de transición seleccionadas. En la tabla 9 se muestran los nombres y características moleculares de las quimeras construidas: SacB-C-IslA; SacB-Tn-IslA; SacB-C-LevC; SacB-Tn-LevC y SacB-C-DsrP. Sus secuencias y tamaño corresponden a los genes esperados. Todas las construcciones se clonaron en el vector TOPO pBad/Thio.

Las cinco quimeras fueron expresadas en *E. coli* TOP 10 utilizando arabinosa como inductor. Una vez obtenido el extracto enzimático se observó el perfil de expresión proteica tanto en la fracción soluble como insoluble. Las proteínas fueron identificadas mediante geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y geles de actividad *in situ* (figura 13). Las quimeras recombinantes resultaron activas y capaces de sintetizar polímero, lo que cumple con las expectativas del proyecto y concuerda con los reportes previos en el sentido de que los dominios extras no afectan la capacidad del dominio catalítico para producir polímero (Olivares *et al.* 2003; del Moral *et al.* 2008).

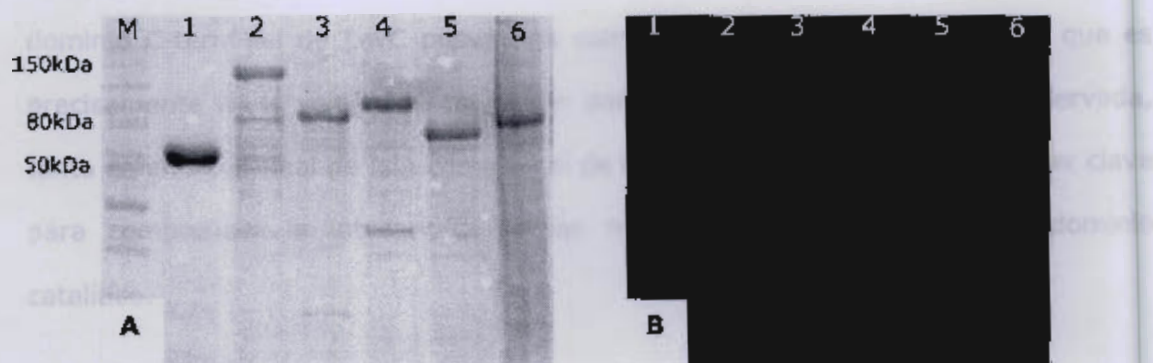


Figura 13. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie (A) y zimogramas de actividad *in situ* (B) de 1) SacB (50kDa) 2) SacB-C-IslA (150kDa). 3) SacB-Tn-IslA (80kDa). 4) SacB-C-LevC (100kDa). 5) SacB-Tn-LevC (65kDa) y 6) SacB-C-DsrP (85kDa)

Los niveles de actividad producida se reportan en la tabla 9. Se observó que todas las quimeras recombinantes tuvieron el peso molecular esperado, excepto la construcción de SacB con el dominio C-terminal de GTF (SacB-C-DsrP), ya que resultó en una quimera truncada en el extremo carboxilo-terminal que posee 3 ½ módulos CW de los 5 que contiene el C-terminal completo de DsrP (figura 12).

Tabla 9. Tamaño, peso molecular y actividad de la fracción soluble de SacB y de sus quimeras construidas.

PROTEÍNA	TAMAÑO (pb)	TAMAÑO (aa)	PESO MOLECULAR (kDa)	ACTIVIDAD FCC. SOLUBLE (U/mL)	ACTIVIDAD FCC. SOLUBLE (U/mg _{protein})
<i>SacB</i>	1317	439	50	800 ± 100	24.24
<i>SacB-C-IsiA</i>	3582	1194	150	50 ± 10	2.5
<i>SacB-Tn-IsiA</i>	1935	645	80	175 ± 20	9.56
<i>SacB-C-LevC</i>	2514	838	100	150 ± 50	8.55
<i>SacB-Tn-LevC</i>	1701	567	65	200 ± 50	10.67
<i>SacB-C-DsrP</i>	2040	680	85	55 ± 10	2.84

Para demostrar que el C-terminal de DsrP es funcional, se demostró que a pesar de estar truncado confiere a la quimera la funcionalidad de adherirse a la pared celular de células de *Leuconostoc* IBT-PQ por medio de interacciones no iónicas (ver anexo), esto indica que conserva su funcionalidad y por lo mismo, mantiene su plegamiento. De hecho, se sabe que cada motivo CW se pliega de forma independiente (Fernández-Torneo *et al.* 2001). Derivado de estos ensayos, resulta interesante investigar el tamaño mínimo necesario de los dominios CW de DsrP para un anclaje eficiente a la pared celular, ya que podría construirse un nuevo dominio de unión a carbohidratos.

Por otro lado, fue posible observar una gran cantidad de proteína en forma de cuerpos de inclusión, sobre todo en las construcciones en las que la fusión se hizo con los C-terminal completos. Al parecer, la fusión de los C-terminales influye sobre este fenómeno ya que SacB es una enzima altamente soluble. Es probable que la gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos que poseen los dominios C-terminal de IsIA, LevC y DsrP favorezcan la insolubilidad de las quimeras durante la síntesis y las dirijan hacia la formación de cuerpos de inclusión. Así mismo, mediante geles de actividad *"in situ"* se observó un perfil proteolítico en todas construcciones sobre todo en las quimeras de SacB con el C-terminal completo de IsIA y GTF (figura 13B-2 y 6), a pesar de utilizar inhibidores de proteasas. Dado que SacB no es susceptible a proteólisis (figura 13B-1) es posible que a partir de los dominios fusionados se estén generando formas proteolizadas de las quimeras ya que se sabe que las regiones entre motivos GW son susceptibles a proteasas (Marino M. *et. al.* 2002). Por otro lado, se han reportado fenómenos de proteólisis en IsIA, LevC y DsrP, aunque no se ha determinado si el evento es autoproteolítico o un proceso exógeno. También se ha especulado sobre la presencia de sitios específicos de corte presentes en las dextransacarasas (Meilado 2006).

7.3 Determinación de la termoestabilidad

Con el propósito de evaluar el efecto de la fusión de los dominios C-terminal y sus regiones de transición en la estabilidad de la levansacarasa SacB, se realizaron análisis de termoestabilidad a 50°C utilizando las proteínas en extracto y tomando como control a SacB. Los valores obtenidos del tiempo de vida media de SacB y para cada quimera se muestran en la tabla 10. Fue posible observar que SacB posee un tiempo de vida media de 72.6 minutos y que las quimeras SacB-Tn-IslA y SacB-Tn-LevC mantienen una termoestabilidad similar a SacB, por lo que se concluye que la fusión de estos fragmentos no afectó la estabilidad de SacB. Por otro lado, la fusión del dominio C-terminal de IslA genera una quimera con un tiempo de vida media 10 minutos mayor que SacB, aunque las fusiones del C-terminal de LevC y de DsrP lo disminuyen 10 minutos. Estos datos indican que la fusión de las regiones de transición no tiene influencia sobre la estabilidad de SacB, mientras que los dominios C-terminal completos de IslA y LevC modifican la estabilidad en un $\pm 14\%$.

Tabla 10. Tiempo de vida media de SacB y sus quimeras.

ENZIMA	$t_{1/2}$ 50°C (min)
SacB	72.6 \pm 3.53
SacB-C-IslA	80.9 \pm 1.42
SacB-Tn-IslA	71.2 \pm 5.56
SacB-C-LevC	63.5 \pm 3.33
SacB-Tn-LevC	73.2 \pm 2.73
SacB-C-DsrP	62.5 \pm 2.00

Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado por del Moral en 2008, ya que propone que, ni el dominio C-terminal, ni su región de transición otorgan estabilidad térmica al dominio catalítico de IslA, para que esto ocurra debe existir un sinergismo

entre la región de transición y el dominio N-terminal que flanquean al dominio catalítico de IsIA, la falta de este efecto disminuye 85% la estabilidad de la enzima. Además, la fusión de dominios no siempre promueve la estabilidad de SacB, ya que se ha visto que la incorporación de dos motivos SLH (motivos de unión a pared celular de gram positivas), confieren a SacB la capacidad de anclarse a pared celular, pero no ofrecen un cambio en su estabilidad (Mesnage *et al.* 1999). Por otro lado, el hecho de que no se pierda la estabilidad es importante ya que al generar proteínas quimeras se corre el riesgo de originar proteínas poco estables e incluso con pérdida en su capacidad de plegamiento (Goyal *et al.* 2002).

7.4 Efecto de los dominios sobre la eficiencia de la reacción de transferencia

Los antecedentes de este trabajo revelan que los dominios C-terminal de las FTF's multidominio de *Leuconostoc sp.* y más específicamente su región de transición, confieren una mayor especificidad para la síntesis de polímero que la observada en FTF's unidominio (del Moral *et al.* 2008). Con el objetivo de observar los cambios en la especificidad que los dominios C-terminal y sus regiones de transición puedan conferirle a la levansacarasa SacB, se llevaron a cabo ensayos para determinar los niveles de hidrólisis y transferencia en la reacción con sacarosa de las quimeras SacB-C-IslA, SacB-Tn-IslA, SacB-C-LevC, SacB-Tn-LevC y SacB-C-DsrP. Las mediciones se llevaron a cabo a pH 6 y 37°C, que son los parámetros óptimos de SacB, utilizando sacarosa como único sustrato aceptor y donador (síntesis de polímero)

Primeramente, fue determinada la máxima tasa de transferencia a altas concentraciones de sacarosa, con el propósito de definir el efecto de cada fusión y eventualmente definir aquellas que justificaran una caracterización más fina. Los datos indican que tal y como reporta Ortíz-Soto (2008), la levansacarasa SacB transfiere un máximo del 55% del sustrato al polímero (figura 14). Las quimeras de SacB con el C-terminal completo de IslA (SacB-C-IslA) y su región de transición (SacB-Tn-IslA) alcanzan una tasa de transferencia del 85 y 76% respectivamente, mientras que las quimeras con el C-terminal completo de LevC (SacB-C-LevC) y su región de transición (SacB-Tn-LevC) logran casi un 90% de transferencia (figura 14), en todos los casos en detrimento de la hidrólisis del sustrato.

Así mismo, es posible notar que no existe una marcada diferencia entre la eficiencia de transfructosilación alcanzada con la fusión de los C-terminal de IslA y LevC y sus regiones de transición. Esto concuerda con lo reportado en las versiones truncadas

de IsIA, ya que se demuestra que la presencia de la región de transición es clave en la eficiencia de la enzima para realizar la reacción de transferencia (del Moral et al. 2008). Es posible concluir que los dos dominios GW que conforman la región de transición de IsIA son suficientes para mejorar cuantitativamente la eficiencia de transferencia con respecto a SacB, aunque sigue habiendo una influencia, aunque menor, de los 7 dominios GW restantes. Por otro lado, aunque no se tengan antecedentes del papel funcional de las regiones adicionales de las levansacarosas multidominio de *L. mesenteroides*, con estos resultados se puede sugerir que su región de transición sería suficiente para aumentar la tasa de transferencia.

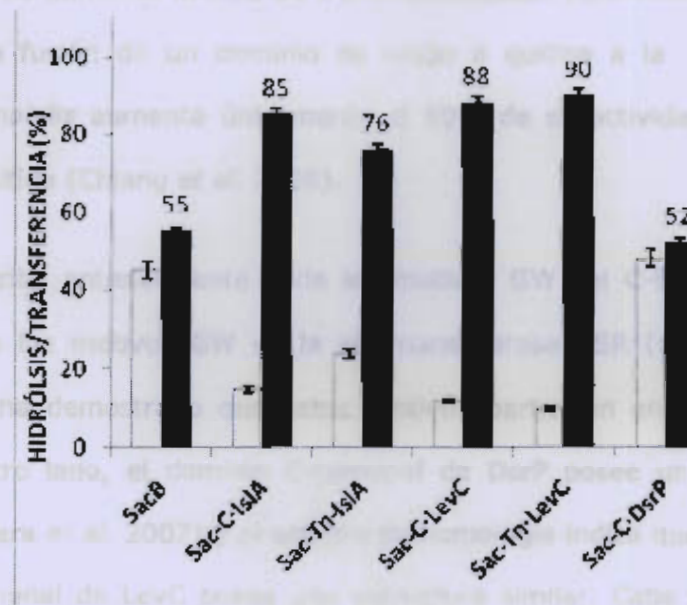


Figura 14. Relación hidrólisis/transferencia en la reacción de SacB y sus quimeras con sacarosa. Se muestra el porcentaje de conversión de sacarosa referente al porcentaje transferido (color oscuro) y el porcentaje de sustrato hidrolizado (color claro). 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5u/mL y ~100% de conversión.

Se analizó también la tasa de transferencia de la quimera que posee el dominio C-terminal de GTF (SacB-C-DsrP), para estudiar si a pesar de ubicarse dentro de otra familia de enzimas el parecido estructural le daría alguna funcionalidad sobre la actividad transferasa. Como se puede observar en la figura 14, a pesar de la

homología que guarda con el C-terminal de las FTF's multidominio, la quimera SacB-C-DsrP mantiene una tasa de transferencia similar a SacB (52%), lo que indica que la fusión no es capaz de inducir un cambio en la especificidad de la enzima. Estos datos sugieren, que dicha estructura no está relacionada con la influencia sobre la actividad transferasa, y que no podría generalizarse el que la fusión de cualquier C-terminal u otro dominio ejerza una influencia similar sobre la eficiencia de la transferencia como las regiones de transición estudiadas en este trabajo. De hecho, se ha reportado la fusión de un dominio C-terminal parecido al de la levansacarasa de *S. mutans* con el dominio catalítico de SacB, y su caracterización indica que cambia el tamaño del polímero pero no aumenta la tasa de transfructosilación (Chambert *et al.* 1992). De igual forma la fusión de un dominio de unión a quitina a la levansacarasa de *Zymomonas mobilis* aumenta únicamente el 10% de su actividad transferasa una vez unido a quitina (Chiang *et al.* 2008).

Como se describe anteriormente 7 de los motivos GW del C-terminal de Isla son equivalentes a los motivos GW de la alternansacarasa ASR (una GTF asociada a células) y se ha demostrado que estos motivos participan en el anclaje a pared celular. Por otro lado, el dominio C-terminal de DsrP posee un plegamiento tipo solenoide (Olvera *et al.* 2007) y el análisis de homología indica que es posible que el dominio C-terminal de LevC posea una estructura similar. Cabe mencionar que es precisamente en la región de transición donde la identidad no es tan conservada, tanto en el C-terminal de Isla como en el de LevC. Estas diferencias pueden ser clave para comprender la interacción de las regiones de transición con el dominio catalítico.

7.5 Estudio del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad transferasa.

Dados los resultados obtenidos se descartó la quimera SacB-C-DsrP y caracterizamos a las quimeras SacB-C-IsIA, SacB-Tn-IsIA, SacB-C-LevC y SacB-Tn-LevC. Se realizaron ensayos para evaluar su capacidad de transfructosilación utilizando diferentes concentraciones de sacarosa ya que se sabe que la actividad transferasa depende de la concentración de sustrato. Los ensayos se realizaron a pH 6 y 37°C, que son los parámetros óptimos de SacB, nuevamente utilizando sacarosa como único sustrato donador y acceptor (síntesis de polímero)

En la figura 15 se muestra el perfil de conversión de sustrato de SacB y de las quimeras seleccionadas. Como se esperaba, la actividad transferasa tanto de SacB como de las variantes construidas, es favorecida al aumentar la concentración de sacarosa, mientras que la actividad de hidrólisis ocurre predominantemente a bajas concentraciones de sustrato. Sin embargo, todas las quimeras mantienen una alta tasa de transfructosilación (60-70%) aún con concentraciones de sustrato tan bajas como 20 mM, lo que difiere de SacB, que a la misma condición hidroliza el 80% de sustrato. De hecho, se ha reportado que la levansacarasa SacB es preferentemente hidrolítica a concentraciones de sustrato menores de 200 mM (Dedonder 1966; Meng and Fülterer 2008). Existen reportes de FTF's con una eficiencia de hasta 95% de transferencia al polímero, como es el caso de las FTF's de *Lactobacillus reuteri* y *L. johnsonii*. Tales rendimientos son alcanzados a 800 mM de sacarosa y se convierten en hidrolíticas a ~85 mM de sustrato (Ozimek et al. 2006; Anwar et al. 2008). En el caso de las quimeras generadas en este trabajo, no se requiere la utilización de altas concentraciones de sacarosa para el óptimo aprovechamiento del sustrato.

Así mismo, se observa nuevamente que el perfil de transferencia es el mismo tanto para las quimeras que poseen únicamente la región de transición (SacB-Tn-IsIA y

SacB-Tn·LevC) como para las que tienen el C-terminal completo (SacB-C·IsIA y SacB-C·LevC. Hemos obtenido quimeras de SacB que con un fragmento mínimo ("región de transición") poseen una alta eficiencia para la síntesis de polímero y mantienen la estabilidad que presenta SacB.

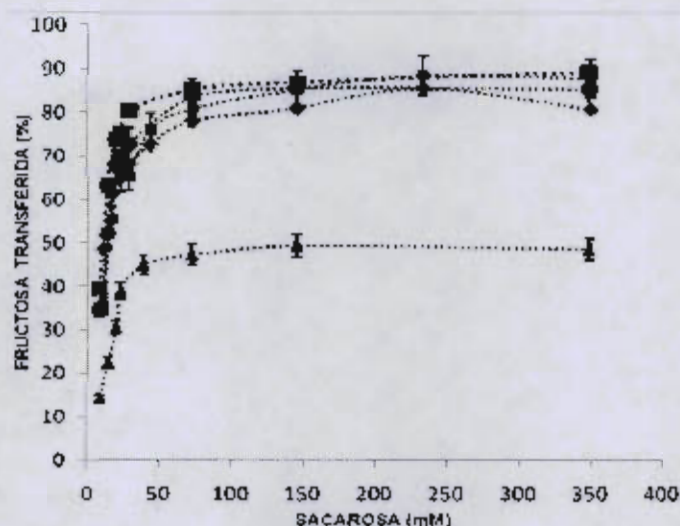


Figura 15. Efecto de la concentración de sacarosa sobre la reacción de transferencia de (▲) SacB, (●) SacB-C·IsIA, (◆) SacB-Tn·IsIA, (⊠) SacB-C·LevC y (■) SacB-Tn·LevC. Se midió la cantidad de fructosa libre y transferida al final de cada reacción (0.5U/mL, 37°C y pH 6 ~100% de conversión).

La estrategia de adición de dominios ha sido utilizada para aumentar la especificidad de transglucosilación en otras glucosilhidrolasas, tal es el caso de una β -glucosidasa de *Thermotoga maritima* en la que fue sustituido un fragmento de su C-terminal por regiones del C-terminal de la β -glucosidasa de *C. gilvus*; las quimeras mejoraron dos veces la capacidad de transglucosilación, lo que permitió a los autores definir que los residuos clave en la actividad de transferencia se encontraban en el segmento fusionado (Goyal *et al.* 2002).

Existen reportes de enzimas de la familia de las glicosilhidrolasas que poseen módulos denominados de unión a carbohidratos (CBM por sus siglas en inglés), estos módulos son dominios aledaños al sitio activo que alternan residuos aromáticos altamente conservados (Notenboom *et al.* 2001; Alberto *et al.* 2004). Dichos dominios son conocidos por mediar una interacción hidrofóbica con el sustrato-sitio activo, lo que permite la integración de puentes de hidrógeno requeridos para la unión del sustrato de tal forma que mejora la orientación con el sitio activo y por lo tanto la catálisis (Guan *et al.* 2003). Por medio de mutación sitio dirigida, se ha demostrado el papel de algunos residuos hidrofóbicos que juegan un papel clave en esta interacción, como es el caso del CBM de la endoinulinasa de *Arthrobacter* (Kim *et al.* 2005). Así mismo, se han generado diversas quimeras fusionando los módulos y CBM a glicosilhidrolasas que no poseen estos módulos y se han obtenido así enzimas con mejores capacidades catalíticas (Kim *et al.* 2005, Mamo *et al.* 2007, Wang *et al.* 2007). Tal es el caso de una cicloinuilooligosacarido-fructanotransferasa (CFTasa) en la que se demostró que su módulo CBM confiere mayor especificidad para la cicltransferencia (Kim y Choi 2001) habiéndose demostrado que el módulo se une con inulina y levana (Lee *et al.* 2004).

Un alineamiento clustal W muestra que las regiones de transición tanto de IsIA como de LevC poseen los residuos aromáticos conservados que se han reportado en los CBM's (figura 16) (Kim *et al.* 2005). Es posible que una influencia similar a los CBM's sobre el sustrato-sitio activo ocurra con las regiones de transición de IsIA y LevC, sin embargo, se requiere realizar más ensayos para aclarar dicha interacción. De forma interesante no fue posible localizar los residuos aromáticos conservados en el C-terminal de ASR y DsrP (GTF's), de hecho, la eliminación del C-terminal completo de la ASR no causa ningún efecto sobre el rendimiento de la reacción de transferencia sobre la alternansacarasa (Joucla *et al.* 2006).

```

TnIs1A      WGDDHSIVELLALNTE DAYLTNNQXNINYSPEWNSIDGCGYPIVTNIKDVLTFFYISGI 60
TnLevC      -----ELVGTKATSELTN-----MKIGWVENKFFVWNE 28
IND1 CBM    -----MTIQTWIALESYFSDS 16

TnIs1A      LSPDGLFKNAPGRMQGARIIGSTSQYNTEKVSARKIKEYTDOLNTIWPVNVNLAGNKFVIKGS 120
TnLevC      LANGYVYDYTN-----TSYYLPKNGVRLSGVQTYANSYYYFDPVT----- 68
IND1 CBM    EQPYDALTPSS-----IIYQRTNDAGFOIAINTYGEWVFTAHVGG----- 56

TnIs1A      SLVTVPMTDSTFRNAYIVRDSDMYLDAPQGETNAKYQSSNSYNDAVVIWGGEYKDAHGI 180
TnLevC      -----YKRVDSNEIHQDN---TGKKYYFG---NDCRVKQG---QFAVNGV 103
IND1 CBM    -----QKRTVK-----APWLFV---LYEWVQIA---AVVDGD 82

TnIs1A      TWNLIRLNCKILNINKNSLAISFSRDLNKA 211
TnLevC      AYNFG--NDRTYER--GEASGYLQVTD-- 128
IND1 CBM    AQQLRLHLDDAAGPKVASVAIPTGSRFTQAA 113
: : : * . . . . .

```

Figura 16. Alineamiento clustal W de las regiones de transición de Is1A, LevC y el CBM de la endoinulinaasa de *Arthrobacter* (No. acceso AJ131562). En negritas y sombreado los residuos aromáticos implicados en la interacción del sustrato-solvente.

7.6 Efecto de los dominios sobre la reacción de transferencia a otros aceptores

Una de las características que destaca de la levansacarasa SacB es su capacidad de transferir el residuo fructosilo a otras moléculasceptoras, por lo que resulta interesante estudiar si la fusión de los dominios proporciona mayor eficiencia para realizar esta reacción. Con este propósito se realizaron reacciones utilizando xilosa y maltosa como moléculasceptoras y sacarosa como sustrato donador. Cabe mencionar que la sacarosa también actúa como aceptor, por lo que en la reacción compiten la transferencia al aceptor con la síntesis de polímero, manteniéndose también la reacción de hidrólisis.

Los resultados obtenidos indican que la levansacarasa SacB utiliza un 60% del sustrato para transferirlo a xilosa y un 20% para sintetizar polímero, por lo que el 20% restante es hidrolizado. Por otro lado, en presencia de maltosa la conversión de sustrato hacia maltósido es de un 40%, mientras que un 25% del sustrato es usado para la síntesis de polímero y un 35% hidrolizado (figura 17 A y B). Los datos anteriores indican que la xilosa es mejor aceptor del residuo fructosilo que la maltosa y el polímero, lo que coincide con lo reportado por Ortíz-Soto (2008). La especificidad de reacción tanto de xilosa como de maltosa en las quimeras SacB-Tn-IslA, SacB-Tn-LevC, SacB-C-IslA y SacB-C-LevC, es similar a SacB (figura 17 A y 17B), aunado al hecho de que sigue siendo mejor aceptor la molécula de xilosa. Sin embargo, es posible observar ligeros cambios en el rendimiento de transferencia, ya que el porcentaje de hidrólisis de sustrato tanto en presencia de xilosa como de maltosa se reduce hasta un 15% para todas las quimeras, cambio que se debe al aumento en el porcentaje de transferencia tanto a polímero como a fructósido. La mayor diferencia la observamos en presencia de maltosa ya que en todas las

quimeras se obtiene un rendimiento un 10% más alto en la transferencia hacia el maltósido que con SacB (figura 17B).

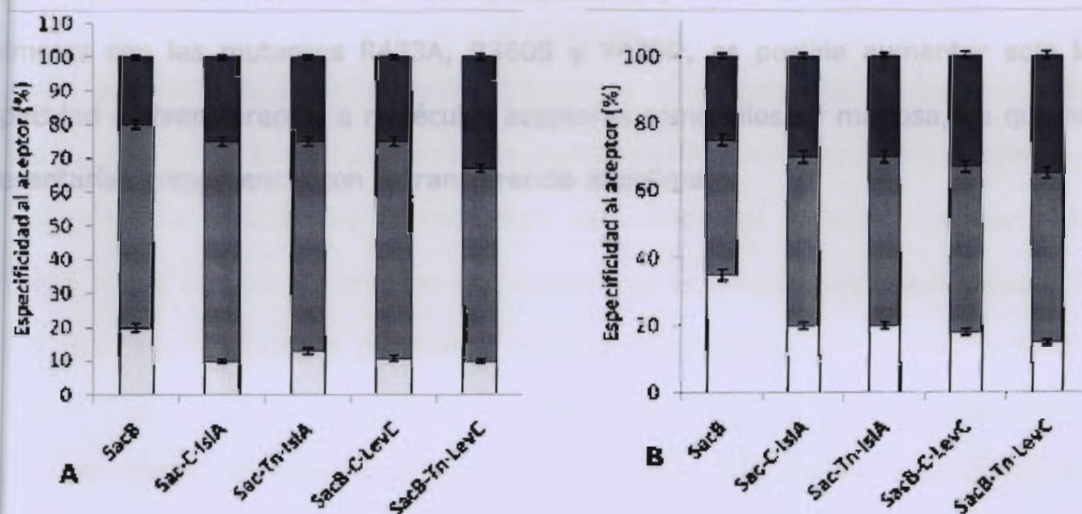


Figura 17. Especificidad de la reacción de transfructosilación en presencia de xilosa (A) y maltosa (B) de la levansacarasa SacB y las quimeras SacB-C-IsIA, SacB-Tn-IsIA, SacB-C-LevC y SacB-Tn-LevC. Transferencia al aceptor (gris), transferencia al polímero (negro), hidrólisis (blanco). (0.5U/mL, 37°C y pH 6).

Es posible que no percibamos un cambio en la transferencia a xilosa o maltosa por la competencia que existe por el sitio activo entre el polímero y las moléculas aceptoras (xilosa y maltosa). En este sentido, sería deseable evaluar el efecto que se produce al construir las quimeras en una enzima en la que se eliminara la actividad de síntesis de polímero. Ortíz-Soto *et al.* (2008) reportan tres mutantes de SacB que perdieron la capacidad de sintetizar polímero por la sustitución de aminoácidos aledaños al sitio activo (R433A, R360S y Y429N). En particular, la mutante R433A presenta una alta tasa de hidrólisis en presencia de sacarosa sin sintetizar polímero, aunque cuando es agregada xilosa al medio de reacción la proteína transfiere el 60% del sustrato al xilósido. De forma similar, las mutantes R360S y Y429N son

altamente hidrolíticas, no sintetizan polímero y transfieren un 35% del sustrato a xilosa. Otra ventaja que presenta la mutante R433A es que su estabilidad y sus parámetros cinéticos no se modifican tan drásticamente como sucede con R360S y Y429N. Resulta entonces muy atractivo estudiar si por medio de la construcción de quimeras con las mutantes R433A, R360S y Y429N, es posible aumentar solo la capacidad de transferencia a moléculas aceptoras como xilosa y maltosa, ya que no presentarían competencia con la transferencia al polímero.

7.7 Estudio cinético de la reacción de transferencia e hidrólisis

7.7.1 Purificación de las quimeras SacB-Tn-IslA y SacB-Tn-LevC

Para la caracterización cinética fue necesario purificar a las enzimas SacB-Tn-IslA y SacB-Tn-LevC. Las quimeras producidas de forma heteróloga poseen una etiqueta de histidina en el extremo C-terminal que facilita su purificación. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos no fue posible purificar ninguna de las 5 quimeras por afinidad. Es posible que la proteólisis del C-terminal escinda la etiqueta de histidina o que durante su proceso de plegamiento la etiqueta no quede expuesta. Como alternativa decidimos purificar y replegar los cuerpos de inclusión de SacB-Tn-IslA y SacB-Tn-LevC utilizando cloruro de guanidinio como agente caotrópico y diálisis secuencial para plegar lentamente las proteínas. Fue posible recuperar así las enzimas activas y puras obteniendo hasta 1.127mg y 0.78mg de SacB-Tn-IslA y SacB-Tn-LevC respectivamente (figura 18).

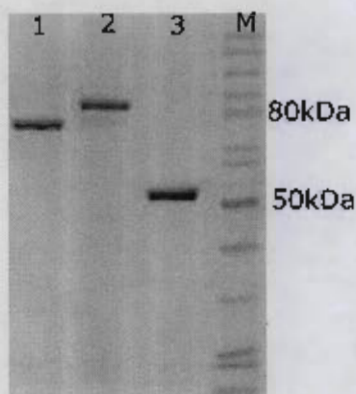


Figura 18. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie de las quimeras purificadas. **1)** SacB-Tn-LevC (65kDa), **2)** SacB-Tn-IslA (80kDa), **3)** SacB (50kDa), **M)** marcador de peso.

7.7.2 Ensayos cinéticos

Hasta la fecha no se ha descrito el mecanismo mediante el cual los dominios adicionales de la inulosacarasa IsIA influyen sobre su dominio catalítico para aumentar la actividad transferasa. Se cree que esta influencia obedece a que estos dominios generan un acceso complejo que limita el paso de las moléculas de agua y con ello reducen la actividad hidrolítica (Olivares *et al.* 2003, del Moral *et al.* 2008). La evaluación cinética de las reacciones independientes (hidrólisis y transferencia) puede generar evidencias sobre esta interrogante. Con el objetivo de evaluar la influencia de las regiones de transición de IsIA y LevC en la catálisis de SacB, fueron comparadas las propiedades cinéticas de las quimeras SacB-Tn-IsIA y SacB-Tn-LevC. Cabe mencionar que estos ensayos se realizaron únicamente con estas dos quimeras ya que se demostró que la región de transición es suficiente para mejorar la transfructosilación. Los parámetros cinéticos obtenidos se enlistan en la tabla 11.

La evaluación indica que el comportamiento cinético de la levansacarasa SacB y las quimeras SacB-Tn-IsIA y SacB-Tn-LevC se ajusta a un modelo Michaelis-Menten. Los parámetros calculados mediante regresión lineal utilizando la representación de Lineweaver-Burk muestran que para SacB, la velocidad específica (k_{catH}) y afinidad para la reacción de hidrólisis (K_{MH}) es de $33.35s^{-1}$ y $11.6mM$ respectivamente, mientras que para las quimeras SacB-Tn-IsIA y SacB-Tn-LevC son muy parecidos (ver tabla 11). Lo anterior indica que la fusión de las regiones de transición mantiene intacta la velocidad específica de hidrólisis (k_{catH}) y la afinidad hacia la molécula de agua (K_{MH}), y por lo tanto no cambia el comportamiento hidrolítico de SacB. Es decir que la reacción de hidrólisis que realiza SacB se lleva a cabo indistintamente con SacB-Tn-IsIA y SacB-Tn-LevC. Este resultado es de suma importancia, pues pone de manifiesto el hecho de que la fusión no modifica el acceso de agua al sitio catalítico de la enzima.

En concordancia, se puede observar que mientras la velocidad específica de transferencia (k_{catT}) de SacB es de $48.4s^{-1}$, en las quimeras SacB-Tn-IsIA y SacB-Tn-LevC resulta de $115.6s^{-1}$ y $238.3s^{-1}$. Lo anterior revela que la adición de las regiones de transición influye sobre el rendimiento de la transfructosilación como consecuencia de un incremento en la velocidad específica de transferencia, de tal forma que supera la actividad hidrolítica. En la tabla 11 se pueden comparar los números de recambio (k_T/k_H) de donde se concluye que por cada mol que hidroliza SacB 1.45 moles son transferidas, mientras que SacB-Tn-IsIA y SacB-Tn-LevC transfiere 3.24 y 6.54 moles por cada mol que hidrolizan. Este hecho explica la alta eficiencia de la transferencia hacia el polímero de las quimeras.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de la levansacarasa SacB y sus quimeras SacB-Tn-IsIA y SacB-Tn-LevC.

ENZIMA	K_{M_H} (mM)	K_{M_T} (mM)	k_{cat_H} (s^{-1})	k_{cat_T} (s^{-1})	k_{cat}/K_{M_H} ($s^{-1} mM^{-1}$)	k_{cat}/K_{M_T} ($s^{-1} mM^{-1}$)	k_T/k_H
<i>SacB</i> (WT)	11.6	38.3	33.3	48.4	2.87	1.26	1.45
<i>SacB-Tn-IsIA</i>	13.2	72.6	35.6	115.6	2.7	1.59	3.24
<i>SacB-Tn-LevC</i>	13.9	102.5	36.4	238.3	2.6	2.33	6.54

Un ajuste estructural que confiera a la enzima una mejor afinidad por la molécula aceptora, puede explicar que aumente la velocidad de transfructosilación. Tal y como lo muestra la estructura cristalográfica de SacB en presencia de rafinosa (Meng y Fütterer 2008), la geometría del sitio activo de SacB indica una interacción débil con el aceptor en los sub-sitios +1 y +2. Según Meng y Fütterer esto explica la mayor transferencia que se observa al aumentar la concentración de sustrato (>250mM). El análisis de los datos cinéticos nos revela que es posible que esto ocurra en las

quimeras que poseen la región de transición (SacB-Tn-IslA y SacB-Tn-LevC, ya que su velocidad específica de transferencia aumenta 2.3 y 5 veces con respecto a SacB. Con base en estos resultados, se sugiere que las regiones de transición influyen sobre la conformación del sitio activo, permitiendo un ajuste estructural a favor de la molécula aceptora (polímero) y con ello un aumento en la tasa de transferencia.

8. CONCLUSIONES

Se logró mejorar la eficiencia de transfructosilación de SacB mediante una estrategia de adición de dominios, siendo este el primer ejemplo reportado para fructosiltransferasas. Dos de las quimeras diseñadas con un fragmento del C-terminal de IsIA y LevC, confieren una alta eficiencia hacia la producción de levana y además mantiene la alta estabilidad que tiene SacB y la capacidad de producir fructósidos por medio de la transferencia a otros aceptores.

Los resultados permiten sugerir que el C-terminal de las levansacarasa de *L. mesenteroides* (LevS, LevC y LevL) juega un papel funcional similar al del C-terminal de la inulosacarasa IsIA; los ensayos demuestran que al igual que IsIA la región de transición de este dominio es suficiente para favorecer la transfructosilación hacia el polímero.

A pesar de que el C-terminal de las FTF's multidominio de *Leuconostoc ssp* comparten homología estructural con GTF's, la fusión de la levansacarasa SacB al C-terminal de la dextransacarasa DsrP no modifica la eficiencia hacia la transferencia del polímero. Se sugiere, que dicha homología tiene que ver con estructuras capaces de anclarse a la pared celular. Posiblemente la estructura de las regiones de transición obedece a un diseño que la evolución ha mejorado para optimizar la eficiencia de las FTF's de *Leuconostoc sp*.

Los datos cinéticos indican que la alta eficiencia de transfructosilación se debe a un aumento en la velocidad específica de la transferencia, lo que podría deberse a un ajuste estructural que modifica la reacción a favor de la transferencia, a través de una mayor afinidad por el polímero aceptor.

9. ANEXOS

9.1.1 Ensayos de anclaje a células

9.1.2 Ensayos realizados con la quimera SacB-C-DsrP

Los extractos de la enzima SacB-C-DsrP se pusieron en contacto con las células de *L. mesenteroides* IBT-PQ por 12 horas. Las células fueron lavadas vigorosamente para eliminar las proteínas no unidas. Para este ensayo se utilizó a SacB como control. Los resultados revelaron que tanto SacB como la quimera SacB-C-DsrP se unen a las células (Figura 19). Una posible explicación al fenómeno anterior es que la levansacarasa SacB interacciona electrostáticamente con los grupos fosfato de los ácidos teicoicos de la pared celular de células gram positivas (Chambert y Petit-Glatron 1993) mientras que el C-terminal de DsrP interacciona con los ácidos lipoteicoicos y se sugiere una interacción hidrofóbica (Olvera-Carranza y cols. 2007).

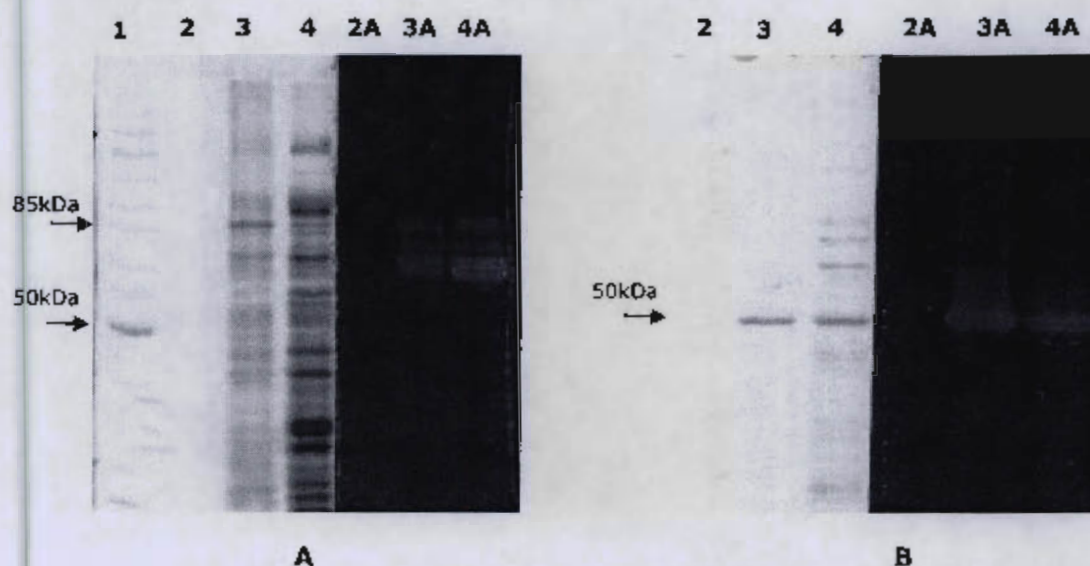


Figura 19. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y de actividad *in situ* de los ensayos de contacto de las células IBT-PQ con las enzima SacB-C-DsrP (A) y SacB (B). Tinción Coomassie de 1) Marcador de peso molecular. 2) Células IBT-PQ. 3) Extracto de la enzima libre. 4) Células IBT-PQ después del contacto con la enzima. Actividad *in situ* de: 2A) Células IBT-PQ; 3A) Extracto de la enzima; 4A) Células IBT-PQ después del contacto con la enzima.

9.1.3 Ensayos de desorción de la quimera SacB-C-DsrP y SacB ancladas a la pared celular

Para establecer el efecto del dominio C-terminal de DsrP en la unión a las células independientemente de SacB, se realizaron ensayos de desorción de las enzimas una vez unidas a las células, utilizando un gradiente escalonado de NaCl (0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5M) con el objetivo de someter a las células a una fuerza iónica que elimine la interacción de SacB.

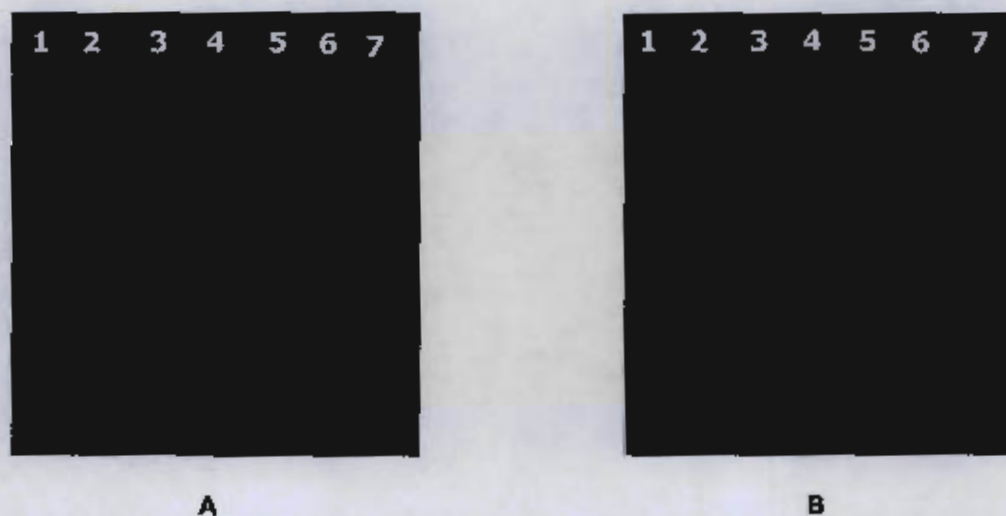


Figura 20. Geles de actividad *in situ* SDS-PAGE. **A)** Ensayo de despegado de la enzima SacB unida a células. **B)** Ensayo de despegado de la enzima SacB-C-DsrP unida a células. **1.** Extracto de la enzima libre, **2.** Células IBT-PQ. Células IBT-PQ después de contacto con la enzima y lavadas con: **3.** 0.3M de NaCl; **4.** 0.6M de NaCl; **5.** 0.9M de NaCl; **6.** 1.2M de NaCl; **7.** 1.5M de NaCl.

Los ensayos realizados demostraron que el C-terminal fusionado conserva su funcionalidad a pesar de estar truncado. Se encontró que con 0.9M de NaCl SacB se despega completamente de las células, mientras que la quimera SacB-C-DsrP no se lava con ninguna de las concentraciones probadas (figura 20). Lo anterior indica que la presencia del dominio C-DsrP ejerce una interacción diferente con la superficie celular que no se elimina aumentando la fuerza iónica. El resultado también permite inferir que C-DsrP está bien plegado y tiene la funcionalidad de unirse a la pared celular.

9.1.4 Ensayos realizados con la quimera SacB-C-DsrP

En el presente ensayo se realizó para definir si el dominio C-IsIA fusionado a SacB mantiene su función de adhesión a la pared celular, como una medida indirecta de establecer su óptimo plegamiento ya que se ha demostrado que el C-terminal de IsIA es quien le confiere la capacidad de asociarse a la pared celular (del Moral *et. al* 2008).

Los ensayos se llevaron a cabo con las células de *Leuconostoc citreum* CW28 cultivadas en glucosa para evitar la expresión de la inulosacarasa (Olivares *et. al*, 2002). Los extractos de las enzimas SacB-C-IsIA y SacB-Tn-IsIA se pusieron en contacto con las células CW28 por 12 horas. Las células fueron lavadas vigorosamente para eliminar las proteínas no unidas. Para este ensayo se utilizó también a SacB como control.

El análisis de los resultados muestra que tanto la levansacarasa silvestre SacB como las quimeras SacB-C-IsIA y SacB-Tn-IsIA se adhirieron a las células CW28 (Figura 21), por lo que con este experimento no es posible determinar si el C-terminal interviene en la interacción con la superficie celular.

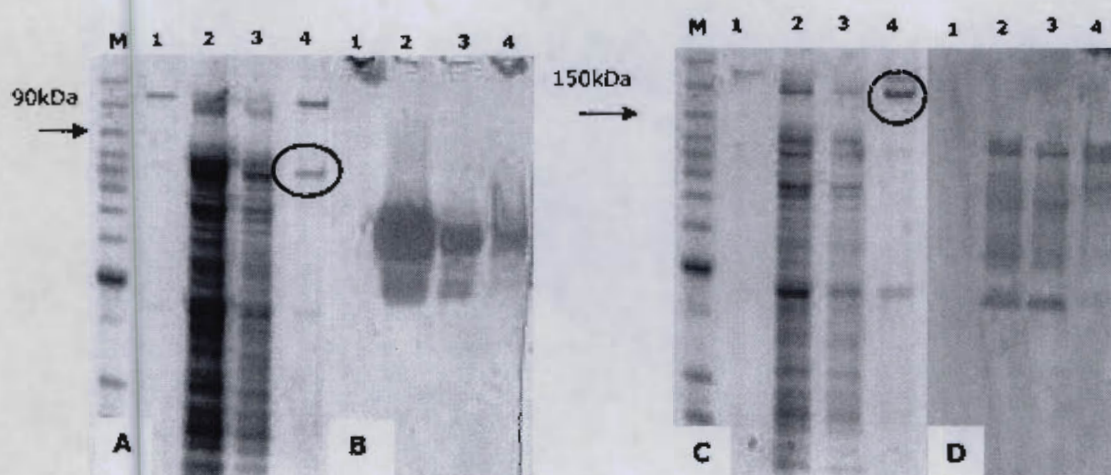


Figura 21. Ensayos de contacto de las quimeras. Geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie de SacB-Tn-IsIA (A) y de SacB-C-IsIA (C). Geles SDS-PAGE de actividad *in situ* de SacB-Tn-IsIA (B) y SacB-C-IsIA (D). 1) Células CW28 antes del contacto. 2) Extracto de la quimera antes del contacto. 3) Extracto de la quimera después del contacto. 4) Células CW28 después del contacto que muestra en un círculo la presencia de la quimera.

Con el objetivo de definir la influencia de unión de Tn-IsIA y de C-IsIA, se realizó un análisis de eficiencia de pegado de las quimeras y el control SacB a través de mediciones de actividad en las células antes y después de los contactos. Los resultados demuestran que las células CW28 enfrentadas a las quimeras y a SacB presentan actividad después del contacto (tabla 12). Sin embargo la eficiencia de pegado a las células fue 4 veces mayor en la quimera que tiene el C-terminal con respecto a SacB silvestre. Por otro lado la eficiencia de pegado de la quimera con la región de transición es similar a la de la levansacarasa SacB, lo que sugiere una interacción menos eficiente. Estos resultados demuestran que el C-terminal es totalmente funcional y que la región de transición aparentemente no tiene una influencia tan eficiente como el dominio completo.

Tabla 12. Actividad específica de las células CW28 después del contacto con los extractos de SacB-C-IsIA, SacB-Tn-IsIA y SacB.

	U/mg de células
SacB-C-IsIA	1.47 ± 0.2
SacB-Tn-IsIA	0.42 ± 0.2
SacB	0.56 ± 0.3

10. BIBLIOGRAFIA

1. Anwar MA, Kralj S, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L. The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass Inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. *Appl Environ Microbiol.* 2008. 74(11):3426-33.
2. Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, Henrissat B, Czjzek M. The three-dimensional structure of Invertase (beta-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *J Biol Chem.* 2004. 279(18):18903-10.
3. Bashton M, Chothia C. The generation of new protein functions by the combination of domains. *Structure.* 2007. 15(1):85-99.
4. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. 72:248-254.
5. Braun L., Dramsi S., Dehoux P., Bierne H, Lindahl G. and Cossart P. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Molecular Microbiology.* 1997. 25(2):285-294.
6. Castillo E. and López-Munguía. Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. *Journal of Biotechnology.* 2004. 114:209-217.
7. Chambert R. and Gonzy-Treboul G. Characterization of a Stabilized Fructosyl-enzyme Complex and Identification of an Aspartyl Residue as the Binding Site of the Fructosyl Group. *Eur. J. Biochem.* 1976. 71: 493-508
8. Chambert R. and Gonzy-Treboul G. Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Kinetic and Thermodynamic Aspects of Transfructosylation Processes. *Eur. J. Biochem.* 1976. 62:55-64
9. Chambert R., Gonzy-Tréboul G. and Dedonder R. Kinetics studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 1974. 41:285-300.
10. Chambert R. and Petit-Glatron M. Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increase its polymerase activity. *Carbohydrate Research.* 1993. 244:129-136.
11. Chambert R. and Petit-Glatron M. Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal.* 1991. 279. 35-41.
12. Chambert R., Rain-Guion M. Ch. and Petit-Glatron M.F. Readthrough of the *Bacillus subtilis* stop codon produces an extended enzyme displaying a higher polymerase activity. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1992. 1132:145-153
13. Chiang CJ, Wang JY, Chen PT, Chao YP. Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beads. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009. 82(3):445-51.

14. Davies G., Wilson K. and Henrissat B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal Letters*. 1997. 321:557-559.
15. Del Moral-Ventura S.T., Olvera-Carranza C., Pérez-Morales R., Rodríguez-Alegria M.E. and López-Munguía A. Functional role of the additional domains of inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28. *BMC Biochemistry*. 2008. 9:6
16. Dedonder, Raymond. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology*. 1966. 8: 500-506.
17. Duboc P., Mollet Beat. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 2001. 11:759-768.
18. Duchateau N, Bortlik K, Simmen U, Wiemken A, Bancal P. Sucrose:Fructan 6-Fructosyltransferase, a Key Enzyme for Diverting Carbon from Sucrose to Fructan in Barley Leaves. *Plant Physiol*. 1995 107(4):1249-1255.
19. Euzenat O., Guibert A. and Combes D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*. 1997. 32(3):237-243.
20. Fernández-Torneo C., López R., García E., Glménez-Gallego G., Romero A. A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nature letters*. 2001. 8(12):1020-1024.
21. Goyal K., Kim B.J., Kim J.D., Kim Y-K, Kitaoka M. and Hayashi K. Enhancement of transglycosylation activity by construction of chimeras between mesophilic and thermophilic β -glucosidase. *Arch. Biochem. Bioph*. 2002. 407:125-134.
22. Guan L, Hu Y, Kaback HR. Aromatic stacking in the sugar binding site of the lactose permease. *Biochemistry*. 2003. 42(6):1377-82.
23. Han Jung-Hoon, Batey S., Nickson A., Teichman S., Clarke J. The folding and evolution of multidomain proteins. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 2007. 8:319-330.
24. Han Y.W. *Advances in Applied Microbiology: Microbial Levan*. 1990. 35:171-194
25. Hernández L., Arrieta J., Menendez C., Vazquez R., Coego A., Suarez V., Selman G., Petit-Glatron M. and Chambert R. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J*. 1995. 309: 113-118.
26. Homann A., Biedendieck R., Götze S., Jahn D. and Seibel J. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochemical Journal*. 2007. 407:189-198.
27. Jaques N.A. Calcium dependence of the cell associated fuctosyltransferases of *Streptococcus salivarius*. *Carbohydr. Res*. 1984. 127:349-355.
28. Jang K-H., Song K.-B., Park B-S., Kim CH., Chung B., Choue R., Lee K.S., Lee Ch., Chum U., Rhee S. Levan production by use of the recombinant levansucrase

- immobilized on titanium-activated magnetite. *Process Biochemistry*. 2001. 37: 339-343
29. Jang K-H., Song K.-B., Kim CH., Chung B., Kang S., Chun U., Choue R. and Rhee S. Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*. 2001. 23:339-344
 30. Jonquière R., Bierre H., Fiedler F., Gounon P. and Cossart P. Interaction between the protein InIB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*. 1999. 34(5):902-914
 31. Joucla G., Pizzut S., Monsan P., Remaud-Simeon M. Construction of a fully active truncated alternansucrase partially deleted of its carboxy-terminal domain. *FEBS Letters*. 2006. 580:763-768.
 32. Kang Soon Ah, Kyunghee Hong, Ki-Hyo Jang, Yun-Young Kim, Ryowon Choue, Yoongho Lim, T. Altered mRNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2006. 17(6):419-26.
 33. Kim HY, Choi YJ. Molecular characterization of cyclodextrin oligosaccharide fructanotransferase from *Bacillus macerans*. *Appl Environ Microbiol*. 2001. 67(2):995-1000.
 34. Kim K.H., Chung C.B., Kim Y.H., Kim K.S., Han C.S. and Kim C.H. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J. Cosmet. Sci.* 2005. 56(6):395-406
 35. Kim KY, Rhee S, Kim SI. Role of the N-terminal domain of endoinulinase from *Arthrobacter* sp. S37 in regulation of enzyme catalysis. *J Biochem*. 2005. 138(1):27-33
 36. Lee JH, Kim KN, Choi YJ. Identification and characterization of a novel inulin binding module (IBM) from the CFTase of *Bacillus macerans* CFC1. *FEMS Microbiol Lett*. 2004. 234(1):105-10.
 37. Lively, R. Polysaccharides antigens as vaccines against bacterial pathogens. *Biomedical and Biotechnological advances in industrial polysaccharides*. Gordon and Breach Science Publishers. 1988. 133-143.
 38. Lin S.Y., Chen M., Li G., Yan Y.L., Yu H.Y., Zhan Y.H., Peng Z.X., Wang J. and Lin M. Amino acid substitution of His296 alter the catalytic properties of *Zymomonas mobilis* 10232 levansucrase. *Acta Biochimica Polonica*. 2008. 55(1):201-206.
 39. Mamo G, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. Fusion of carbohydrate binding modules from *Thermotoga neapolitana* with a family 10 xylanase from *Bacillus halodurans* S7. *Extremophiles*. 2007. 11(1):169-77.

40. Marino M., Banerjee M., Jonquières R., Cossart P. and Gosh P. GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands. *EMBO Journal*. 2002. 21:5623-5634.
41. Martínez-Fleites C; Ortiz-Lombardia T., Pons, N., Tarbouriech E.J., Taylor J., Arrieta L., Hernández and Davies G.J. Crystal structure of levansucrase from the gram-negative bacterium *Gluconeobacter diazotrophicus*. *Biochem. J*. 2005. 390:19-27.
42. Meng G. and Fütterer K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase *Nat. Struct. Biol.* 2003. 11:935-941.
43. Meng G. and Fütterer K. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Structural Biology*. Marzo 2008. 8 :16
44. Mesnage S., Tosi-Couture E. and Fouet A. Production and cell surface anchoring of functional fusions between the SLH motifs of the *Bacillus anthracis* S-layer proteins and the *Bacillus subtilis* levansucrase. 1999. *Mol. Microb.* 31(3):927-936.
45. Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Gilles Joucla, René-Marc Willemont, Magali Remaud-Siméon. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 2001. 11:675-685
46. Morales-Arrieta S. Rodríguez M.E. Segovia L. López-Munguía and Olvera-Carranza C. Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Gene*. 2006. 376(1):59-67
47. Navarre W.W. and Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999. 63(1):174-229.
48. Notenboom V, Boraston AB, Kilburn DG, Rose DR. Crystal structures of the family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A in native and ligand-bound forms. *Biochemistry*. 2001. 40(21):6248-56.
49. Olivares-Illana V., López-Munguía A; and Olvera C. Molecular Characterization of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a Glucosyltransferase. *J. Bacteriol.* 2003. 185: 3606-3612.
50. Olivares-Illana V., Wachter-Rodarte C., Le Borgne S. and López-Munguía A. Caracterización de una célula-asociación inulosucrase de una nueva fuente: A *Leuconostoc citreum* strain aislado de Pozol, una bebida fermentada de maíz de origen maya. *J. Ind. Micro. Biotech.* 2002. 28:112-117.
51. Olvera C, Centeno-Leija S, Lopez-Munguía A. Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2007. 92(1):11-20.

52. Olvera-Carranza C., Fernández-Vázquez J.L., Ledezma-Candanoza L. and López-Munguía A. Role of the C-terminal region of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ in cell anchoring. *Microbiology*. 2007. 153:3994-4002.
53. Ortiz Soto Ma. Elena; Olivares Iliana and López-Munguía. Biochemical Properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 Used for Inulin Synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2004. 22 (4):275-281.
54. Ortiz-Soto M., Rivera M., Rudiño-Piñera E., Olvera-Carranza C., López-Munguía A. Selected Mutations in *Bacillus subtilis* Levansucrase Semi-Conserved Regions Affecting Its Biochemical Properties. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2008. 21(10):589-595
55. Ozimek K., G.J.W. Euverink, M.J.E.C. van der Maarel, L. Dijkhuizen 2005. Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Letters*. 2005. 579:1124-1128.
56. Ozimek K., Kralj S., van der Maarel and Dijkhuizen. The levansucrase and inulosucrase enzyme of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyze processive and non-processive transglycosylation reaction. *Microbiology*. 2006. 152:1187-1196.
57. Pons T., Naumoff D., Martínez-Fleites C. and Hernández L. Three acidic residues are at the active site of a β -propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62, and 68. *PROTEINS : Structure, Function, and Bioinformatics*. 2004. 54:424-432.
58. Rathsam C., Giffard P. M. and Jacques N.A. The Cell-Bound Fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*: the Carboxyl Terminus Specifies Attachment in a *Streptococcus gordonii* Model System. *Journal of Bacteriology*. 1993. 175(14):4520-4527.
59. Rathsam C. and Jacques N.A. Role of C-terminal Domains in Surface Attachment of the Fructosyltransferases of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Journal of Bacteriology*. 1998. 180(23):6400-6403.
60. Roberfroid, M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr*. 2000. 71:1682S-1687S.
61. Rozen, R; Bachrach, G; Bronshteyn, M; Gedalia, I; Steinberg, D. The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2001. 195:205-210
62. Shiroza, T. and Karamitsu. Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions. *J. Bacteriology*. 1988. 170: 810-816.
63. Singh A. and Hayashi K. Construction of chimeric β -glucosidases with improved enzymatic properties. *J Biol Chem*. 1995. 270(37):21928-33.

64. Song D. D. and Jaques N. A. Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem. J.* 1999. 341:285-291.
65. Tanaka T., Yamamoto S., Oi S., Yamamoto T. Structures of heterooligosaccharides synthesized by levansucrase. *J. Biochem.* 1981. 90(2):521-526.
66. Tanaka T, Oi S, Yamamoto T. Synthesis of levan by levansucrase. Some factors affecting the rate of synthesis and degree of polymerization of levan. *J Biochem.* 1979. 85(1):287-93.
67. Tiekling M., Ehrmann M.A., Vogel R.F. and Gänzle M.G. Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005. 66:655-663.
68. Van Geel-Schutten, G. H., Faber, E. J; Smit, E; Bonting, K; Smith, M.R; Ten Brink, B; Kamerling, J. P; Vliegthart, J. F. G; y Dijkhuizen, L. Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Applied and Environmental Microbiology.* 1999. 65:3008-3014.
69. Van Hijum., Van Geel-Schutten,G.H., Rahaoui,H., Van Der Maarel,M.J.E.C. and Dijkhuizen,L. Characterization of a Novel Fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that Synthesizes High-Molecular-Weight Inulin and Inulin Oligosaccharides *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. 68:4390-4398
70. Van Hijum,S.A., Szalowska,E., van der Maarel,M.J. and Dijkhuizen,L. Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology.* 2004. 150:621-630
71. Vijn I. and Smeekens S. Fructan: More than a reserve carbohydrate?. *Plant Physiology.* 1999. 120: 351-359.
72. Vogel C., Bashton M., Kerrison N. D., Chotia C., Teichmann S. A. Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Current Opinion in Structural Biology.* 2004. 14:208-216.
73. Wada, T; Ohguchi, M. y Iwai, Y. A novel enzyme of *Bacillus sp.* 217C-11 that produces Inulin from sucrose. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003. 67:1327-1334.
74. Waldherr F., Meissner D., Vogel R. Genetic and functional characterization of *Lactobacillus panis* levansucrase. *Arch. Microbiol.* 2008. 190(4):497:505.
75. Wang J.H., Tsai M.T., Lee G. C. and Shaw J.F. Construction of a Recombinant Thermostable β -Amylase-Trehalose Synthase Bifunctional Enzyme for Facilitating The Conversion of Starch to Trehalose. *J. Agric. Food Chem.* 2007. 55:1256-1263
76. Wang JH, Tsai MY, Chen JJ, Lee GC, Shaw JF. Role of the C-terminal domain of *Thermus thermophilus* trehalose synthase in the thermophilicity, thermostability, and efficient production of trehalose. *J Agric Food Chem.* 2007. 55(9):3435-43.

77. Yamamoto Y, Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S, Yamaguchi. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J Nutr Biochem*. 1999. 10:13-8.
78. Yanase H., Maeda M., Hagiwara E., Yagi H., Taniguchi K. and Okamoto K. Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J Biochem*. 2002. 132(4):565-572.
79. Zhao. Y., Blumer S. E., and Sundin G. W. Identification of *Erwinia amylovora* Genes Induced during Infection of Immature Pear Tissue. *Journal of Bacteriology*. 2005. 8088-8103