



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATALISIS

**“OBTENCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE
SACAROSA CON LA INULOSACARASA IsIA4 DE
Leuconostoc citreum”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

QFB. ARLEN IDALIA PEÑA CARDEÑA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. AGUSTÍN LÓPEZ-MUNGUÍA CANALES (IBT-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. ISABEL GÓMEZ GÓMEZ (IBT, UNAM)

DR. JOEL OSUNA QUINTERO (IBT, UNAM)

CUERNAVACA, MORELOS, JUNIO 2013



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 Ingeniería y Tecnología de Enzimas del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía Canales y la asesoría técnica de la M.C. María Elena Rodríguez Alegría.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca No. 254166 y por el apoyo económico otorgado por la UNAM a través del proyecto PAPIIT No. IN212311.

*A mis padres y hermanas, por su
cariño y apoyo incondicional.
Los amo profundamente.*

Gracias...

Al Dios que llevo en mente y corazón.

A mis padres, por apoyarme y creer en mí, por todos sus esfuerzos y cariño.

A Nancy y Sonia, gracias por estar conmigo, cuidarme y quererme.

Al Dr. Agustín López-Munguía Canales por la valiosa asesoría y enseñanzas que me brindó.

A la MC. María Elena Rodríguez Alegría por su confianza, entusiasmo y apoyo en todo momento.

A los miembros del comité tutorial, Dra. Clarita Olvera Carranza, Dra. Isabel Gómez Gómez y Dr. Joel Osuna Quintero por sus valiosas contribuciones a lo largo del proyecto.

A los integrantes del jurado, Dr. Adelfo Escalante, Dra. Dolores Reyes, Dr. Jorge Luis Folch, Dra. Marcela Ayala y Dra. Romina Rodríguez, por las acertadas sugerencias que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Humberto Flores Soto por su apoyo con el banco de mutantes.

A mis amigos y compañeros del laboratorio "L@s López": Angelita, Anuar, Domingo, Francisco, Icken, Jaime, Kike, Nadia, Poncho, Simon...por las fiestas biocatalíticas, los gordeos, el cine, etc... nunca los olvidaré.

A mis amigos y compañeros de generación, principalmente a Andrés, Armando, Daniel, Grecia, Irene, Israel, Jorge, Karina, Martín y Ramsés por haber hecho esta experiencia aún mejor.

A Judith Uribe por la ayuda que nos brinda en el laboratorio y por consentirme con el cafecito de las mañanas. A Alma Tremari por las buenas pláticas.

A la T.L. Aurelia Ocampo, por el apoyo técnico además de cuidarme y alimentarme durante este tiempo, eres un angelito.

Al T.L. Fernando González por su asesoría con el HPLC.

A la MC. Yolanda Cocotle Ronzón por sus consejos, enseñanzas y cariño, por impulsarme a ser mejor.

A la Sra. Ricarda Martínez y a Betty, por recibirme afectuosamente en su casa.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Fructanas	4
2.1.1. Definición y función biológica	4
2.1.2. Aplicaciones	5
2.2. Fructooligosacáridos (FOS)	6
2.3. Fructosiltransferasas (FTFs)	8
2.3.1. Definición, distribución y función biológica	8
2.3.2. FTFs vegetales	9
2.3.3. FTFs fúngicas	10
2.3.4. FTFs bacterianas	10
2.3.4.1. Estructura	11
2.3.4.2. Mecanismo de reacción	12
2.3.4.3. FTFs del género <i>Leuconostoc</i> spp.	14
2.3.4.4. Inulosacararas de <i>L. citreum</i> CW28	15
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
5.1. General	19
5.2. Específicos	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. Material biológico	21
6.2. Medios y condiciones de cultivo	21
6.3. Técnicas de biología molecular	22
6.3.1. Purificación de ADN plasmídico	22
6.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa propensa a error (EP-PCR)	22
6.3.3. Análisis de ADN en gel de agarosa	24
6.3.4. Purificación de ADN	24
6.3.5. Clonación de inserto <i>islA4</i> mutagénico en pET28b(+) y pT4	25

6.3.6. Clonación de <i>isIA4</i> mutagénico en pJET1.2/blunt	27
6.3.7. Transformación en <i>E. coli</i>	28
6.3.8. Selección de clonas positivas	28
6.4. Expresión de <i>isIA4</i>	28
6.5. Expresión de <i>isIA</i>	29
6.6. Técnicas enzimáticas y bioquímicas	30
6.6.1. Determinación de la actividad enzimática	30
6.6.2. Purificación de IsIA4	30
6.6.3. Cuantificación de proteína	31
6.6.4. Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
6.7. Ensayos de producción de FOS	31
6.8. Identificación y análisis de productos de reacción	32
6.8.1. Determinación de la especificidad de reacción	32
6.8.2. Cromatografía en capa fina (TLC)	32
6.8.3. Precipitación de polímero	33
6.8.4. Cromatografía de permeación en gel (GPC)	33
6.8.5. Cromatografía de intercambio aniónico con detección de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)	33
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.1. Primera parte: evolución dirigida de la versión truncada IsIA4	34
7.1.1. PCR propensa a error	34
7.1.2. Clonación de <i>isIA4</i> mutagénico en pET28b(+) y pT4	34
7.1.3. Clonación de <i>isIA4</i> mutagénico en pJET1.2/blunt	36
7.2. Segunda parte: ingeniería de reacción	37
7.2.1. Sobreexpresión y purificación de IsIA4	37
7.2.2. Producción de FOS con IsIA4	39
7.2.2.1. Determinación de la relación hidrólisis-transferencia	40
7.2.2.2. Perfil de productos de reacción	42
7.2.2.3. Identificación de FOS producidos por IsIA4	47
7.2.2.4. Análisis cuantitativo de los productos sintetizados por IsIA4	50
7.2.3. Reacciones con IsIA: estudios comparativos	54
7.2.3.1. Especificidad de reacción: relación hidrólisis-transferencia	54
7.2.3.2. Perfil de productos de reacción de transferencia	55
7.2.3.3. Análisis de FOS producidos por IsIA	57
7.2.4. Análisis comparativo de reacciones catalizadas por IsIA e IsIA4	59

8. CONCLUSIONES	62
9. PERSPECTIVAS	63
10. REFERENCIAS	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Representación estructural de a) inulina y b) levana.	5
Fig. 2. Representación estructural de algunos FOS de interés: a) 1-kestosa, b) 6-kestosa y c) neokestosa.	7
Fig. 3. Reacciones catalizadas por las FTFs.	8
Fig. 4. Esquema de la estructura general de las FTFs multidominio bacterianas.	11
Fig. 5. Esquema del mecanismo ping-pong Bi-Bi propuesto para la levansacarasa SacB.	13
Fig. 6. Esquema de la estructura primaria de las FTFs de <i>Leuconostoc</i> spp.	14
Fig. 7. Esquema de IsIA y versiones truncadas.	16
Fig. 8. Gel de agarosa al 1% que muestra el inserto <i>isIA4</i> obtenido bajo las condiciones de mutagénesis B, C y D. M =Marcador.	34
Fig. 9. Gel de SDS-PAGE de extractos enzimáticos obtenidos probando diferentes cepas de <i>E. coli</i> .	37
Fig. 10. Gel de SDS-PAGE de IsIA4 en diversas etapas del proceso de purificación.	39
Fig. 11. Especificidad de reacción en función de la concentración de sustrato y enzima IsIA4. Reacciones llevadas a cabo en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 y 1 mM CaCl ₂ .	41
Fig. 12. Placas de TLC en las que se muestra el perfil de productos obtenido a lo largo de la reacción con diferentes concentraciones de sustrato y 1 U/mL de enzima IsIA4 a 30 °C.	44
Fig. 13. Cromatogramas de permeación en gel que muestran la distribución de peso molecular del polímero producido por la enzima IsIA4 al final de la reacción en función de la actividad enzimática y la concentración de sustrato: a) 292, b) 1170 y c) 2046 mM de sacarosa.	46
Fig. 14. Perfil de FOS analizados mediante HPAEC-PAD obtenidos en reacciones con 292 mM de sacarosa y diferentes concentraciones de enzima IsIA4.	48
Fig. 15. Perfil de FOS analizados mediante HPAEC-PAD obtenidos en reacciones con 2046 mM de sacarosa y 1 U/mL de enzima IsIA4.	49

Fig. 16. Especificidad de reacción de transfructosilación con IslA4 hacia hidrólisis y hacia la síntesis de inulina y FOS. Reacciones llevadas a cabo en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 y 1 mM CaCl ₂ .	52
Fig. 17. Fructosa incorporada a FOS (F _{FOS}) bajo las condiciones de reacción probadas. Reacciones llevadas a cabo en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 y 1 mM CaCl ₂ .	53
Fig. 18. Especificidad de reacción a diferentes concentraciones de sustrato probadas y 1 U/mL de enzima IslA. Reacciones llevadas a cabo en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 y 1 mM CaCl ₂ .	55
Fig. 19. Placa de TLC en la que se muestra el perfil de productos obtenido con a) 292, b) 1170 y c) 2046 mM de sacarosa como sustrato y 1 U/mL de enzima IslA a 30 °C.	55
Fig. 20. Cromatograma de permeación en gel que muestra la distribución de pesos moleculares del polímero producido por la enzima IslA al final de la reacción en función de la concentración de sacarosa y 1 U/mL de enzima IslA.	56
Fig. 21. Perfil de FOS analizados mediante HPAEC-PAD obtenidos en reacciones con diferentes concentraciones de sustrato y 1 U/mL de enzima IslA.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades cinéticas y especificidad de reacción de la inulosacarasa Isla de <i>L. citreum</i> CW28 y versiones truncadas	16
Tabla 2. Propiedades cinéticas y especificidad de reacción de Isla4 de <i>L. citreum</i> CW28 y mutante S425A	17
Tabla 3. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas en este estudio	21
Tabla 4. Composición de medio Luria Bertani (LB)	22
Tabla 5. Composición de medio SOC	22
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen <i>isla4</i>	22
Tabla 7. Componentes para la reacción (μL) de EP-PCR según kit <i>Diversify PCR Random Mutagenesis</i>	23
Tabla 8. Condiciones de amplificación según kit <i>Diversify PCR Random Mutagenesis</i>	23
Tabla 9. Componentes para la reacción de PCR control, con Manganeso (alta mutagenicidad) y sin Manganeso (baja mutagenicidad) según Cadwell y Joyce (1992)	24
Tabla 10. Condiciones de amplificación según Cadwell y Joyce (1992)	24
Tabla 11. Condiciones para las digestiones enzimáticas del plásmido y del inserto mutagénico	25
Tabla 12. Condiciones para la ligación con pET28b(+) en relación 3:1	26
Tabla 13. Condiciones para la ligación con pT4 en relación 3:1	26
Tabla 14. Reacción blunting	27
Tabla 15. Número de clonas obtenidas en diversas construcciones	35
Tabla 16. Balance global del proceso de purificación de Isla4 producida en <i>E. coli</i> BL21 a partir de un cultivo de 1 L	39
Tabla 17. Fructosa incorporada a polímero (F_{POL}) bajo las condiciones de reacción probadas cuantificado mediante una curva estándar	51

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ASR	Alternansacarasa
BSA	Seroalbúmina bovina
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
FOS	Fructooligosacáridos
FTF	Fructosiltransferasa
GBD	Dominio de unión a glucano (glucan binding domain)
GH	Glicosilhidrolasas
GP	Grado de polimerización
GPC	Cromatografía de permeación en gel (gel permeation chromatography)
GTF	Glucosiltransferasa
HMW	Alto peso molecular (high molecular weight)
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio aniónico con detección de pulso amperométrico (high-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (high pressure liquid chromatography)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LMW	Bajo peso molecular (low molecular weight)
OD	Densidad óptica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
pb	Pares de bases
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
TAE	Base tris, ácido acético y EDTA
TLC	Cromatografía en capa fina (thin layer chromatography)
U	Unidades de actividad enzimática
v/v	Volumen/volumen
w/v	Peso/volumen

RESUMEN

Se llevó a cabo la síntesis de fructooligosacáridos (FOS) a partir de sacarosa como sustrato con la inulosacarasa IslA4 de *Leuconostoc citreum* como catalizador. Para ello se plantearon dos estrategias, primeramente se planeó realizar evolución dirigida de IslA4 con el fin de encontrar una enzima mutante más activa para la síntesis de polímero; sin embargo, no se logró construir el banco de mutantes debido a la imposibilidad de clonar el inserto *islA4* mutagénico en el vector pET28b(+). En cuanto a la segunda estrategia, mediante el estudio de la influencia de las condiciones de reacción en la especificidad y productividad, se encontró que concentraciones adecuadas de sustrato y enzima resultan en una alta transfructosilación hacia la producción de una amplia gama de FOS identificados por TLC y HPAEC-PAD. Con el fin de comprobar o descartar si este comportamiento es exclusivo de IslA4, se realizaron reacciones con IslA observando que a altas concentraciones de sustrato también se producen FOS; sin embargo, los principales productos son polímeros tanto de alto como de bajo peso molecular debido a la presencia del dominio de unión a glucano (GBD) en el dominio C-terminal el cual está involucrado en el crecimiento del polímero de fructana.

1. INTRODUCCIÓN

Las glicosiltransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un residuo glicosilo de una molécula donadora hacia una aceptora. Entre éstas se encuentran las fructosiltransferasas (FTFs), enzimas que transfieren un residuo de fructosa de la sacarosa inicialmente a la misma sacarosa como molécula aceptora, y posteriormente hacia la cadena de fructosas que se genera hasta dar lugar a un polímero denominado fructana.

Las fructanas pueden ser tipo inulina o levana. La primera es un polímero con enlaces $\beta 2 \rightarrow 1$ en la cadena principal y con ramificaciones en $\beta 2 \rightarrow 6$. Por su parte, la levana presenta enlaces $\beta 2 \rightarrow 6$ en la cadena principal y con ramificaciones en $\beta 2 \rightarrow 1$ aproximadamente cada 9 o 10 residuos. Las fructanas son sintetizadas por plantas, hongos y bacterias. Cuando las cadenas de fructosa presentan un grado de polimerización (GP) de 3 a 10 unidades reciben el nombre de fructooligosacáridos (FOS).

En los últimos años el interés por la obtención de FOS ha aumentado considerablemente debido a su carácter de “prebióticos”, es decir, sustancias que son selectivamente fermentadas en el colon por géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* provocando cambios específicos en su composición y/o actividad, confiriendo beneficios sobre el bienestar y la salud del huésped siendo utilizados a nivel industrial en diversos alimentos (Gibson y col., 2004).

Hace algunos años en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Enzimas del Instituto de Biotecnología, Olivares-Illana y col. (2002) realizaron investigaciones con la cepa CW28 de *Leuconostoc citreum* aislada del pozol por el grupo de la Dra. Wachter-Rodarte de la Facultad de Química de la UNAM (1995), en la cual identificaron una enzima a la que se denominó ISLA y que presenta actividad FTF produciendo inulina, es decir, es una inulosacarasa. El análisis de su estructura primaria indicó que se trataba de una FTF multidominio, con el dominio catalítico de las FTFs pero con regiones adicionales de alta similitud a la alternansacarasa (ASR), una glucosiltransferasa (GTF) de *L. mesenteroides* NRRL B-1355. Las GTFs son enzimas que catalizan reacciones

análogas a las FTFs pero transfiriendo glucosa a partir de sacarosa y formando polímeros de glucosa (glucanas).

Posteriormente, con la finalidad de conocer la función en la catálisis de los dominios adicionales de IslA, Del Moral y col. (2008) construyeron y analizaron el comportamiento de cuatro versiones truncadas denominadas IslA2, Δ NIslA2, IslA3 e IslA4, concluyendo que la región C-terminal con alta identidad con ASR no está involucrada en la estabilidad de la enzima pero sí en la especificidad de reacción, ya que su eliminación en las versiones truncadas incrementa la tasa de hidrólisis.

Particularmente destaca la versión truncada IslA4, consistente básicamente en el dominio catalítico, ya que no se proteoliza durante la expresión en *E. coli*, y mantiene la capacidad de sintetizar inulina de alto peso molecular (3,000 kDa), además de una baja proporción de FOS en las condiciones de ensayo empleadas por Del Moral y col. (2008). En posteriores estudios de especificidad con la versión truncada IslA4, Rodríguez-Alegría y col. (2010) encontraron que en la mutante S425A se modifica la especificidad eliminando la capacidad de sintetizar polímero, dando lugar únicamente a la síntesis de FOS. Sin embargo, la constante catalítica (k_{cat}) disminuyó casi 50 veces comparada con la k_{cat} de la enzima silvestre IslA4.

Dado el interés general que presentan los FOS en el campo de los nutracéuticos y la experiencia del grupo de Ingeniería y Tecnología de Enzimas en la caracterización de enzimas tipo FTF, el objetivo de este proyecto es definir condiciones adecuadas para la de síntesis de FOS tipo inulina a partir de sacarosa utilizando a la inulosacarasa IslA4 de *L. citreum* como catalizador. Para ello, se plantean dos estrategias: primeramente, dada la especificidad demostrada de la mutante S425A, recuperar mediante mutaciones al azar su actividad catalítica. Para lograr este objetivo, existe una limitación importante ya que después de realizar la mutágenesis al azar, existe una enorme dificultad para seleccionar mutantes sobreproductoras de FOS debido a que hasta el momento no se ha reportado ningún método de selección de variantes de FTFs o GTFs con mayor actividad específica hacia la síntesis de FOS. Ante esta perspectiva, la estrategia propuesta es realizar

evolución dirigida de IslA4 seleccionando, con base en el fenotipo mucóide, una enzima mutante más activa para la síntesis de polímero, es decir, una mutante sobreproductora de la cual partir para, posteriormente, llevar a cabo la mutación S425A con la expectativa de que dada la mayor actividad, ésta compensará la pérdida que conlleva la mutación S425A.

La segunda estrategia, consiste en estudiar la influencia de las condiciones de reacción en la especificidad y productividad de la enzima con el fin de recuperar la eficiencia para transglicosilación. Esta estrategia se basa en el hecho ampliamente conocido de que la eficiencia de la actividad transferasa está influenciada por diversos factores entre los que destaca la presencia de solventes orgánicos, la temperatura, la concentración de sustrato y de enzima, entre otros. En este sentido, la ingeniería de reacción juega un papel muy importante para dirigir la reacción hacia un producto de interés específico, en este caso, FOS tipo inulina.

2. ANTECEDENTES

2.1. Fructanas

2.1.1. Definición y función biológica

Las fructanas son polímeros solubles sintetizados principalmente a partir de sacarosa, su estructura consiste en una glucosa inicial unida a múltiples unidades de fructosa. Existen dos tipos de fructanas según el tipo de enlace que contienen: inulina y levana, que dependiendo del origen pueden adquirir diversos GP y ramificaciones.

La inulina es un polímero lineal con enlaces $\beta(2\rightarrow1)$ en la cadena principal (Fig. 1a) pudiendo estar ramificada mediante enlaces $\beta(2\rightarrow6)$. El primer monómero de la cadena es una glucosa, debido a que la sacarosa es el primer aceptor para la elongación de la cadena. La inulina de origen microbiano puede llegar a tener pesos moleculares superiores a 10^6 Da (Ebisu y col., 1975). En plantas, la inulina constituye un polisacárido de reserva ya que es almacenada en la vacuola y se acumula en órganos especializados como las raíces, tubérculos, etc. (Vjin y Smeekens, 1999).

Por otra parte, la levana presenta enlaces $\beta(2\rightarrow6)$ en la cadena principal (Fig. 1b) con ramificaciones $\beta(2\rightarrow1)$ aproximadamente cada 9 o 10 residuos, llegando a alcanzar más de diez mil residuos de fructosa en la cadena, en el caso de las levanas de origen microbiano. En los microorganismos, las levanas tienen función de reserva y como factor de adherencia a superficies (Hendry, 1993), siendo para algunas especies un factor de patogenicidad que facilita la infección e invasión.

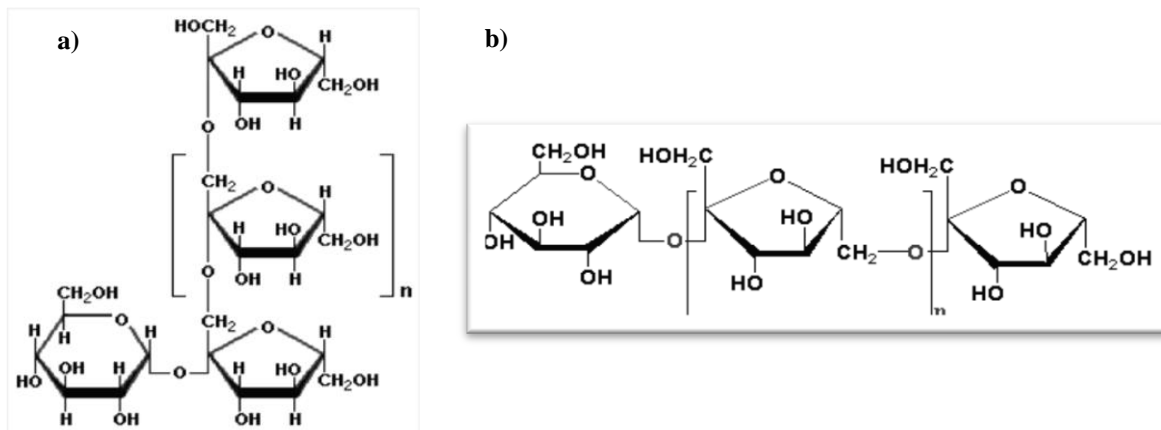


Fig. 1. Representación estructural de a) inulina y b) levana.

2.1.2. Aplicaciones

Las fructanas, y principalmente los FOS (cadenas de fructosa con GP entre 3 y 10 unidades), son considerados como nutraceuticos, es decir, compuestos alimentarios que además de su contenido nutricional tienen un impacto positivo en la salud del individuo, incluyendo la prevención y/o tratamiento de una enfermedad (Brower, 2005).

Actualmente a nivel comercial, la inulina se extrae principalmente de la raíz de achicoria (*Cichorium intybus*), aunque también se usa la alcachofa de jerusalem (*Helianthus tuberosus*) y el *Agave azul tequilana* (Lopez y col., 2003). La inulina de origen vegetal se ha caracterizado por su función como fibra soluble siendo parte de la dieta normal humana ya que se encuentran en cerca del 15% de las plantas, algunas de gran importancia para la alimentación como cereales (trigo, cebada, avena) y vegetales (chicoria, cebolla, puerros o poros, ejotes, alcachofa). Así mismo, es utilizada como sustituto de grasas en alimentos como yogurt, quesos, helados, entre otros productos (Vjin y Smeekens, 1999), ya que en solución tiene textura similar a la grasa pero con mucho menor valor calórico además de proporcionar estabilidad a las emulsiones.

La levana de alto peso molecular puede utilizarse como goma industrial, mientras que las de menor peso molecular como edulcorantes. Debido a sus propiedades texturizantes y/o estabilizantes, se ha propuesto su aplicación como agente encapsulador y acarreador de fragancias y sabores.

2.2. Fructooligosacáridos (FOS)

Los FOS pueden ser clasificados en dos tipos: serie G y serie F. Los primeros son aquellos que se derivan de la síntesis a partir de sacarosa por lo que presentan un molécula de glucosa en el extremo no reductor. Algunos ejemplos son la 1-kestosa (GF2), nistosa (GF3) y fructofuranosil-nistosa (f-nistosa, GF4) (Fig. 2). En cuanto a la serie F, son derivados de la hidrólisis de fructanas por lo que no contienen la molécula de glucosa en el extremo no reductor. Diversos estudios han reportado que los dos tipos de producto son utilizados por cepas probióticas, como *Bifidobacterium* y la utilización de éstos depende principalmente del GP y pureza (Biedrzycka y Bielecka, 2004).

Los FOS se han caracterizado por su función como prebióticos, es decir, ingredientes alimenticios no digeribles en el tracto gastrointestinal que estimulan selectivamente el crecimiento y/o actividad de probióticas de los géneros *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. en el colon y la disminución de bacterias patógenas promoviendo así la salud del hospedero (Kaur y Gupta, 2002). Los beneficios a la salud dependen directamente de las funciones metabólicas de la bacteria y su interacción con otras, de la modulación de funciones intestinales, así como de los productos finales de la fermentación (Guigoz y col., 2002; Harmsen y col., 2002).

Según Collins y Gibson (1999), el metabolismo bacteriano, resultado del consumo de FOS, da lugar a una serie de ventajas entre las que se incluyen la producción de vitaminas, regulación del sistema inmunológico, mejora en la absorción de nutrimentos, inhibición de las especies nocivas, eliminación de sustancias cancerígenas y toxinas e incluso la prevención del cáncer de colon (Katapodis y col., 2004; Moore y col., 2003). Además, se ha demostrado una influencia favorable de la ingesta de FOS en la absorción de minerales, principalmente Ca^{+2} y Mg^{+2} (Roberfroid, 2000), así como en la disminución en los niveles de triglicéridos, fosfolípidos y lipoproteínas de baja densidad (LDL) al disminuir la lipogénesis *de novo* en hígado (Jackson y col., 1999).

Los FOS de GP de 3-6 unidades de fructosa son utilizados también en el desarrollo de alimentos funcionales como edulcorantes naturales de bajo índice glucémico en postres, gelatinas, pasteles y fórmulas para bebés ya que tienen ligero sabor dulce, además de mayor solubilidad y baja viscosidad comparado con las fructanas de alto GP (Robertfroid, 2000).

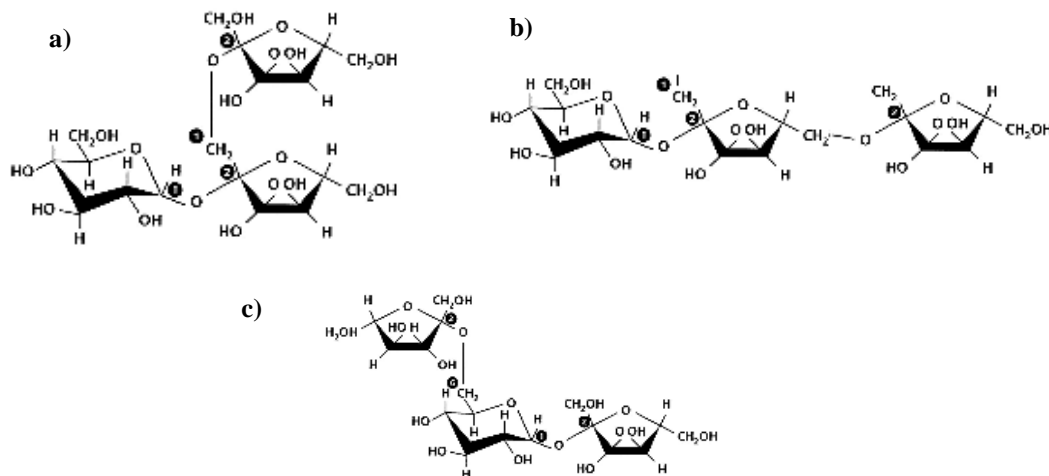


Fig. 2. Representación estructural de algunos FOS de interés: a) 1-kestosa, b) 6-kestosa y c) neokestosa.

En la actualidad, los FOS se producen principalmente mediante dos métodos. El primero se basa en la hidrólisis de la inulina que se extrae de las raíces de achicoria a través del uso de enzimas denominadas endoinulinasas, es decir, enzimas que cortan al interior del polímero generando FOS con un GP de 2-8. (Niness, 1999). El segundo método es a través del uso de FTFs de origen fúngico de géneros como *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. que producen únicamente FOS con rendimientos de más del 50% (Sangeetha y col., 2005a; Yun, 1996). Así mismo existe la síntesis química (Oscarson y Sehgelmeble, 2002); sin embargo, esta vía es sumamente compleja y no viable para aplicaciones alimentarias.

2.3. Fructosiltransferasas (FTFs)

2.3.1. Definición, distribución y función biológica

Las FTFs (E.C. 2.4.1.-) son enzimas que transfieren el residuo fructosilo de la sacarosa a una molécula aceptora que contiene grupos hidroxilo que puede ser la fructosa de la sacarosa o de una cadena de fructosas sintetizando FOS y posteriormente fructanas (actividad transferasa). Las FTFs realizan también la transferencia de la fructosa a una molécula de agua, ocasionando la hidrólisis de la sacarosa (actividad hidrolasa). Finalmente, la transferencia pueden llevarla a cabo también hacia una molécula aceptora exógena sintetizando fructósidos (reacciones de aceptor). Estas tres posibilidades se ilustran en la Fig. 3.

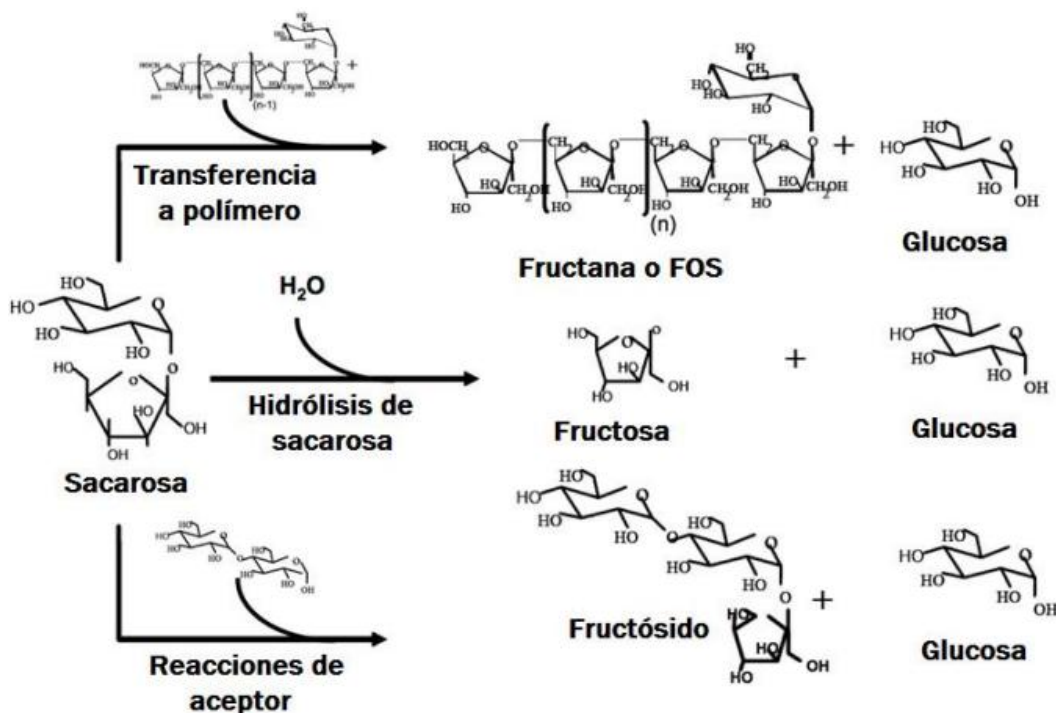


Fig. 3. Reacciones catalizadas por las FTFs.

La transferencia se realiza sin necesidad de cofactores o intermediarios fosforilados, ya que la energía proviene del rompimiento del enlace glicosídico de la sacarosa permitiendo la eficiente transferencia del residuo fructosilo (Chambert y Gonzy-Tréboul,

1976). Así mismo, la reacción se puede modular en función de las condiciones y composición del medio de reacción como puede ser la concentración de sustrato inicial y enzima, temperatura, así como la presencia de solventes orgánicos. Respecto a lo anterior, Castillo y López-Munguía (2004) estudiaron la síntesis de levana en presencia de diversos solventes encontrando un incremento en la actividad transferasa desde 45% hasta casi 85% en reacciones llevadas a cabo en 50% (v/v) de 2-metil-2-propanol (2M2P).

De acuerdo al polímero que sintetizan las FTFs pueden ser tipo inulosacarosas o levansacarosas, sintetizando inulina y levana respectivamente. La mayoría son extracelulares, sin embargo, existen algunas asociadas a pared celular. En general las FTFs tienen pesos moleculares entre 45 y 64 kDa, aunque como se ha señalado ya, las producidas por bacterias acidolácticas suelen ser multidominio y alcanzan pesos moleculares de entre 80 y 170 kDa.

2.3.2. FTFs vegetales

Se conoce que en plantas, la síntesis de fructanas se realiza mediante la acción concertada de diversas FTFs, siendo un proceso complejo ya que se requiere sintetizar previamente una molécula base a partir de la cual procede la elongación del polímero. Las fructanas están presentes en aproximadamente el 15% de las plantas que producen flores, es decir, alrededor de unas 40,000 especies (Hendry y Wallace, 1993). Entre ellas se encuentran muchos cultivos de interés agroindustrial, como cereales (trigo, avena, cebada), hortalizas (achicoria, cebolla, lechuga), así como el agave. Las fructanas vegetales son almacenadas en las vacuolas como reservas de carbohidratos (Vjin y Smeekens, 1999); además, probablemente debido a que intervienen en el control de la presión osmótica dentro de la célula, juegan un papel importante en la estabilización de las membranas durante el congelamiento y la desecación (Hincha y col., 2000; Kawakami y Yoshida, 2002). Así mismo, se cree que protegen la bicapa lipídica y de esta forma previenen el daño a las membranas celulares; sin embargo, aún no se conoce el mecanismo molecular por el cual se incrementa la resistencia a estos factores.

En general, las fructanas producidas por plantas poseen una mayor diversidad estructural y aproximadamente tienen un GP de 30 a 50 unidades de fructosa, menor que las producidas por bacterias, aunque ocasionalmente pueden alcanzar un máximo de 200 residuos. Se distinguen cinco tipos principales de fructanas vegetales: inulina, levana, neoserias de inulina, neoserias de levana y fructanas ramificadas. Las neoserias son moléculas que constan adicionalmente de una cadena de fructosa elongada a partir del C'6 de la unidad de glucosa de la sacarosa, como ejemplo se encuentra la neokestosa que es el oligosacárido más pequeño de la neoserie tipo levana (Fig. 2). En cuanto a las fructanas ramificadas, también conocidas como graminanas, son moléculas formadas por enlace tipo levana con ramificaciones tipo inulina que pueden llegar a combinarse con neoazúcares con cadenas ramificadas de fructana por lo que su estructura es sumamente compleja.

2.3.3. FTFs fúngicas

Se han identificado diversas FTFs de cepas fúngicas que sintetizan principalmente FOS. Entre las cepas identificadas se encuentran *Aspergillus foetidus*, *A. niger*, *A. sydowi*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, entre otras (Rehm y col., 1998). Los genes de esas FTFs se han expresado en *E. coli* y *S. cerevisiae* y en general sólo han producido FOS. A pesar de que existen numerosos reportes relacionados con FTFs fúngicas productoras de fructanas, aún no se conoce cuál es su función fisiológica en estos organismos (Hang y col., 1995; L'Hocine y col., 2000; Sangeetha y col., 2004; Wang y Rakshit, 2000; Yun, 1996).

2.3.4. FTFs bacterianas

Las FTFs bacterianas se encuentran clasificadas en la familia 68 de las glicosilhidrolasas (GH) de acuerdo a la clasificación CAZY (Carbohydrate Active Enzymes) (Henrissat y Davies, 1997), y son sintetizadas por numerosas especies tanto Gram-negativas como positivas, la mayoría pertenecientes a los géneros *Bacillus*,

Zymomonas, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. En contraste con las FTFs vegetales, en bacterias se requiere solamente una FTF (inulosacarasa o levansacarasa) para la síntesis del polímero.

Las inulosacarasas bacterianas sólo son producidas por bacterias Gram-positivas y son pocas las secuencias aminoacídicas conocidas (Anwar y col., 2008; Anwar y col., 2010; Olivares-Illana y col., 2002; Rosell y Birkhed, 1974; Schwab y col., 2007; van Hijum y col., 2002; Wada y col., 2003); por el contrario, las levansacarasas bacterianas son producidas tanto por bacterias Gram-positivas como Gram-negativas y se tiene un mayor conocimiento sobre estas últimas ya que hay más de 40 secuencias reportadas. Debido a la robustez que presenta la levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis*, es la FTF bacteriana más estudiada. SacB sintetiza levana con una distribución bimodal de peso molecular, aunque este aspecto es altamente dependiente de las condiciones de síntesis (Porrás-Domínguez, 2012).

2.3.4.1. Estructura

Las FTFs de bacterias Gram-negativas tienen un peso molecular entre 45-64 kDa y presentan un único dominio; en cambio, existe un pequeño grupo de FTFs que proviene de bacterias Gram-positivas que son enzimas multidominio alcanzando pesos moleculares de hasta 170 kDa. Cabe mencionar que una excepción es la levansacarasa de *B. subtilis* (SacB) la cual tiene la misma estructura que las FTFs de bacterias Gram-negativas.

Generalmente, las FTFs multidominio de bacterias Gram-positivas constan de cuatro regiones: péptido señal, región variable, dominio catalítico y C-terminal (van Hijum y col., 2006). Esta estructura se ilustra en la Fig. 4.



Fig. 4. Esquema de la estructura general de las FTFs multidominio bacterianas.

Figura tomada de Del Moral y col., 2008.

En el N-terminal las FTFs bacterianas contienen un péptido señal de aproximadamente 38 aa; así como una región variable que oscila entre 100-200 aa y cuya función aún no ha sido establecida. El dominio catalítico es el responsable de la actividad FTF y, en promedio, está formado por 500 residuos de aa. Gracias a la cristalización de la FTF SacB de *B. subtilis* (Meng y Fütterer, 2003) se conoce que este dominio contiene un plegamiento tipo β -propela con 5 hojas β (I-V) que adoptan una topología clásica “W” de cuatro hojas β antiparalelas (A-D), las cuales están arregladas alrededor de un túnel central donde se localizan los residuos ácidos involucrados en la catálisis: D86 y E342 así como D247, que aunque también se requiere para la catálisis, se encuentra muy distante del carbono anomérico del fructosilo de la sacarosa por lo que se sugiere que su función es estabilizar al sustrato. También se han identificado una serie de aa en el bolsillo catalítico que dirigen el posicionamiento correcto del sustrato como son R246, R360, E340, W85, R346, entre otros (Meng y Fütterer, 2003). Por último, el tamaño del dominio C-terminal en las FTFs es variable (100-500 aa) y en algunos casos, se ha encontrado evidencia de que su función es el anclaje de la enzima a la pared celular del microorganismo productor, a través de la unión covalente del motivo LPXTG (van Hijum y col., 2006).

2.3.4.2. Mecanismo de reacción

El mecanismo de reacción de las FTFs (Chambert y col., 1974) implica la unión de la sacarosa con la enzima formando un complejo enzima-sacarosa que, después de liberar la glucosa, da origen al intermediario covalente enzima-fructosilo; posteriormente, la fructosa es transferida a la cadena aceptora aumentando así el tamaño de la cadena en una unidad de fructosilo, mediante un mecanismo tipo ping-pong (Fig. 5). Se demostró también que la enzima es responsable tanto de la síntesis de la cadena principal como de las ramificaciones.

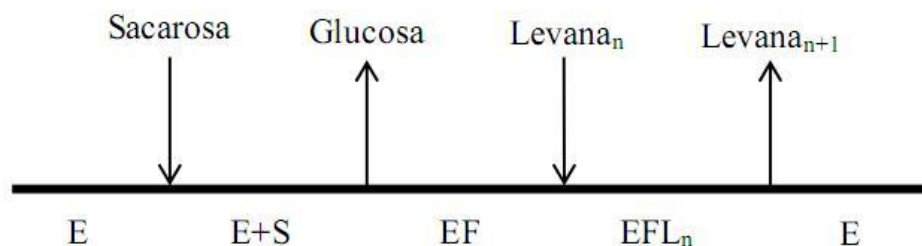


Fig. 5. Esquema del mecanismo ping-pong Bi-Bi propuesto para la levansacarasa SacB.
E: enzima, S: sacarosa, F: fructosa, n: número de residuos de fructosa.

De acuerdo con Davies y col. (1997), el sitio activo de las GH puede ser dividido en subsitios de unión a sustrato denominamos -1, +1 y +2. Los residuos en contacto con la fructosa conforman el subsitio -1; por su parte, los residuos en contacto con la glucosa constituyen el subsitio +1, aunque se ha visto que este subsitio es más flexible mostrando además afinidad por otros glicopiranosidos y disacáridos (Seibel y col., 2005). Así mismo, a partir de la estructura cristalográfica de SacB unida a rafinosa, se determinó la existencia de un subsitio +2 en donde los residuos interaccionan con la molécula de galactosa de manera indirecta a través de enlaces de hidrógeno mediados por moléculas de agua (Meng y Fütterer, 2008). Conforme a lo anterior, se han identificado algunos residuos conservados en las FTFs involucrados en catálisis y/o interactuando con la unión de fructosa y glucosa dentro de los subsitios -1 (W85, D86, W163, R246 y D247) y +1 (R360, E340, E342 y R246) (numeración en SacB).

Se sabe que los residuos que conforman los subsitios, además de los catalíticos, son los responsables de la especificidad de reacción y del GP de los productos; sin embargo, hasta el momento no existen datos suficientes para poder describir con exactitud el mecanismo de elongación de la cadena de fructana. No obstante, se han propuesto diversos mecanismos para explicarlo: a) **procesivo**, cuando los residuos de la fructosa se agregan uno a uno sucesivamente, implicando que la cadena de fructana permanezca asociada a la enzima hasta que concluye la síntesis y se libera hasta terminada su formación; y b) **no procesivo**, si la cadena se va construyendo mediante la adición de un sólo residuo de fructosa liberándola al medio después de cada adición.

Chambert y col. (1976) plantearon que el mecanismo que siguen las FTFs es de crecimiento no procesivo, ya que mediante determinaciones de peso molecular del aceptor y el producto se observó que prácticamente son del mismo tamaño, descartando así el mecanismo procesivo. Recientemente, Ozimek y col. (2006) propusieron para las FTFs de *Lactobacillus reuteri* 121 la existencia de dos mecanismos de elongación de la cadena dependiendo del producto formado: mecanismo procesivo de la levansacarasa produciendo únicamente polímero de levana; y no procesivo para la inulosacarasa, sintetizando generalmente FOS. Se propone que las FTFs que utilizan mecanismos procesivos poseen una mayor afinidad por las cadenas de polímero en crecimiento que las FTFs con mecanismos no-procesivos. Lo anterior, desde un punto de vista estructural, es debido a la naturaleza y orientación de los aa que se encuentran adyacentes al sitio de unión de la sacarosa.

2.3.4.3. FTFs del género *Leuconostoc* spp.

El grupo de Ingeniería y Tecnología de Enzimas a cargo del Dr. Agustín López-Munguía del Instituto de Biotecnología de la UNAM reportó la existencia de una nueva subfamilia de FTFs provenientes del género *Leuconostoc* que pertenece al grupo de bacterias acidolácticas. Las FTFs de *Leuconostoc* spp. son quimeras naturales ya que el dominio catalítico está flanqueado por regiones con identidad a dominios N-terminal y C-terminal de GTFs, específicamente con la ASR de *L. mesenteroides* NRRL B-1355, además de encontrarse un dominio de unión a glucano (GBD) (Olvera y col., 2007). Entre esta nueva subfamilia se incluyen las levansacarasas LevS, LevC y LevL de *L. mesenteroides* así como a la inulosacarasa IslA de *L. citreum* (Fig. 6).

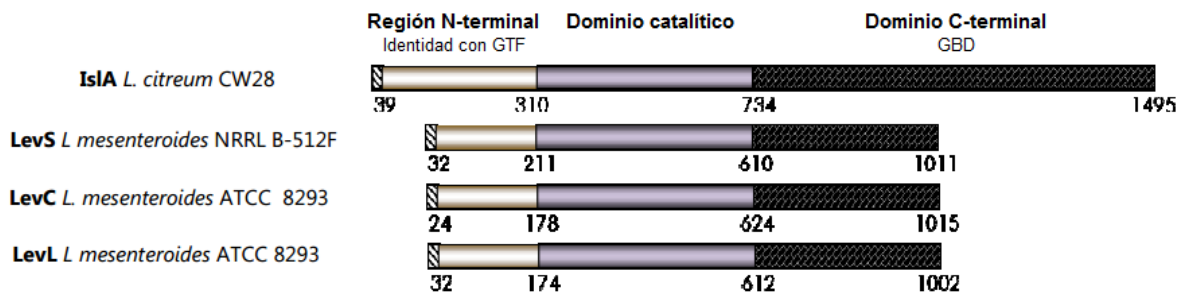


Fig. 6. Esquema de la estructura primaria de las FTFs de *Leuconostoc* spp. Figura modificada de Del Moral y col., 2008.

2.3.4.4. Inulosacarasa IslA de *L. citreum* CW28

Dentro de la nueva subfamilia de FTFs provenientes del género *Leuconostoc*, Olivares-Illana y col. (2002), aislaron una inulosacarasa asociada a células a partir de la cepa *L. citreum* CW28 proveniente del pozol a la cual se le denominó IslA, la FTF bacteriana de mayor tamaño hasta el momento reportada con un peso molecular de 165 kDa. Esta enzima, se concluye, es una quimera debido a que sus dominios N y C-terminal tienen 40 y 80% de identidad respectivamente, con los dominios equivalentes de la ASR de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 (Olivares-Illana y col., 2003). En el dominio N-terminal se encontraron 10 unidades de secuencias de 12 residuos (KDSKVATSDELA) repetidas y ubicadas de forma consecutiva (Olvera y col., 2007). La región variable presenta un 36% de identidad con la región equivalente de la ASR. Respecto al dominio catalítico, éste tiene un 39 y 42% de identidad con la levansacarasa unidominio SacB de *B. subtilis* y la inulosacarasa InuJ de *Lactobacillus johnsonii* NCC533, respectivamente. Finalmente, el C-terminal de 700 aa, contiene tres motivos repetidos tipo A (WYYFNxDGQAATGLQTVDNGxQVKG) (Giffard y Jacques, 1994), además de siete secuencias repetidas APY que sólo se encuentran en la ASR de *L. mesenteroides* NRLL B-1355 pero no en otras enzimas de la familia GH70. Cabe mencionar que IslA no contiene el motivo LPXTG común en la mayoría de las FTFs; sin embargo, incluye módulos GW con identidad con la región de unión a la pared de la amidasa (Ami) de *Listeria monocytogenes* (Cabanes y col., 2002).

Con el objetivo de conocer la función de los dominios adicionales de IslA, Del Moral y col. (2008) construyeron versiones truncadas de esta inulosacarasa (Fig. 7) demostrando que la región C-terminal con alta identidad a ASR no está involucrada con la estabilidad. No obstante, la región N-terminal en conjunto con la de transición es necesaria para estabilizar a la enzima, ya que cuando el dominio catalítico mantiene sólo la región de transición la estabilidad de la enzima disminuye drásticamente provocando la desestabilización de la proteína a 35 °C (Tabla 1).

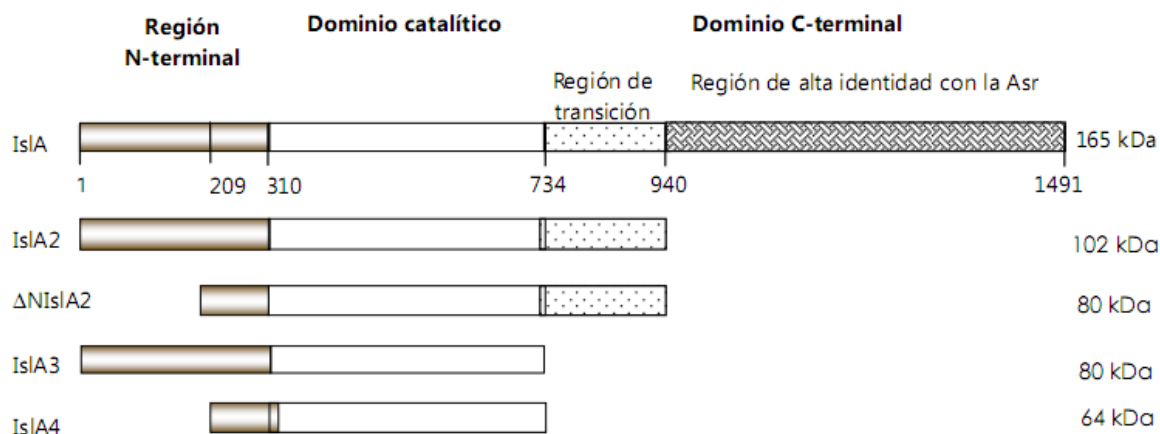


Fig. 7. Esquema de IsIA y versiones truncadas.
Figura tomada de Del Moral y col., 2008.

Los análisis realizados revelaron que todas las formas truncadas retienen la capacidad para producir inulina, lo que demuestra que las regiones eliminadas no influyen en la especificidad de enlace. Sin embargo, al eliminar la región de transición, se observó que aumenta considerablemente la hidrólisis del sustrato en IsIA3 e IsIA4, mientras que la afinidad por el mismo disminuye (Tabla 1). Se propone que la región de transición podría interactuar con el dominio catalítico, afectando la afinidad del sitio activo por el aceptor de fructana en crecimiento, disminuyendo la transferencia si esta región es eliminada.

Tabla 1. Propiedades cinéticas y especificidad de reacción de la inulosacarasa IsIA de *L. citreum* CW28 y versiones truncadas

Enzima	Km ^T (mM)	kcat (s ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Tiempo de vida media a 35°C (min)	H/T (%)
IsIA	38	25	0.65	420	40/60
IsIA2	24	28.19	1.17	407	38/62
ΔNIsIA2	18	29.6	1.64	60	45/55
IsIA3	nd	nd	nd	346	61/39
IsIA4	147	105	0.73	128	70/30

H/T: relación hidrólisis/transferencia. Km^T (Km total) fue determinada por la tasa de consumo de sacarosa. IsIA3 no muestra un comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten. Tabla modificada de Del Moral y col., 2008.

Específicamente destaca la versión IsIA4, que consiste básicamente en el dominio catalítico de IsIA, ya que a diferencia de las demás truncadas no se proteoliza durante el proceso de producción. El principal producto de reacción de esta enzima es el polímero además que es la única versión que también produce FOS en una mínima cantidad, esto

reportado en condiciones de reacción con 292 mM de sacarosa como sustrato y 1 U/mL de enzima.

Con base en los estudios estructura-función con la levansacarasa SacB de *B. subtilis* realizados por Ortiz-Soto y col. (2008), Rodríguez-Alegría y col. (2010) caracterizaron la mutante S425A de IslA4 encontrando que produce exclusivamente FOS con la ventaja adicional de no producir polímero. Sin embargo, resultó menos activa, es decir, la k_{cat} disminuyó casi 50 veces comparada con la enzima silvestre. Así mismo, otro cambio derivado de esta mutación está relacionado con la especificidad de reacción, ya que mientras la enzima IslA silvestre hidroliza un 70% del sustrato, la mutante aumenta su capacidad de transferencia reduciendo la hidrólisis al 52% (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades cinéticas y especificidad de reacción de IslA4 de *L. citreum* CW28 y mutante S425A

Enzima	Km (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	Tiempo de vida media a 35°C (min)	H/T (%)
IslA4	147	105	0.73	128	70/30
IslA4 S425A	125	2.3	0.019	198	52/48

H/T: relación hidrólisis/transferencia. Tabla modificada de Rodríguez-Alegría y col., 2010.

En este proyecto estamos interesados en producir FOS tipo inulina, por lo que la mutante IslA4 S425A es de gran interés para nuestro grupo de trabajo; sin embargo, su aplicación se ve limitada por la baja eficiencia catalítica que presenta.

Una alternativa reportada ampliamente para la recuperación de la actividad catalítica de diversas enzimas es mediante evolución dirigida la cual permite obtener un gran número de variantes estructurales que son subsecuentemente evaluadas ya sea por selección in vivo o por tamizaje in vitro. Esta técnica imita a la evolución molecular ya que genera una gran cantidad de proteínas modificadas, las cuales son sometidas a ciclos sucesivos de mutación y selección hasta encontrar la enzima con la función deseada. Un ejemplo exitoso es el caso de la amilosacarasa de *Neisseria polysaccharea* (van der Veen y col., 2006), donde a partir de un banco de mutantes de 50,000 clonas se identificaron, mediante un escrutinio fenotípico, diversas variantes que incrementaron su actividad polimerasa hasta un 60% comparada con la enzima silvestre.

La realización de evolución dirigida para IsIA4 S425A con el fin de incrementar la actividad no es viable ya que hasta el momento no existe un método de escrutinio para la selección de mutantes sobreproductoras de FOS por lo que la identificación es una limitante importante. Ante esta perspectiva, la primera estrategia propuesta para la producción de FOS consistió en realizar evolución dirigida de la versión truncada IsIA4, con el objetivo de obtener una enzima mutante más activa para la síntesis de polímero ya que fenotípicamente es posible reconocer las mutantes de interés debido a la formación de un fenotipo mucoso alrededor de la colonia relacionado con su mayor actividad catalítica y capacidad transferasa. En caso de que se encontrara esta mutante sobreproductora de polímero, y después de su caracterización, el siguiente paso sería introducir la mutación específica S425A y así entonces, obtener una enzima con alta actividad productora exclusivamente de FOS.

Por otro lado, la ingeniería de reacción juega un papel muy importante en el conocimiento de los factores que afectan la catálisis, permitiendo diseñar condiciones adecuadas para dirigir la reacción hacia un producto de interés específico. En este sentido, la eficiencia de la actividad transferasa está influenciada por diversos factores entre los que se encuentran la presencia de solventes orgánicos, temperatura, concentración inicial de sustrato y enzima, entre otros (Falconer y col., 2011). Existen numerosos estudios donde se reporta que al incrementar la concentración de sacarosa inicial, se aumenta la actividad transferasa y se reduce la hidrolasa. Es por ello que la segunda estrategia propuesta para la síntesis de FOS tipo inulina con la inulosacarasa IsIA4 fue manipular las condiciones de reacción para incrementar la eficiencia de transglucosilación. Una vez logrado lo anterior, se identificaron los productos de transfructosilación obtenidos.

3. JUSTIFICACIÓN

Existe un gran interés por desarrollar métodos adecuados para la síntesis de polímeros de fructosa y especialmente FOS, debido a sus propiedades prebióticas así como a otras aplicaciones en diversas áreas. Para este fin, las enzimas derivadas de bacterias lácticas, como la inulosacarasa IslA4 proveniente de *L. citreum*, son opciones adecuadas dada su inocuidad, origen (productos naturales fermentados) y especificidad.

4. HIPÓTESIS

Es posible modular la especificidad de reacción de la inulosacarasa IslA4 de *L. citreum* para lograr una síntesis eficiente de FOS a partir de sacarosa.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Obtener FOS tipo inulina a partir de sacarosa utilizando la inulosacarasa IslA4 de *L. citreum* como biocatalizador.

5.2. Específicos

5.2.1. Evolución dirigida de proteínas

- Realizar evolución dirigida de la versión truncada IslA4 mediante la técnica de PCR propensa a error.
- Seleccionar clonas sobreproductoras de polímero mediante el fenotipo mucoide característico de las colonias.
- Expresar el gen así como purificar y caracterizar la enzima mutante sobreproductora de polímero.

- Realizar la mutación específica S425A y determinar si se genera un cambio en la especificidad hacia la eficiente producción de FOS.

5.2.2. Ingeniería de reacción

- Determinar la especificidad de reacción y la productividad en función de la concentración de sustrato y enzima.
- Identificar el perfil de productos sintetizados por IslA4 bajo las condiciones de reacción probadas.
- Cuantificar los productos de reacción.
- Realizar un análisis comparativo con la enzima silvestre IslA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Las cepas utilizadas en este estudio se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este estudio

Cepa	Genotipo
BL21	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S)
C41	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻)(DE3)
C41pGRO	*
C41pRARE	*
C41pRIL	*
C43	F ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻)(DE3)
C43pRARE	*
C43pRIL	*
DH5α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), λ-
MC1061	F ⁻ Δ(<i>ara-leu</i>)7697 [<i>araD139</i>] _{B/r} Δ(<i>codB-lacI</i>)3 <i>galK16 galE15</i> λ ⁻ e14 ⁻ <i>mcrA0 relA1 rpsL150</i> (Str ^R) <i>spoT1 mcrB1 hsdR2</i> (r ⁻ m ⁺)
Rosetta I	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> pRARE (Cam ^R)
Rosetta II	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> pRARE2 (Cam ^R)
TG1 (Lucigen)	F ⁻ [<i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> ΔM15] <i>supE thi-1</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ(<i>mcrB-hsdSM</i>)5, (r _K ⁻ m _K ⁻)
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 λ⁻ nupG</i>
XL1Blue (Invitrogen)	<i>endA1 gyrA96</i> (nal ^R) <i>thi-1 recA1 relA1 lac glnV44</i> F ⁻ [<i>::Tn10</i> <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15] <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺)

*Genotipo por confirmar.

6.2. Medios y condiciones de cultivo

Para el crecimiento de las diversas cepas utilizadas se empleó medio Luria Bertani (Tabla 4) a 37°C con agitación constante durante 12 h. Para las cepas Rosetta I y II, C41pRIL, C43pRIL, C41pgro, C43pRARE y C41pRARE se suplementó con cloranfenicol (30 µg/mL).

Tabla 4. Composición de medio Luria Bertani (LB)

Reactivo	Concentración (g/L)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

La recuperación de las células después de la transformación se llevó a cabo en medio líquido SOC (Tabla 5).

Tabla 5. Composición de medio SOC

Reactivo	Concentración (g/L)
Triptona	20.0
Extracto de levadura	5.0
NaCl	0.5
KCl	0.187
MgCl ₂	1.11
MgSO ₄	1.20
Glucosa	3.6

6.3. Técnicas de biología molecular

6.3.1. Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se extrajo con el Kit *High Pure Plasmid Isolation* marca Roche siguiendo las indicaciones del proveedor a partir de cultivos crecidos durante 12 h en medio LB adicionado con el antibiótico requerido.

6.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa propensa a error (EP-PCR)

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados con el Software *Sci Ed Central Clone Manager 1.3* y sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM (Tabla 6). Todos los oligonucleótidos se diluyeron hasta una concentración final de 10 μ M antes de utilizarlos.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *islA4*

	Longitud (b)	Secuencia (5'→3')	PM (g/mol)
Oligo (<i>Nde</i> I) Forward	20	CGGCAGCC <u>CATATG</u> ACTAGTG	6465
Oligo (<i>Xho</i> I) Reverse	20	GGTGGTGCT <u>TCGAGT</u> TATTCAA	6511

Para el banco de mutantes, los fragmentos de ADN se amplificaron por medio de EP-PCR, utilizando el kit *Diversify PCR Random mutagenesis* marca Clontech el cual consiste en realizar la PCR bajo condiciones que reducen la fidelidad de la incorporación de nucleótidos, además permite ajustar la reacción para generar diferente número de mutaciones desde 2.0 hasta 8.1 por cada 1,000 pb. Se utilizó la construcción pET28b(+)-*isIA4* previamente purificada como molde diluyendo hasta una concentración de 1 ng/ μ L según las especificaciones del kit. El volumen final de reacción fue de 50 μ L como se describe en la Tabla 7, se utilizaron las condiciones de mutagénesis denominadas A, B, C y D que generan 2.3, 2.7, 4.8 y 8.1 mutaciones por cada 1,000 pb, respectivamente. Las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 8. Las reacciones se realizaron en el termociclador *Touchgene Gradient*. El tiempo de elongación se seleccionó de acuerdo a la longitud del fragmento amplificado de ADN, tomando en cuenta que para cada 1,000 pb se requiere de un tiempo de extensión de 1 min.

Tabla 7. Componentes para la reacción (μ L) de EP-PCR según kit *Diversify PCR Random Mutagenesis*

Condición	A	B	C	D
Número de mutaciones por cada 1,000 pb	2.3	2.7	4.8	8.1
H ₂ O grado PCR	39	38	35	32
10X TITANIUM <i>Taq</i> Amortiguador	5	5	5	5
MnSO ₄ (8 mM)	1	2	4	4
dGTP (2 mM)	1	1	2	5
50X Diversify dNTP Mix	1	1	1	1
Primer mix	1	1	1	1
ADN Molde	1	1	1	1
TITANIUM <i>Taq</i> polimerasa	1	1	1	1
Volumen total (μL)	50	50	50	50

Tabla 8. Condiciones de amplificación según kit *Diversify PCR Random Mutagenesis*

No de ciclos	Etapas	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	Desnaturalización	0.5	94
	Desnaturalización	0.5	94
30	Alineamiento	1	68
	Extensión	2	68

Además de utilizar el kit, también se realizó PCR mutagénica según lo reportado por Cadwell y Joyce (1992) con y sin MnCl₂ según la Tabla 9. Las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 10.

Tabla 9. Componentes para la reacción de PCR control, con Manganeso (alta mutagenicidad) y sin Manganeso (baja mutagenicidad) según Cadwell y Joyce (1992)

	Control (μL)	Cadwell y Joyce con MnCl_2 (μL)	Cadwell y Joyce sin MnCl_2 (μL)
Amortiguador 10x	5	5	5
dNTPs desbalanceados	5	5	5
Molde (<i>isLA4</i>)	2	1	1
Oligo Forward	3	4	4
Oligo Reverse	3	4	4
MgCl_2 (50mM)	-	5	5
Taq polimerasa	5	5	5
MnCl_2 (5mM)	-	5	-
Agua tetradestilada	27	16	21
Volumen total (μL)	50	50	50

Tabla 10. Condiciones de amplificación según Cadwell y Joyce (1992)

No de ciclos	Etapas	Tiempo (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
1	Desnaturalización	2	94
	Desnaturalización	0.5	94
30	Alineamiento	0.5	55
	Extensión	2	72

6.3.3. Análisis de ADN en gel de agarosa

Para el análisis de ADN, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1x. Se mezclaron de 1 a 5 μL de las muestras a analizar con 2 μL de amortiguador de carga. La electroforesis se llevó a cabo en amortiguador TAE 1x a 100 mV durante 45 min aproximadamente. Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio 0.02% y se destiñeron en agua destilada. La visualización de las bandas se llevó a cabo en el transiluminador UVP MiniDarkroom con el software LabWorks Version 4.5.00.

6.3.4. Purificación de ADN

Para los experimentos de clonación, los productos de PCR se purificaron por banda con el Kit *Gene Jet extraction Kit* marca Fermentas siguiendo las indicaciones del

proveedor. Posteriormente, se realizó un gel de agarosa para verificar la presencia y pureza del producto de PCR.

6.3.5. Clonación de inserto *islA4* mutagénico en pET28b(+) y pT4

El gen *islA4* mutagénico proveniente de la PCR con el kit *Diversify PCR Random Mutagenesis* se clonó en el vector pET28b(+) bajo el control del promotor T7 (NOVAGEN) y fusionado con 6 histidinas en el amino terminal. El plásmido cuenta con un gen de resistencia a kanamicina e inducción por IPTG, análogo de la alolactosa, que induce la transcripción del operón lac. Las digestiones enzimáticas tanto del inserto como del plásmido se realizaron con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* a 37 °C durante 12 h (Tabla 11). A la digestión del vector pET28b(+) se agregó 1 µL de fosfatasa alcalina de intestino de carnero (CIP) para la desfosforilación de extremos 5'P para evitar autoligación, y se incubó durante 1 h más.

Tabla 11. Condiciones para las digestiones enzimáticas del plásmido y del inserto mutagénico

	pET28b(+) (µL)	Inserto (µL)
ADN*	50	50
Amortiguador 4	6	6
<i>NdeI</i>	2	2
<i>XhoI</i>	2	2
Volumen total (µL)	60	60

* El volumen de ADN a añadir, tanto de inserto como de vector, se determina a partir de electroforesis en gel de agarosa, depende de la intensidad y tamaño de la banda obtenida.

Posteriormente, se realizó la purificación de las digestiones por banda con el kit *Gene Jet extraction Kit* marca Fermentas y se analizaron los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez purificados tanto inserto como vector, se llevó a cabo la ligación con la enzima T4 ADN ligase (*New England Biolabs*) utilizando una relación molar inserto:vector 3:1 incubando a 16 °C durante 12 h (Tabla 12).

Tabla 12. Condiciones para la ligación con pET28b(+) en relación 3:1*

	Control (μL)	Ligación (μL)
Vector (5,369 pb)	3	3
Inserto (1,623 pb)	0	1.2
Amortiguador T4	2	2
Ligasa T4	1	1
Agua	14	12.8
Volumen total (μL)	20	20

*Considerando que el producto de PCR tiene una concentración de 50 ng/ μL y el vector de 20 ng/ μL .

Después de realizar la ligación y desactivar la enzima a 75°C/10 min, la ligación se purificó agregando 500 μL de butanol, agitando en vórtex durante 30 s, seguido de centrifugación durante 10 min a 21,130 x g usando una centrífuga marca Eppendorf modelo 5424. En el fondo del tubo eppendorff se observó un precipitado blanco, se eliminó con la micropipeta el excedente de butanol y por último se secó al vacío en SAVANT a 65°C hasta evaporar por completo el butanol. Finalmente, se agregaron 10 μL de agua tetradestilada estéril para disolver la ligación. Cabe mencionar que además de la relación 3:1, también se probaron relaciones 1.5:1 y 4.5:1.

Por otro lado, el gen *islA4* mutagénico proveniente de la PCR con las condiciones de Cadwell y Joyce (1992) se clonó en el vector pT4 que tiene un tamaño de 2,500 pb y es derivado del pET28b(+). La ligación se realizó durante 12 h a 16 °C según las condiciones mostradas en la Tabla 13. Posteriormente, la ligación se purificó según lo mencionado anteriormente.

Tabla 13. Condiciones para la ligación con pT4 en relación 3:1*

	Control (μL)	Producto de PCR c/ MnCl_2 (μL)	Producto de PCR s/ MnCl_2 (μL)
Vector (2,500 pb)	2	2	2
Inserto (1,623 pb)	0	4	4
Amortiguador T4	2	2	2
Ligasa T4	1	1	1
Agua	15	11.4	11.4
Volumen total (μL)	20	20	20

*Considerando que el producto de PCR con MnCl_2 tiene una concentración de 40 ng/ μL y sin MnCl_2 de 100 ng/ μL así como el vector de 50 ng/ μL .

6.3.6. Clonación de *isIA4* mutagénico en pJET1.2/blunt

Los productos de EP-PCR obtenidos con el kit *Diversify PCR Random Mutagenesis* de la condición A se clonaron también en el vector de clonación pJET1.2/blunt (2,974 pb) el cual es altamente eficiente para productos de PCR generados con diversas ADN polimerasas incluyendo la *Taq*. Entre las ventajas de este vector encontramos que contiene un gen letal que es interrumpido por la ligación del inserto en el sitio de ligación, por lo que teóricamente sólo las células transformadas con el inserto crecen. Para realizar la clonación en pJET1.2/blunt primeramente los extremos pegajosos con los que se generan los fragmentos de PCR deben volverse romos. Para este fin se realizó la reacción mostrada en la Tabla 14.

Tabla 14. Reacción blunting

Componente	µL
Amortiguador de reacción 2X	10
Producto de PCR no purificado o previamente purificado*	3
H ₂ O	4
Enzima blunting	1
Volumen total (µL)	18

*Considerando el tamaño de *isIA4* (1,500 pb) agregar 100 ng.

Posteriormente se agitó en vórtex y se centrifugó durante 3-5 s. Se incubó la mezcla a 70 °C durante 5 min. Para realizar la ligación, se adicionaron 1 µL del vector de clonación pJET1.2/blunt y 1 µL de ligasa T4, se agitó en vórtex brevemente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Una vez transcurrido este tiempo, se purificó la ligación adicionando un volumen igual de cloroformo y se mezcló bien. Luego, se centrifugó durante 3 min a 21,130 x g usando una centrífuga marca Eppendorf modelo 5424. Se transfirió la fase acuosa superior a un tubo limpio y se utilizó para la transformación en células quimiocompetentes de *E. coli* XL1Blue y en electrocompetentes de *E. coli* DH5a y XL1Blue.

6.3.7. Transformación en *E. coli*

Para los bancos, las cepas de *E. coli* DH5 α , TG1, XL1Blue y MC1061 se transformaron por electroporación con las ligaciones de las diversas condiciones de mutagénesis con un aparato Micropulser Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se colocaron 2 μ L de cada ligación pura con 60 μ L de células electrocompetentes (recién preparadas) en una celda de 0.2 mm. Posteriormente, las células se recuperaron en medio SOC (Tabla 5) y se incubaron durante 1 h a 37 °C con agitación constante. Una vez transcurrido este tiempo, las células se plaquearon en cajas petri con medio LB-agar y kanamicina (50 μ g/mL) y se incubaron a 37° C durante 16 h. Además de células electrocompetentes, se utilizaron células quimiocompetentes de *E. coli* XL1Blue (10^8), adicionando 5 μ L de la ligación a 200 μ L de células e incubando por 30 min en hielo, 45 s a 42 °C y por último 2 min en hielo. Se recuperaron en 500 μ L de medio SOC (Tabla 5) y se incubó durante 1 h a 37 °C con agitación constante; posteriormente, se plaquearon en cajas petri con medio LB-agar y kanamicina (50 μ g/mL). Para las construcciones en pJET1.2/blunt el antibiótico utilizado fue ampicilina (200 μ g/mL).

6.3.8. Selección de clonas positivas

Se seleccionaron 10 clonas de cada condición de mutación con el objetivo de corroborar la presencia del inserto en el plásmido. Se llevó a cabo la extracción de plásmido con el Kit *High Pure Plasmid Isolation* marca Roche. Posteriormente, se realizó la digestión con *NdeI* y *XhoI* para comprobar que efectivamente se encontrara clonado el inserto *isIA4*. Respecto a la clonación en pJET1.2/blunt se realizó la digestión con *PstI* esperando un tamaño de 4,600 pb en caso que contenga el inserto *isIA4* mutagénico.

6.4. Expresión de *isIA4*

Las siguientes cepas fueron utilizadas para la producción de IsIA4 con el objetivo de encontrar las mejores condiciones de expresión: C41, C43, Rossetta I, Rossetta II,

C43pRIL, C41pRIL, C41pgro, C43pRARE, C41pRARE y BL21. Una colonia de cada cepa transformada con la construcción pET28b(+)-*islA4* (según protocolo descrito anteriormente) se inoculó en 50 mL de medio LB adicionado con kanamicina (50 µg/mL) o en el caso específico kanamicina/cloranfenicol (50/30 µg/mL, respectivamente) en matraces de 250 mL. Los cultivos se realizaron a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una OD_{600nm} = 0.6. Una vez alcanzada esta OD, los cultivos fueron inducidos con IPTG a una concentración final de 0.2 mM, a diferentes temperaturas y tiempos de inducción (mencionado más adelante). Las células fueron colectadas mediante centrifugación a 2,500 x g usando una centrífuga marca Beckman Coulter modelo Allegra X-22R durante 10 min a 4°C; posteriormente, se lavaron dos veces con 1.5 mL amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 adicionado con 1 mM de CaCl₂. Una vez realizados los lavados, las células se lisaron con 500 µL de una solución de lisozima 1 mg/mL adicionada con un cóctel de inhibidores de proteasas denominado *Complete* marca Roche (se disolvió una tableta en 5 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 adicionado con 1 mM de CaCl₂) así como *Pepstatina* marca Roche (concentración final de 0.7 µg/mL). Las células se congelaron y descongelaron tres veces consecutivas, posteriormente se sonicaron con 4 pulsos de 10 s y descansos de 30 s a una amplitud de 40%. El sobrenadante (extracto enzimático) se recuperó por centrifugación a 21,130 x g usando una centrífuga marca Eppendorf modelo 5424 durante 5 min y fue utilizado para los ensayos de actividad enzimática y cuantificación de proteína.

6.5. Expresión de *islA*

Una colonia de la cepa *E. coli* TOP10 transformada con la construcción pBAD/TOPO-*islA* se inoculó en 50 mL de medio LB adicionado con ampicilina (200 µg/mL). Los cultivos se realizaron a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una OD_{600nm} = 0.6. Una vez alcanzada esta OD, se realizó la inducción con arabinosa a una concentración final de 0.02 % (w/v). El extracto enzimático se obtuvo de la misma manera que para *IslA4*.

6.6. Técnicas enzimáticas y bioquímicas

6.6.1. Determinación de la actividad enzimática

La actividad FTF se determinó mediante la cuantificación de azúcares reductores liberados mediante la técnica de DNS (Miller, 1959). La reacción enzimática se llevó a cabo en presencia de 292 mM de sacarosa en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 adicionado con 1 mM de CaCl_2 a una temperatura de 30°C en un volumen de reacción de 600 μL . Los azúcares reductores se determinaron midiendo la absorbancia a 540 nm. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que libera un μmol de azúcares reductores medidos como glucosa por min. Los ensayos se realizaron por duplicado.

6.6.2. Purificación de IslA4

La versión truncada IslA4 se purificó por medio de cromatografía de afinidad con la resina Ni-NTA marca Qiagen siguiendo las siguientes indicaciones. La resina se equilibró con el amortiguador de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM pH 7.0) según el protocolo de Qiagen. El extracto celular fue diluido 1:1 con el amortiguador de lisis e incubado durante 12 h a 4 °C con la resina equilibrada. Se lavó con 8 volúmenes de amortiguador de lavado A (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM pH 7.0), 4 volúmenes de amortiguador de lavado B (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 60 mM pH 7.0) y 4 volúmenes de amortiguador de lavado C (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 100 mM pH 7.0). La proteína se eluyó con 4 volúmenes del amortiguador de elución (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM pH 7.0). Posteriormente, las proteínas fueron dializadas contra amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 adicionado con 1 mM de CaCl_2 durante 12 h. Luego, se concentró mediante ultrafiltración con una membrana con corte molecular de 10 kDa.

6.6.3. Cuantificación de proteína

La determinación de proteína total del extracto enzimático se realizó mediante el método de Bradford (1976), utilizando el kit Bio-Rad (Hercules, CA) y una curva de seroalbúmina bovina (BSA) como estándar. Los ensayos se realizaron por duplicado.

6.6.4. Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron analizadas por electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida al 10%. Los extractos enzimáticos a analizar se mezclaron con amortiguador de carga que contiene 0.125 M tris-Cl pH 6.8, 4% SDS (w/v), 10% glicerol (v/v), 10% de β -mercaptoetanol (v/v) y azul de bromofenol 0.05% (w/v) y se hirvieron durante 5 min. Se cargó el gel con 50 μ g de proteína total. La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA durante aproximadamente 1 hora y media. Los geles fueron teñidos con solución de azul de Coomassie 0.125% marca Thermo Scientific y desteñidos durante 12 h en agua.

6.7. Ensayos de producción de FOS

Las reacciones se llevaron a cabo empleando 1, 5 y 10 U/mL de enzima Isla4 así como concentraciones de sacarosa de 292, 1170 y 2046 mM (100, 400 y 700 g/L, respectivamente) en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 adicionado con 1 mM de CaCl_2 y a una temperatura de 30°C. La reacción se detuvo sometiendo las reacciones a ebullición durante 10 min para inactivar la enzima. Por otro lado, las reacciones con Isla se llevaron a cabo empleando 1 U/mL de enzima y concentraciones de sacarosa de 292, 1170 y 2046 mM (100, 400 y 700 g/L, respectivamente) en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 adicionado con 1 mM de CaCl_2 y a una temperatura de 30°C. La reacción se detuvo como se mencionó anteriormente.

6.8. Identificación y análisis de productos de reacción

6.8.1. Determinación de la especificidad de reacción

Las muestras obtenidas de las reacciones se analizaron en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) marca Waters con un detector de índice de refracción (Waters 410), columna de sílica aminada “Prevail Carbohydrate ES” (250 x 4.6 mm) a una temperatura de 30°C. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/agua en relación 75:25 (v/v) a un flujo de 1.0 mL/min.

Para determinar la especificidad de reacción hacia hidrólisis y transferencia, se determinó la cantidad de glucosa y fructosa liberada a partir de la sacarosa. La cantidad de glucosa libre (Gf) refleja la actividad total proveniente tanto de las reacciones de hidrólisis como de transferencia. Por lo tanto, sustrayendo la fructosa libre (Ff), producida como resultado de la actividad hidrolítica, de la glucosa libre obtenemos la fructosa involucrada en la transferencia ($F_t = G_f - F_f$).

Para la cuantificación del polímero se realizó una curva estándar de inulina liofilizada. El contenido de fructosa incorporada a polímero (F_{POL}) se calculó considerando que tiene un tamaño de 3,000 kDa. Posteriormente, se calculó de manera indirecta la cantidad de fructosa incorporada a FOS (F_{FOS}) mediante $F_{FOS} = F_t - F_{POL}$. Para corroborar la cantidad de fructosa total, se realizó la hidrólisis total a fructosa de los productos empleando la enzima comercial Fructozyme L de Novozyme constituida por una mezcla de 10 % de la endoinulinasa de *Aspergillus niger* y 90% de la exoinulinasa de *B. stearothermophilus*.

6.8.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

Los productos de reacción, diluidos 1:5 con agua destilada, fueron analizados mediante TLC utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel 60 marca Merck y como fase móvil una solución de etanol, butanol y agua en una relación 15:9:6 (v/v). Las

placas fueron eluidas tres veces y reveladas con una solución alcohólica de α -naftol y calor. Como estándares se utilizó una mezcla de fructosa, glucosa y sacarosa, 1-kestosa, nistosa y f-nistosa.

6.8.3. Precipitación de polímero

La inulina se recuperó mediante precipitación con 2 volúmenes de etanol 96% seguido de una centrifugación a 2,500 x g usando una centrífuga marca Beckman Coulter modelo Allegra X-22R durante 30 min. El pellet fue resuspendido en agua MilliQ y se dializó durante 12 h a 4°C para eliminar restos de glucosa, fructosa y sacarosa. Posteriormente, se liofilizó y almacenó para su posterior análisis por GPC.

6.8.4. Cromatografía de permeación en gel (GPC)

Para determinar la distribución de peso molecular de los productos de reacción se analizaron mediante GPC en HPLC marca Waters con un detector de índice de refracción (Waters 410) en un sistema de columnas conectadas en serie Ultrahydrogel Linear (7.8x300mm) y Ultrahydrogel 500 (7.8x300mm) con un índice de exclusión entre 0.5 y 10,000 kDa a una temperatura de 30°C. Como fase móvil se utilizó nitrato de sodio 0.1 M a un flujo de 0.8 mL/min. Las muestras se inyectaron sin dilución alguna.

6.8.5. Cromatografía de intercambio aniónico con detección de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)

Para identificar los FOS producidos, las reacciones con 292 mM de sacarosa se diluyeron 1:100 y las de 1170 y 2046 mM de sacarosa a una dilución 1:200. Posteriormente se sonicaron y se analizaron mediante HPAEC-PAD en un equipo Dionex equipado con un detector electroquímico/amperométrico (ED50-Dionex) y utilizando una columna CarboPac PAD-100 (2x250 mm). La columna fue equilibrada a 30°C con 150 mM de NaOH a un flujo de 0.5 mL/min. Como estándares se utilizaron glucosa, fructosa, sacarosa, 1-kestosa, 6-kestosa, neokestosa, nistosa y f-nistosa.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Primera parte: evolución dirigida de la versión truncada *IsIA4*

7.1.1. PCR propensa a error

En primera instancia decidimos realizar evolución dirigida con el fin de obtener una variante con alta actividad catalítica de la versión truncada *IsIA4* que conserva la capacidad para producir inulina. Para ello se realizó la PCR propensa a error empleando el kit de *Diversify PCR Random Mutagenesis* con las condiciones A, B, C y D mostradas en la tabla 6. En el gel de agarosa se observó el fragmento correspondiente a *isIA4* para las condiciones B, C y D (Fig. 8). En cuanto a la PCR realizada con las condiciones de Cadwell y Joyce (1992), tanto con $MnCl_2$ y sin $MnCl_2$, también se observó el fragmento correspondiente al tamaño de *isIA4* (datos no mostrados).

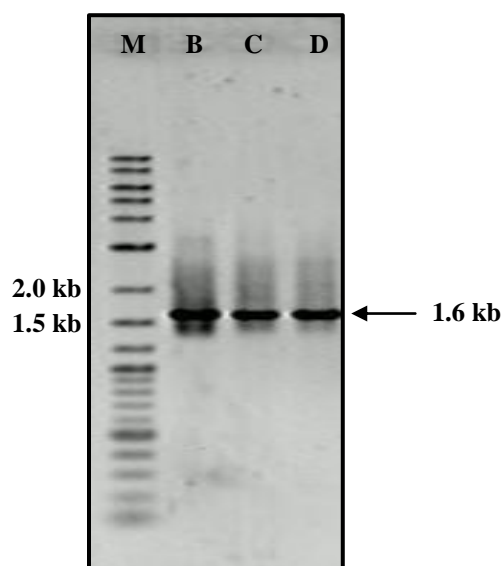


Fig. 8. Gel de agarosa al 1% que muestra el inserto *isIA4* obtenido bajo las condiciones de mutagénesis B, C y D. M = Marcador.

7.1.2. Clonación de inserto *isIA4* mutagénico en pET28b(+) y pT4

Una vez obtenidos el inserto *isIA4* mutagénico (con el kit *Diversify PCR Random Mutagenesis*) y el vector pET28b(+) purificados y digeridos, se clonó y transformaron las

cepas mencionadas en la sección de Materiales y Métodos. Se obtuvieron transformantes de las condiciones A, B y C en las cepas *E. coli* DH5 α , *E. coli* TG1 y *E. coli* XL1Blue, respectivamente. Cabe mencionar que respecto a la condición D (8.1 mutaciones por cada 1,000 pb) no se obtuvieron transformantes para ninguna de las cepas utilizadas.

Para comprobar si se había realizado la clonación del inserto, se extrajo el plásmido de las condiciones en que se obtuvieron transformantes y se realizó el patrón de restricción con *Nde*I y *Xho*I observándose que en ninguno de los casos se encontraba el inserto presente. Es importante mencionar que se realizaron todos los controles, y los ensayos se repitieron al menos 3 veces. Además, se corroboró que las enzimas *Nde*I, *Xho*I y ligasa funcionaran correctamente realizando digestiones del pET28b(+) con el gen *isLA4* silvestre.

Posteriormente, se decidió trabajar con el vector pT4 ligado al gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) para clonar el inserto *isLA4* mutagénico obtenido con las condiciones de Cadwell y Joyce (1992) y probar también el vector pET28b(+) con el inserto de la GFP. Después de realizar la digestión de pT4-GFP y pET28b(+)-*isLA4* con *Nde*I y *Xho*I, se realizaron las construcciones mostradas en la Tabla 15 y se transformaron en *E. coli* MC1061. Como controles se religaron las construcciones originales pT4-GFP y pET28b(+)-*isLA4*. El número de colonias obtenidas también se reporta en la Tabla 15.

Tabla 15. Número de clonas obtenidas en diversas construcciones*

Construcción	No. colonias
pET28b(+) control	--
pET28(+)- <i>isLA4</i>	4
pET28(+)- <i>isLA4</i> mutagénico	--
pET28(+)-GFP	20
pT4 control	7
pT4- <i>isLA4</i>	24
pT4- <i>isLA4</i> mutagénico	11
pT4-GFP	400

*Ver Materiales y Métodos

Se encontró que la construcción pT4-GFP fue la que dio lugar al mayor número de transformantes (400 clonas encontradas). Sin embargo, de la construcción pT4-*isIA4* sólo se obtuvieron 24 colonias, así mismo, cuando se ligó este plásmido con el inserto *isIA4* mutagénico disminuyó a 11. Al comparar estos resultados con los obtenidos con pET28b(+), se constata que el número de transformantes disminuyó dramáticamente, ya que con la construcción pET28b(+)-GFP sólo se obtuvieron 20 colonias, 4 con pET28b(+)-*isIA4* y ninguna con la construcción pET28b(+)-*isIA4* mutagénico.

Se llevó a cabo la extracción de plásmido de las 11 colonias con la construcción pT4-*isIA4* mutagénico y posteriormente se analizó el patrón de restricción, encontrando que nuevamente el inserto no había sido clonado, ya que sólo se observó la presencia del vector.

Los resultados mencionados muestran que existen dificultades para clonar inherentes tanto al vector pET28b(+) como al inserto *isIA4* mutagénico, por lo que se requiere llevar a cabo estudios más extensos y detallados con el fin de encontrar las causas que dificultan la clonación que impidieron obtener el banco de mutantes sobreproductoras de polímero.

7.1.3. Clonación de *isIA4* mutagénico en pJET1.2/blunt

En la búsqueda de estrategias para clonar el inserto *isIA4* mutagénico, también se realizaron ensayos con el vector pJET1.2/blunt. Se obtuvieron transformantes en *E. coli* XL1Blue y se realizó la extracción del plásmido de 10 colonias seleccionadas al azar. Sin embargo, al analizar el patrón de restricción con la enzima *Pst*I se observó un patrón que sólo corresponde al vector ya que en el gel de agarosa se observó una banda única de aproximadamente 3,000 pb, es decir el tamaño del vector.

Dada la imposibilidad experimental para cumplir con la primera de las estrategias propuestas en este proyecto, se intensificó el esfuerzo por lograr un proceso eficiente de síntesis de FOS explorando el efecto de las condiciones de reacción (concentración de sustrato y enzima *IsIA4*).

7.2. Segunda parte: ingeniería de reacción

7.2.1. Sobreexpresión y purificación de IslA4

Dado que el proceso depende de la disponibilidad de enzima, se buscó primeramente obtener las condiciones de mayor producción. Para aumentar la expresión del gen que codifica para la enzima IslA4 y obtenerla en la fracción soluble, se probó la expresión en las cepas de *E. coli* mencionadas en la sección de Materiales y Métodos. Se observó mediante SDS-PAGE de las fracciones solubles que en la cepa de *E. coli* BL21 hay una mayor expresión comparada con las otras 9 cepas probadas en las cuales no hubo expresión importante (Fig. 9). Al llevar a cabo la medición de actividad volumétrica y específica, encontramos que para la cepa *E. coli* BL21 se obtienen 588.5 U/L de fermentación con una actividad específica de 3.1 U/mg de proteína. Dada la diferencia cuantitativa de actividad volumétrica y específica en la fracción soluble con respecto al resto de las cepas, se decidió continuar trabajando con *E. coli* BL21.

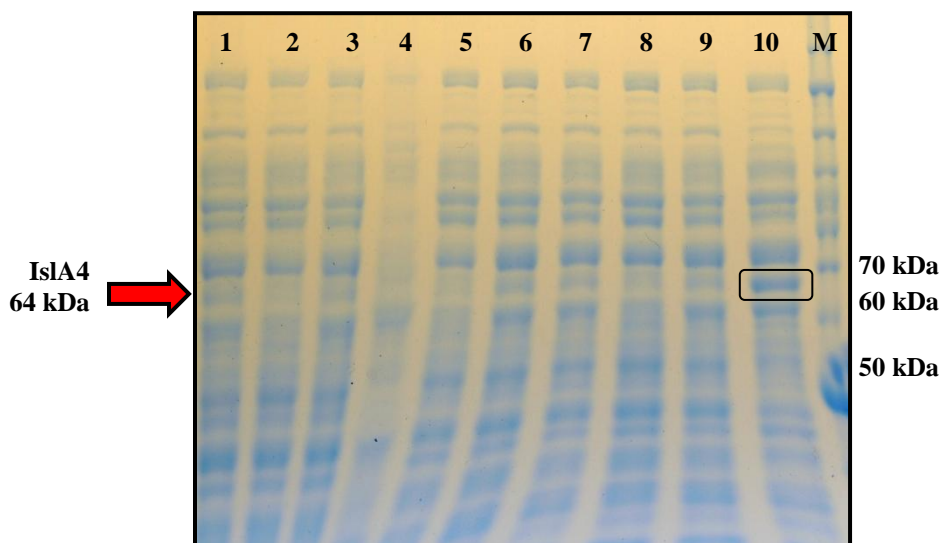


Fig. 9. Gel de SDS-PAGE de extractos enzimáticos obtenidos probando diferentes cepas de *E. coli*. 1) C41, 2) C43, 3) Rosetta I, 4) Rosetta II, 5) C43pRIL, 6) C41pRIL, 7) C41pgro, 8) C43pRARE, 9) C41pRARE, 10) BL21 y M) Marcador de peso molecular.

Posteriormente, se realizaron ensayos de expresión a 18 °C a diferentes tiempos de inducción y se observó que a medida que aumenta el tiempo de inducción (de 2 a 8 h), la proteína contenida en la fracción soluble precipita, provocando la formación de cuerpos de inclusión que se pueden observar claramente entre los restos celulares (datos no mostrados). Se realizó la medición de actividad volumétrica y específica del extracto enzimático obtenido después de 2, 4, 6, 8 y 24 h de inducción, observándose que existe una mayor cantidad de enzima soluble después de 6 h de inducción, equivalente aproximadamente a 1.5 veces más enzima que la obtenida a tiempos menores de inducción, lográndose alcanzar 1089.6 U/L de fermentación. Por otro lado, la mayor actividad específica se obtuvo entre las 4 y 6 h de inducción, siendo correspondiente a 5.5 U/mg de proteína. En conclusión, de las distintas cepas de *E. coli* probadas para la expresión de *islA4*, la cepa BL21 permite obtener los más altos niveles de enzima en la fracción soluble bajo las condiciones de inducción a 18°C durante 6 h.

Una vez determinadas las condiciones de cultivo en las que el gen que codifica para la enzima IslA4 es expresado adecuadamente permitiendo, dentro de las condiciones exploradas, la obtención de la más alta actividad en la fracción soluble, se llevó a cabo la purificación de la enzima mediante cromatografía de afinidad a níquel utilizando la etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal de IslA4 fusionadas durante la clonación. En la Fig. 10 se presenta el gel de SDS-PAGE en el cual se puede observar la banda de proteína en las fracciones que se obtienen mediante los lavados realizados con imidazol en concentraciones crecientes hasta obtener la proteína pura. Se cuantificó la actividad específica únicamente de la proteína pura (carril 9) y se encontró que el factor de purificación logrado fue de 17, al compararla con la actividad específica del extracto enzimático (Tabla 16).

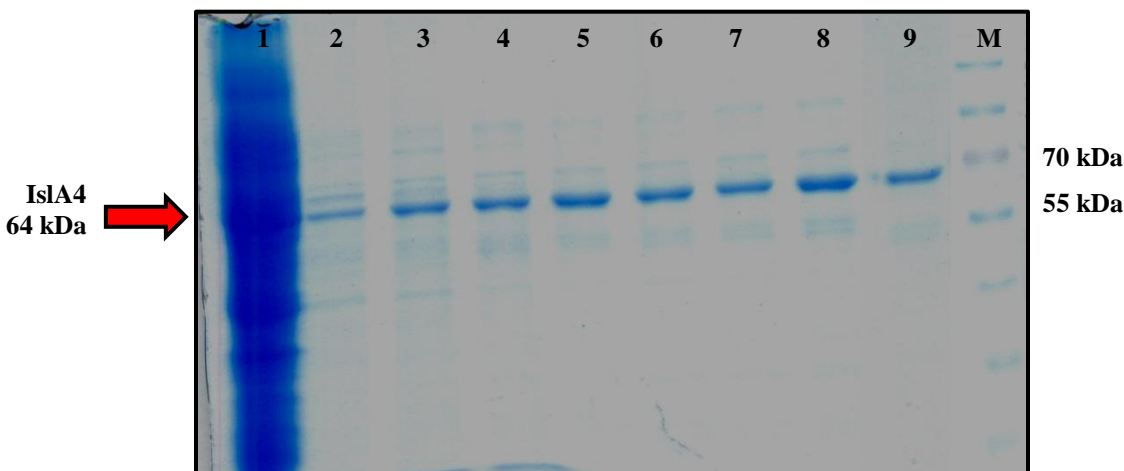


Fig. 10. Gel de SDS-PAGE de Isla4 en diversas etapas del proceso de purificación. 1) Extracto enzimático, 2 y 3) lavados con 60mM de imidazol; 4, 5, 6 y 7) lavados con 100 mM de imidazol, 8) lavado con 150 mM; 9) Enzima pura y M) Marcador de peso molecular.

Tabla 16. Balance global del proceso de purificación de Isla4 producida en *E. coli* BL21 a partir de un cultivo de 1 L*

Fracción	Volumen (mL)	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad volumétrica (U/mL)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación
Extracto enzimático	5.0	30.85	175.81	879.05	5.70	
Fracción con la enzima pura (Carril 9)	0.5	0.40	39.13	19.57	97.85	17.0

*No se cuantificó la actividad en fracción no retenida ni las fracciones de lavados con imidazol.

7.2.2. Producción de FOS con Isla4

Una vez purificada la enzima Isla4, se inició el estudio de las reacciones para la producción de FOS. Se analizó la influencia de la concentración de sustrato inicial sobre la especificidad de reacción con concentraciones de sacarosa de 292, 1170 mM y 2046 mM (100, 400 y 700 g/L, respectivamente). En cuanto a la concentración de enzima, se emplearon 1, 5 y 10 U/mL para observar si esta variable tiene un efecto importante sobre la especificidad de reacción ya que hasta el momento no se han realizado estudios de este tipo para enzimas inulosacarosas. Dada la posible variación de la especificidad a través del tiempo, el análisis de especificidad de reacción e identificación de productos se llevó a cabo al alcanzar aproximadamente 90% de conversión de sustrato en todas las reacciones.

7.2.2.1. Determinación de la relación hidrólisis-transferencia

La eficiencia de la actividad transferasa está influenciada por diversos factores entre los que se encuentran la presencia de solventes orgánicos, temperatura, concentración inicial de sustrato y enzima, entre otros (Falconer y col., 2011).

En la Fig. 11, en la que se resumen los resultados de estos experimentos, se observa que a determinada concentración de enzima y al incrementar la concentración de sacarosa se favorece la actividad transferasa sobre la hidrolasa. Se propone que el aumento en la concentración de sustrato favorece la reacción hacia transferencia al disminuir la concentración de agua ya que existen reportes de que una vez formado el intermediario enzima-fructosil, la sacarosa compite favorablemente con el agua como aceptor del fructosilo (Chuankhayan y col., 2010). Así también, existe un efecto de la concentración de enzima sobre la especificidad de reacción que se observa en esta misma figura ya que a medida que se incrementa la concentración, en este caso desde 1 hasta 10 U/mL, la actividad hidrolítica aumenta. Lo anterior podría deberse a que se favorece la transferencia a una molécula de agua, dando como resultado una actividad hidrolítica predominante. Por lo tanto, la combinación de una alta concentración de sacarosa (por ejemplo 2046 mM) y una baja actividad enzimática (en este caso 1 U/mL) resulta en una actividad transferasa alta. Para estos experimentos específicamente, se alcanza una transferencia del 70% aproximadamente con una baja proporción de hidrólisis (30% de sustrato). Por el contrario, la hidrólisis se favorece cuando se emplean bajas concentraciones de sacarosa y altas concentraciones de enzima, en este caso 292 mM de sacarosa y 10 U/mL, dan lugar a un % de hidrólisis de sustrato del 89%.

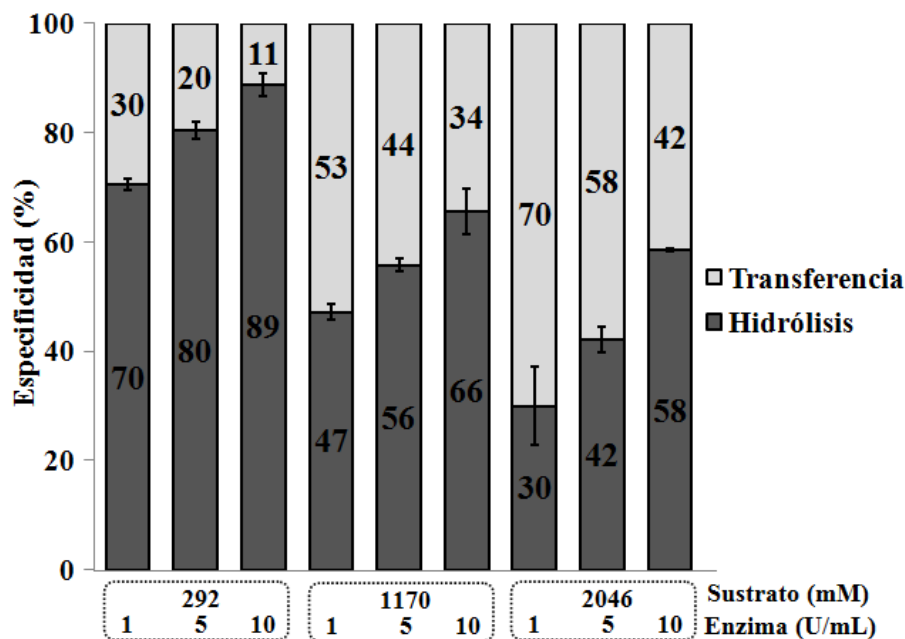


Fig. 11. Especificidad de reacción en función de la concentración de sustrato y enzima Isla4. Reacciones llevadas a cabo en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 y 1 mM CaCl₂.

Existen diversos estudios en los que se reporta que al aumentar la concentración de sacarosa inicial, se incrementa la actividad transferasa y se reduce la hidrolasa. Chambert y col. (1974) estudiando la síntesis de levana, encontraron un predominio de la actividad hidrolítica a concentraciones de sacarosa menores de 12 mM (4 g/L). Resultados similares han sido reportados por Song and Jacques (1999), quienes observaron que a concentraciones menores de 58 mM de sacarosa, las levansacarosas de *B. subtilis* y *Gluconacetobacter diazotrophicus* muestran sólo actividad hidrolítica. Así mismo, Porrás-Domínguez (2012), en nuestro grupo de trabajo, empleó concentraciones de sacarosa de hasta 1754 mM alcanzando una transferencia de sacarosa del 78% hacia la producción de levana.

Referente a enzimas tipo inulosacarosas, Ozimek y col. (2006) reportaron que la actividad transglicosilasa de la inulosacarosa de *L. reuteri* 121 se incrementa al aumentar la concentración de sustrato desde 200 a 1800 mM de sacarosa sintetizando principalmente FOS; por el contrario, a concentraciones menores de 200 mM de sacarosa la actividad hidrolasa aumenta. Ortiz-Soto y col. (2004) realizaron estudios de especificidad con Isla encontrando que la síntesis de inulina fue más eficiente a

concentraciones iniciales de sacarosa mayores a 585 mM; por el contrario, a concentraciones de 12 mM de sacarosa se obtuvo una actividad hidrolítica del 80% aproximadamente. Del Moral y col. (2008) reportan para IslA y demás versiones truncadas, incluyendo IslA4, que a bajas concentraciones de sustrato la actividad es preferentemente hidrolasa utilizando diversas concentraciones de sacarosa (hasta 870 mM). Del mismo modo, Rodríguez-Alegría y col. (2010) reportaron este mismo comportamiento para la mutante IslA4 S425A realizando estudios en un intervalo de concentración de sacarosa de hasta 1000 mM. Los resultados mostrados en la Fig. 11 para IslA4 bajo las tres condiciones de sustrato probadas confirman lo anteriormente mencionado.

Por otro lado, cabe mencionar que hasta ahora no existen antecedentes previos a este trabajo acerca del efecto de la concentración de enzima en la especificidad de reacción con inulosacarosas de origen bacteriano. No obstante, recientemente Porrás-Domínguez (2012) reportó el efecto de esta variable de reacción en la producción de levana con SacB, encontrando un efecto similar, ya que al aumentar la concentración de enzima de 1 a 5 U/mL, la transferencia disminuyó de 43 a 2% para una reacción con 292 mM de sacarosa a 35 °C.

7.2.2.2. Perfil de productos de reacción

Con el fin de tener una idea cualitativa de los productos de síntesis obtenidos, se realizó un análisis por TLC de los productos de reacción formados después de la incubación de sacarosa con IslA4. En la Fig. 12 se puede observar una placa de TLC que muestra tanto la producción de FOS como de polímero para las reacciones con las tres condiciones de sacarosa probadas empleando 1 U/mL de enzima. Se identificó con estándares la aparición de 1-kestosa, que es el primer producto de transferencia de fructosa cuando se elonga la sacarosa; seguido de la nistosa, y posteriormente la f-nistosa que aparece a avanzados tiempos de reacción. Así mismo, se observa que la producción de FOS aumenta a medida que se incrementa la concentración de sustrato; además, el perfil de productos cambia con la concentración de sacarosa ya que se identificaron FOS

de menor GP, principalmente 1-kestosa y nistosa, para 292 mM de sacarosa; mientras que para 2046 mM se observan productos de un GP mayor a 10 unidades de fructosa.

Es importante mencionar que en estudios previos con la enzima IsIA4 no se había identificado esta extensa variedad de FOS, ya que únicamente se había explorado el perfil con la condición de 292 mM de sacarosa y 1 U/mL de enzima, habiéndose reportado una mínima producción de FOS con un $GP < 5$ y siendo la inulina el principal producto sintetizado (Del Moral y col., 2008; Rodríguez-Alegría y col., 2010). Por otro lado, con la inulosacarasa de *L. reuteri* 121 se observó que a una concentración de 263 mM de sacarosa como sustrato después de 17 h de reacción, únicamente se produce 1-kestosa y nistosa (van Hijum y col., 2002); pero al aumentar la concentración de sustrato a 840 mM de sacarosa se producen además de los anteriores, FOS de $GP > 5$ y polímero (Ozimek y col., 2006). Así mismo, para la InuJ de *L. johnsonii* NCC 533 y la InuGA de *Lactobacillus gasseri* (Anwar y col., 2008; Anwar y col., 2010) se observó la síntesis de una amplia gama de FOS de $GP > 5$ además de inulina (a avanzados tiempos de reacción) en reacciones con 600 mM de sacarosa en ambos casos. Este mismo comportamiento se analizó también con la levansacarasa de *Zymomonas mobilis* con la que empleando altas concentraciones de sacarosa, también se incrementa el rendimiento de FOS (Crittenden y Doelle, 1994). Finalmente, también se observó este comportamiento con versiones truncadas de la levansacarasa de *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 (Tieking y col., 2005).

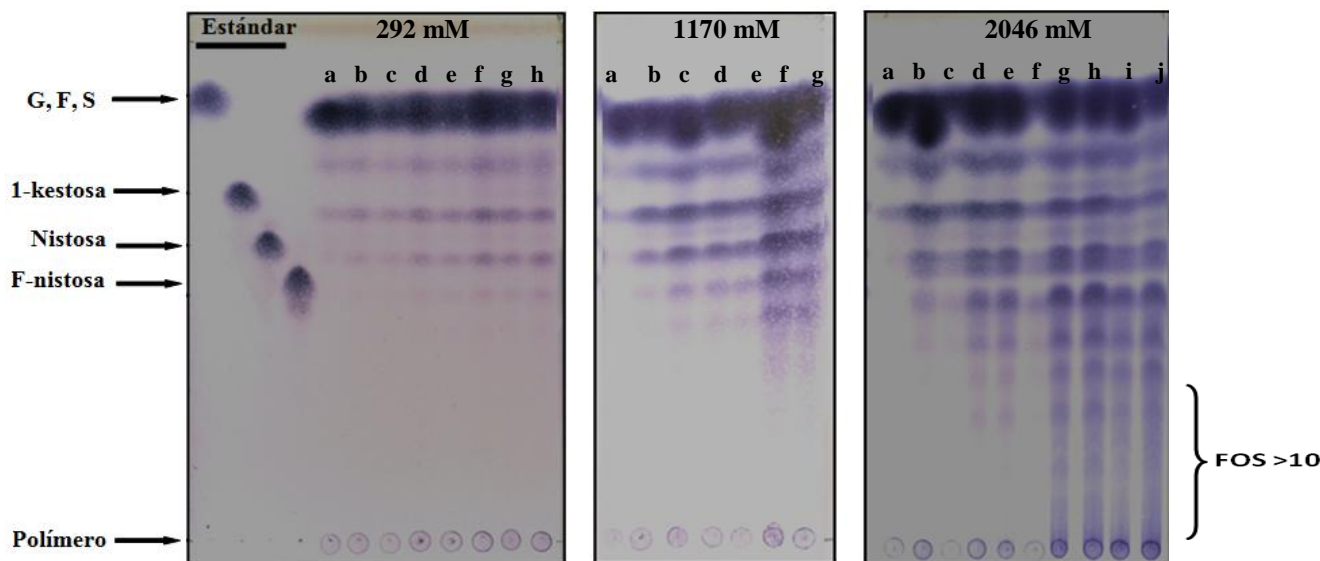


Fig. 12. Placas de TLC en las que se muestra el perfil de productos obtenido a lo largo de la reacción con diferentes concentraciones de sustrato y 1 U/mL de enzima IsIA4 a 30 °C. Las muestras corresponden a los siguientes tiempos en h: 292 mM a) 0, b) 2, c) 4, d) 6, e) 8, f) 10, g) 12, h) 24; 1170 mM a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 12, f) 25, g) 34; 2046 mM a) 0, b) 3, c) 6, d) 9, e) 12, f) 24, g) 27, h) 30, i) 34, j) 48.

G: glucosa, F: fructosa y S: sacarosa.

Un aspecto importante que se observa de la formación de los FOS a través del tiempo, es que la síntesis de los FOS de bajo peso molecular se inicia con 1-kestosa, (identificada con el estándar), aumentando el GP de los productos con el tiempo de reacción con un comportamiento típico de un mecanismo tipo no-procesivo, que como ya se mencionó, implica la liberación del producto al medio de reacción después de cada transferencia del grupo fructosilo. Ozimek y col. (2006) proponen que los subsitios +2, +3 y/o más lejanos, tienen una baja afinidad por la unión con las cadenas de polímero en crecimiento, lo que ocasiona que no permanezca asociada a la enzima después de cada elongación con la unidad fructosilo, dando lugar a la síntesis de FOS como productos principales.

Por otro lado, para determinar la distribución de peso molecular del polímero producido, se llevó a cabo un análisis mediante GPC. En la Fig. 13 se observa, a los 14 min del tiempo de elución, la producción de inulina de aproximadamente 3,000 kDa. En este caso el polímero es de menor peso molecular que el producido por las inulosacarosas de *L. reuteri* 121 (van Hijum y col., 2002) y *L. johnsonii* NCC533 (Anwar y col., 2008) de 10,000 y 40,000 kDa, respectivamente. En la misma Fig. 13 observamos que a medida

que se aumenta la concentración de enzima, la cantidad de polímero disminuye, comportamiento que es común para las tres concentraciones de sustrato probadas. Una posible hipótesis para explicar este fenómeno es que al utilizar una mayor cantidad de enzima en la reacción, se aumentan los sitios activos de enzima-fructosilo disponibles para la síntesis, por lo que las fructosas del sustrato se distribuyen entre un mayor número de moléculas en formación, dando lugar a productos de menor GP. Por el contrario, a bajas concentraciones de enzima (1 U/mL), existen pocos núcleos de formación lo que permite la elongación del polímero sobre un mismo núcleo o sitio catalítico. No se descarta la posibilidad de que en función de la concentración, la enzima pudiese tener interacciones que dieran lugar a comportamientos diversos, sin embargo, se requiere de un estudio detallado para afirmar lo anterior mencionado.

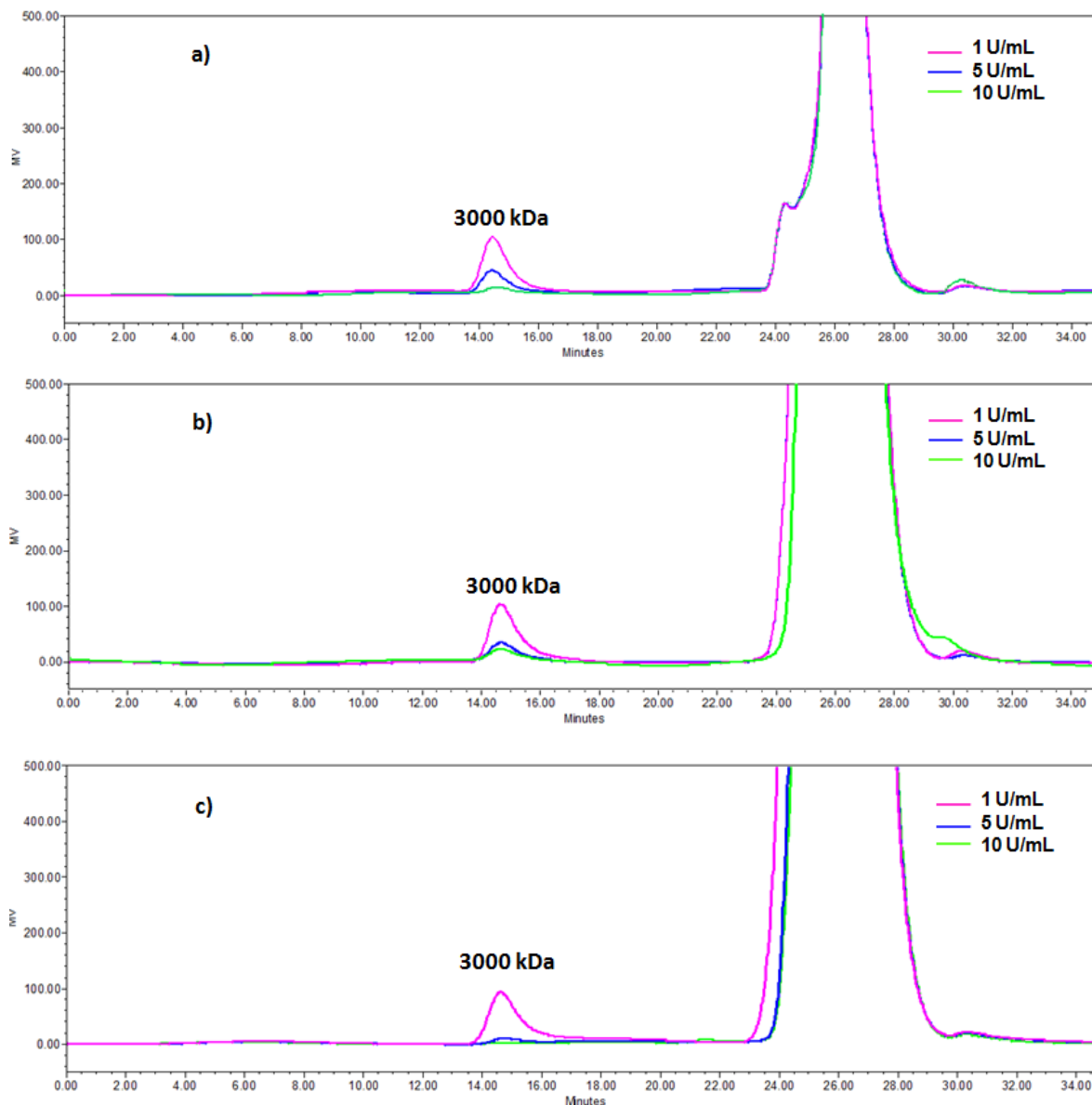


Fig. 13. Cromatogramas de permeación en gel que muestran la distribución de peso molecular del polímero producido por la enzima IsIA4 al final de la reacción en función de la actividad enzimática y la concentración de sustrato: a) 292, b) 1170 y c) 2046 mM de sacarosa.

Los resultados mostrados previamente coinciden con el comportamiento reportado por Porras-Domínguez (2012) para la síntesis de levana, en la que a una concentración de enzima equivalente a 5 U/mL de levansacarasa SacB de *B. subtilis* no existe producción del polímero de alto peso molecular, mientras que en reacciones con 0.1 U/mL de enzima se observa únicamente esta fracción, en este caso de 3,500 kDa. Así mismo, Euzenat y col. (1997) reportaron únicamente la producción de FOS a partir de una actividad enzimática de 12 U/mL de SacB. Es importante mencionar que este comportamiento ha

sido observado únicamente en levansacarosas con perfil de productos bimodal, es decir, con dos poblaciones de distinto peso molecular, lo cual no se observó en las reacciones con Isla4.

Otro reporte es el de Falconer y col. (2011) en el cual encontraron que el peso molecular promedio de la dextrana fue menor cuando la concentración de dextransacarasa de *L. mesenteroides* B-512FMC fue más alta, concluyendo que el peso molecular de los polímeros de dextrana sintetizadas es inversamente proporcional a la concentración de enzima.

7.2.2.3. Identificación de FOS producidos por Isla4

Con el fin de identificar los FOS producidos durante las reacciones con Isla4, se analizaron mediante HPAEC-PAD. En la Fig. 14 se muestra que para las reacciones con 292 mM de sacarosa como sustrato y las diferentes concentraciones de enzima, algunos de los productos sintetizados coinciden con los estándares de 1-kestosa, 6-kestosa, neokestosa, nistosa y f-nistosa observados a 4.5, 7.0, 8.5, 9.0 y 11.5 min de elución, respectivamente. También se observa que la cantidad de FOS decrece gradualmente con el incremento del GP, lo cual ha sido reportado para la Inu de *L. reuteri* 121 (Ozimek y col., 2006), aunque la señal amperométrica no necesariamente es proporcional a la concentración del producto.

Así mismo, se observan picos no identificados principalmente entre la 1 y 6-kestosa, así como entre la nistosa y la f-nistosa. Estos últimos se reportan también en las reacciones con las inulosacarosas de *L. reuteri* 121 (Ozimek y col., 2006) y *L. johnsonii* NCC 533 (Anwar y col., 2008) también sin ser identificados; no obstante, se sugiere que el producto que eluye inmediatamente después de 1-kestosa a los 5 min, corresponde al disacárido blastosa, isómero de la sacarosa. Por el contrario, con InuGA e InuGB de *L. gasserii* no se observan estos productos, identificándose sólo señales correspondientes a FOS sencillos consecuencia de la fructosilación directa y secuencial de la sacarosa (Anwar y col., 2010).

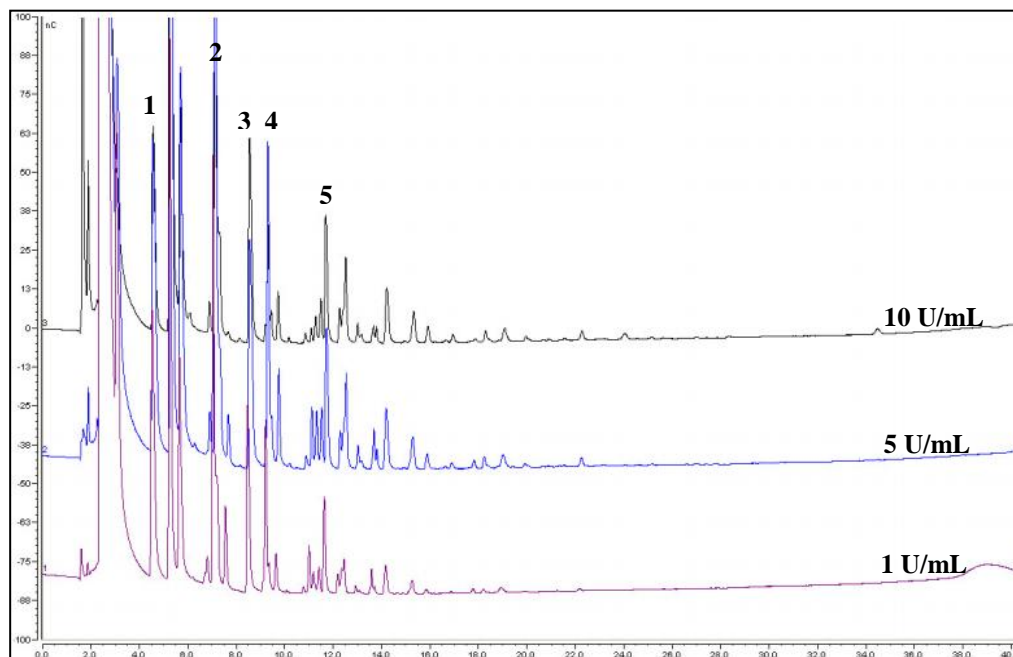


Fig. 14. Perfil de FOS analizados mediante HPAEC-PAD obtenidos en reacciones con 292 mM de sacarosa y diferentes concentraciones de enzima IsIA4. Productos identificados: 1) 1-kestosa, 2) 6-kestosa, 3) neokestosa, 4) nistosa y 5) f-nistosa.

En este mismo contexto, en la Fig. 15 se observa el perfil de FOS para la condición de reacción que presenta la mayor actividad transferasa, es decir, empleando 2046 mM de sacarosa y 1 U/mL de actividad enzimática. En este cromatograma se identificaron los productos 1-kestosa, 6-kestosa, neokestosa, nistosa y f-nistosa, además de numerosos FOS con un $GP > 5$, los cuales no pueden ser ya resueltos por el equipo; sin embargo, es evidente la presencia de picos después de los 20 min. Lo anterior ya ha sido reportado para la inulosacarasa de *L. reuteri* 121 que sintetiza FOS de GP mayor que la nistosa, cuando se emplean altas concentraciones de sustrato (Ozimek y col., 2006) tal como se observa en esta Fig. 15. Así mismo, se observan también, al igual que en el cromatograma de la Fig. 14, múltiples productos de diverso GP no identificados con los estándares disponibles.

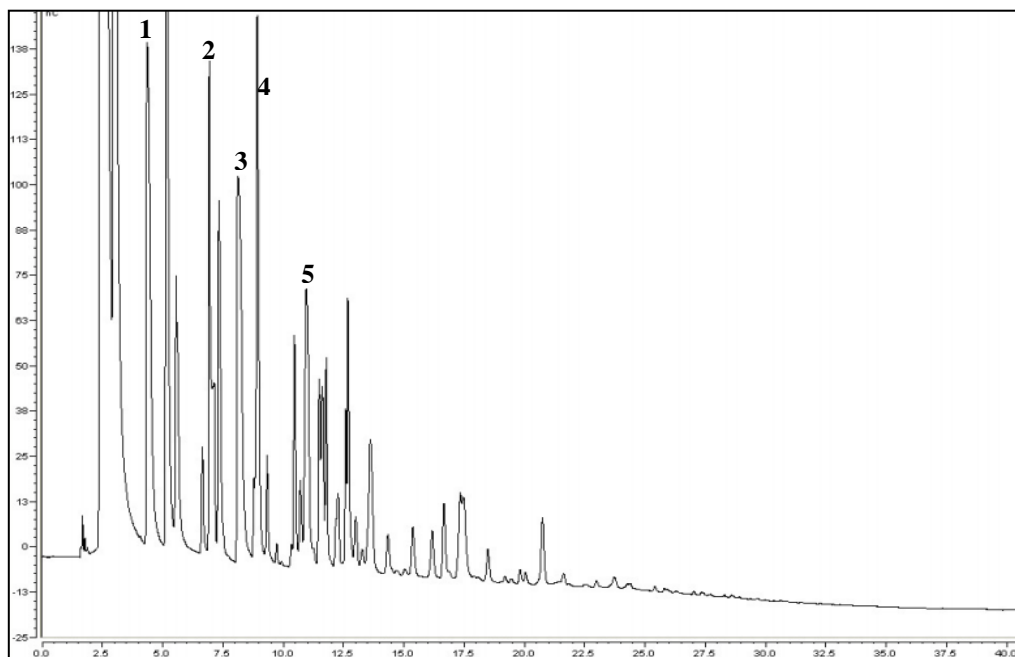


Fig. 15. Perfil de FOS analizados mediante HPAEC-PAD obtenidos en reacciones con 2046 mM de sacarosa y 1 U/mL de enzima Isla4. Productos identificados: 1) 1-kestosa, 2) 6-kestosa, 3) neokestosa, 4) nistosa y 5) f-nistosa.

Existe aún mucho trabajo que realizar para poder relacionar la diversidad de productos obtenidos de la actividad de las inulosacararas con la estructura y el mecanismo de catálisis. Actualmente se dispone de la estructura cristalográfica de InuJ de *L. johnsonii* NCC533, siendo la única inulosacarasa bacteriana hasta el momento cristalizada, lo que nos permite empezar a tener una aproximación al mecanismo mediante el cual estas enzimas de la familia GH68 llevan a cabo la catálisis (Pijning y col., 2011). De la extensa información proporcionada por este reporte destaca que los dominios N y C-terminal están muy lejos del bolsillo catalítico y por lo tanto, es improbable que sean críticos para el proceso de transfructosilación. Lo anterior coincide con los resultados mostrados en este proyecto en el que a pesar de utilizar una versión truncada de Isla que carece de los dominios originales, es capaz de llevar a cabo la síntesis de polímero y de una extensa variedad de FOS. A pesar de esto, como se señaló en los antecedentes, es importante mencionar que está demostrado que ambas regiones están de alguna forma relacionadas con el cambio en la especificidad de reacción.

Como ya ha sido señalado, las inulosacararas de *L. reuteri* 121 (Ozimek y col., 2006), *L. johnsonii* NCC533 (Anwar y col., 2008) y *L. gasseri* (Anwar y col., 2010) tienen la propiedad de sintetizar una amplia gama de FOS. A estas enzimas se agrega ahora la IslA4 de *L. citreum*, lo que permite concluir que se trata de una propiedad típica de las enzimas inulosacararas. Sin embargo, destaca sobremanera el hecho de que para la mayoría de las inulosacararas anteriormente mencionadas (con excepción de InuJ) no se ha reportado la gran cantidad y diversidad de FOS observada con IslA4 debido a que aquellas producen principalmente 1-kestosa, nistosa y f-nistosa. Referente a lo anterior, es importante mencionar que encontrar un sistema de purificación para FOS y así facilitar la definición de su estructura es uno de los retos actuales más importantes en nuestro grupo de investigación, por lo que continuar con esta tarea es una de las perspectivas de este trabajo.

7.2.2.4. Análisis cuantitativo de los productos sintetizados por IslA4

Después de alcanzar una conversión de sustrato de aproximadamente 90% en todas las reacciones, se realizó la cuantificación de la fructosa incorporada a los productos de transferencia con el fin de conocer el % de transfructosilación dirigido tanto hacia la síntesis de inulina como a FOS.

La cuantificación de fructosa incorporada a polímero (F_{POL}) se realizó mediante una curva estándar de inulina liofilizada proveniente de una reacción de 50 mL, observándose que la producción de polímero es independiente de la concentración de sustrato y es función fundamentalmente de la actividad enzimática, siendo casi despreciable a altas concentraciones de enzima, como puede constatarse en la Tabla 17. Lo anterior significa que el aumento en la actividad transferasa observado al incrementar la concentración de sustrato, es debido a la síntesis exclusiva de FOS, mismos que se identificaron anteriormente mediante TLC y HPAEC-PAD.

Tabla 17. Fructosa incorporada a polímero (F_{POL}) bajo las condiciones de reacción probadas cuantificado mediante una curva estándar

Sustrato (mM)	Enzima (U/mL)	F_{POL} (mM)
292	1	95 ± 4.3
	5	18 ± 0.4
	10	6 ± 0.1
1170	1	87 ± 0.5
	5	27 ± 0.1
	10	11 ± 0.1
2046	1	89 ± 0.2
	5	23 ± 0.2
	10	5 ± 0.3

Con la enzima IsIA4 se logró producir en promedio 16, 4 y 1 g/L de inulina con 1, 5 y 10 U/mL de enzima, respectivamente; a partir de cualquiera de las tres concentraciones de sacarosa probadas. La concentración más alta de inulina alcanzada en estas reacciones fue significativamente mayor que la reportada para la inulosacarasa de *L. reuteri* 121 con la que se obtuvieron 0.8 g/L a partir de 263 mM (90 g/L) de sacarosa; sin embargo, es importante señalar que por razones que no se detallan en este reporte, los tiempos de incubación utilizados sólo les permitieron alcanzar una conversión del 18% (van Hijum y col., 2002). Así mismo, el máximo rendimiento de polímero (g/L) con IsIA4, es decir 16 g/L, es muy similar al obtenido con las inulosacarosas InuGA-RM e InuGB-R de *L. gasseri* que producen 11 y 13 g/L de inulina respectivamente, en reacciones con una mayor cantidad de sacarosa inicial (205 g/L de sacarosa) (Anwar y col., 2010). Por otro lado, con InuJ de *L. johnsonii* NCC533 se obtuvieron 1.5 g/L de polímero a partir de 584 mM de sacarosa (200 g/L) (Anwar y col., 2008). Por lo anterior, podemos concluir que IsIA4 es una enzima más eficiente para llevar a cabo la síntesis de inulina, comparada con las inulosacarosas disponibles, incluso cuando se emplean bajas concentraciones de sacarosa (292 mM), condiciones en las que prevalece la reacción de hidrólisis. Estos resultados pueden apreciarse de forma específica en la Fig. 16, en la que se desglosa el destino del sustrato, por un lado hacia hidrólisis y transferencia, y de esta última, hacia la síntesis específica de polímero y/o FOS. En esta figura también se aprecia que la mayor producción de FOS se llevó a cabo con 2046 mM de sacarosa como sustrato y específicamente con 1 U/mL de enzima, ya que del 70% de transferencia, el 65% corresponde a la transfructosilación hacia la síntesis de FOS. Por el contrario, cuando las condiciones de reacción se llevan a cabo a una baja concentración de sustrato y enzima

(292 mM de sacarosa y 1 U/mL), no sólo se abate la síntesis de FOS, sino que la transferencia da lugar principalmente al polímero, resultado similar al previamente reportado por Del Moral y col. (2008).

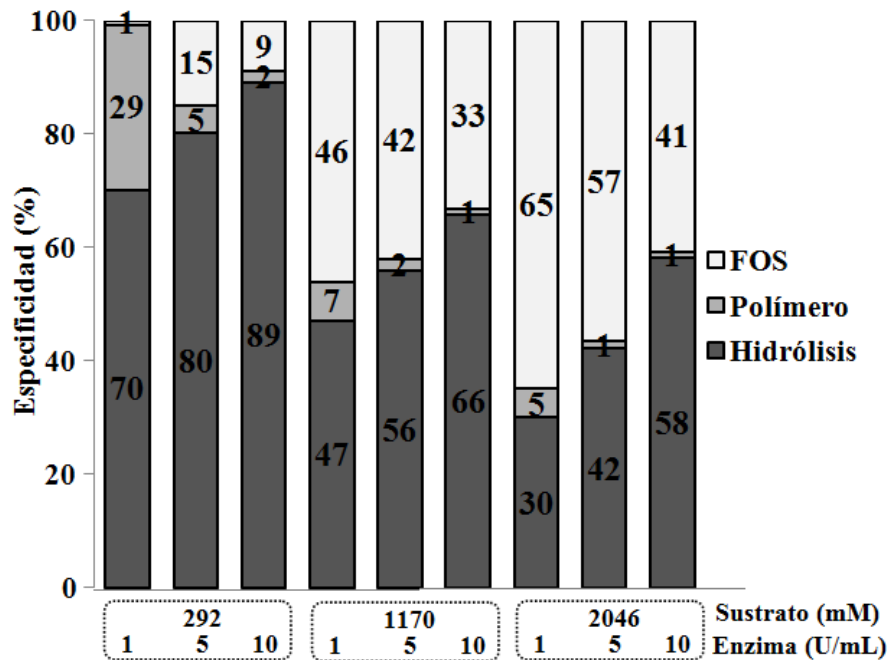


Fig. 16. Especificidad de reacción de transfructosilación con IsIA4 hacia hidrólisis y hacia la síntesis de inulina y FOS. Reacciones llevadas a cabo en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 y 1 mM CaCl₂.

Para una mejor apreciación de la cantidad de fructosa del sustrato integrada al producto de interés, en la Fig. 17 podemos observar la concentración de F_{FOS} (mM). Se observa que la menor especificidad hacia la síntesis de FOS, se da en las reacciones llevadas a cabo con la mínima concentración de sacarosa utilizada, es decir, 292 mM, que como se mostró en la Fig. 16 corresponde a condiciones de reacción en las que la mayor parte del sustrato se hidroliza (hasta en un 89%). En este mismo contexto, resulta interesante la comparación cuando la concentración de sacarosa es de 1170 mM de sacarosa y se incrementa a 2046 mM, debido a que para las dos concentraciones de sustrato y 1 U/mL de enzima, si bien se hidroliza aproximadamente en promedio 600 mM de sacarosa, con 2046 mM de sacarosa se incorpora a FOS más del doble de fructosa que con 1170 mM de sustrato. Así mismo, observamos que la mayor cantidad de F_{FOS}, 1251 mM, se encontró para las reacciones con 2046 mM de sacarosa como sustrato, particularmente con 1 U/mL de enzima.

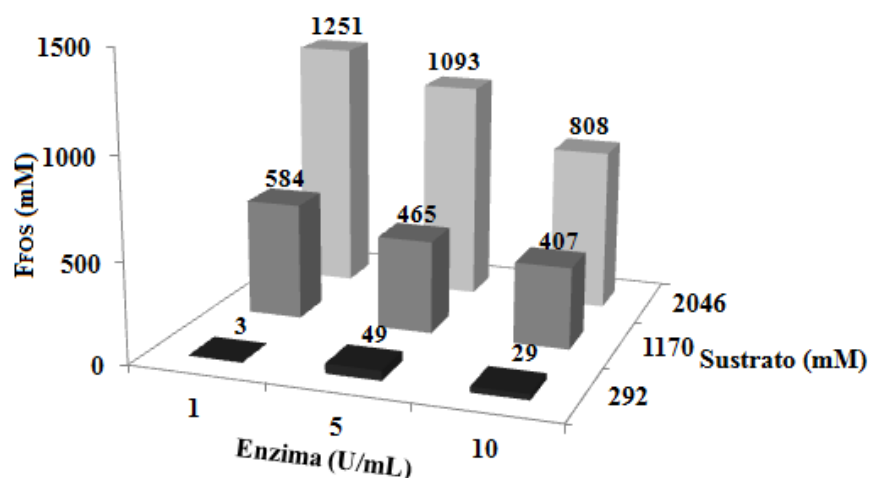


Fig. 17. Fructosa incorporada a FOS (F_{FOS}) bajo las condiciones de reacción probadas. Reacciones llevadas a cabo en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 y 1 mM $CaCl_2$.

Numerosas FTFs de diferentes microorganismos han sido reportadas como productoras de FOS de diferente GP con rendimientos hasta del 60%. Así mismo, existen múltiples estudios con el fin de mejorar el proceso de producción, identificando parámetros clave para incrementar el rendimiento por ejemplo, el uso de sales minerales en el medio de fermentación, pH, tiempo de reacción, enzimas y células inmovilizadas, la eliminación de la glucosa remanente, entre otros (Sangeetha y col., 2005b). Lo anterior podría ser considerado para el desarrollo del proceso de producción de FOS tipo inulina con Isla4 a partir de sacarosa a gran escala.

A pesar de que para efectos eventuales de carácter comercial el proceso de producción debe ser mejorado y optimizado, nuestros resultados revelan que es posible recuperar la eficiencia para transfructosilación, y específicamente hacia la síntesis de FOS tipo inulina con la enzima Isla4, a través de la adecuación de las condiciones de reacción, particularmente empleando altas concentraciones de sacarosa como sustrato. Lo anterior demuestra, si recordamos las dificultades encontradas en la primera etapa de este proyecto, que las estrategias de ingeniería de reacción siguen siendo una alternativa importante a las estrategias de ingeniería de proteínas para la síntesis de productos de interés.

7.2.3. Reacciones con IslA: estudios comparativos

Sin duda IslA4 es una enzima más pequeña y con ventajas de producción con respecto a la enzima silvestre IslA. Sin embargo, considerando los hallazgos en este proyecto, referentes a características de especificidad de IslA4, se consideró necesario revisar si éstas son exclusivas de IslA4 o son propiedades también de la enzima silvestre. Así, se realizaron estudios similares con la inulosacarasa IslA. Las reacciones se llevaron a cabo también con 292, 1170 y 2046 mM de sacarosa como sustrato, pero únicamente con 1 U/mL de enzima, debido a que en los experimentos con IslA4 el mayor efecto sobre la transferencia se encontró al modificar la concentración de sacarosa. El análisis de especificidad de reacción y productos se llevó a cabo al alcanzar aproximadamente 90% de conversión de sustrato en las reacciones con 292 y 1170 mM de sacarosa; para la tercera reacción se alcanzó únicamente el 80% de conversión.

7.2.3.1. Especificidad de reacción: relación hidrólisis-transferencia

En la Fig. 18 se observa que, de igual forma que para IslA4, al aumentar la concentración de sustrato se incrementa la actividad transferasa. Así, la mayor especificidad hacia la transferencia se observó cuando se empleó 2046 mM de sacarosa, llegando a ser de 70%. Lo anterior coincide con lo ya reportado por Ortiz-Soto y col. (2004) y Del Moral y col. (2008) que trabajando con IslA, observaron que a altas concentraciones de sustrato la actividad es preferentemente transferasa. Cabe mencionar que la transferencia del 70% con 2046 mM de sacarosa fue a una conversión de sustrato del 80%, a diferencia de las concentraciones más bajas de sacarosa, en las que se alcanzó el 90%. Esto sugiere que se podría alcanzar una mayor eficiencia en la reacción de transferencia si se aumenta el tiempo de reacción.

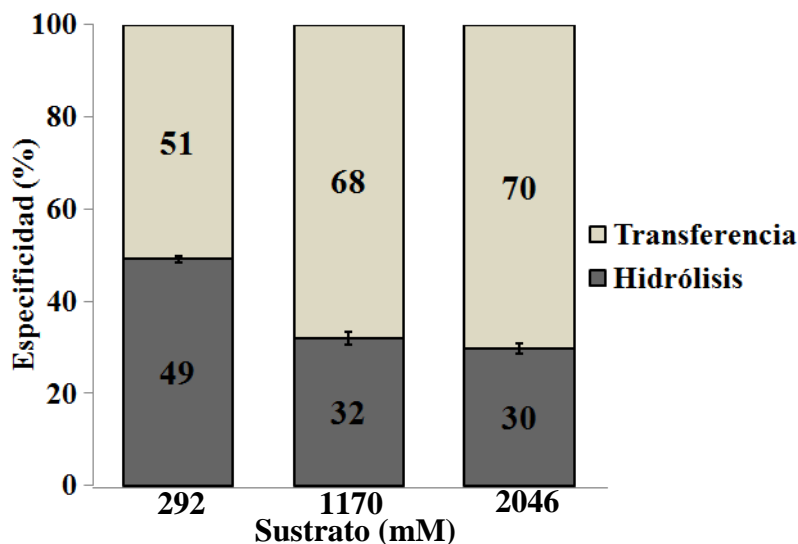


Fig. 18. Especificidad de reacción a diferentes concentraciones de sustrato probadas y 1 U/mL de enzima IslA. Reacciones llevadas a cabo en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 y 1 mM CaCl₂.

7.2.3.2. Perfil de productos de reacción de transferencia

Los productos sintetizados por IslA fueron analizados cualitativamente por TLC a tiempos finales de reacción. En la Fig. 19 se observa la producción de polímero para las tres concentraciones de sustrato ensayadas; sin embargo, la síntesis de FOS se observa únicamente para las concentraciones de 1170 y 2046 mM de sacarosa, siendo mayor la cantidad producida para esta última.

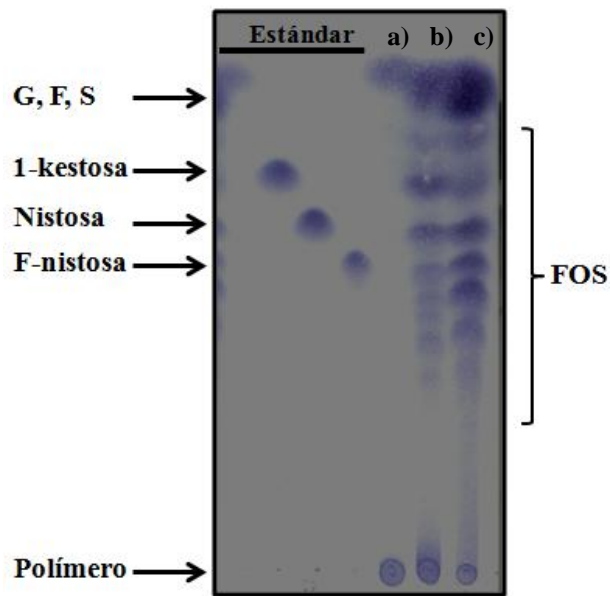


Fig. 19. Placa de TLC en la que se muestra el perfil de productos obtenido con a) 292, b) 1170 y c) 2046 mM de sacarosa como sustrato y 1 U/mL de enzima IslA a 30 °C. G: glucosa, F: fructosa y S: sacarosa.

Por otro lado, el polímero producido en estas reacciones fue analizado por GPC. En la Fig. 20 se observa la formación de polímero de alto peso molecular (HMW) con un tamaño de 3,000 kDa; así mismo, se distingue la presencia de una segunda población de productos bajo peso molecular (LMW). Esta fracción podría tener un peso molecular de alrededor de 8.3 kDa, si comparamos la elución con la de los polímeros sintetizados por SacB de *B. subtilis* (Ortiz-Soto y col., 2008) que eluyen aproximadamente entre los 22 a 24 min y que corresponde a un GP aproximado de 46 unidades de fructosa. En estudios previos para la caracterización de IslA, ya se había observado esta distribución bimodal con la enzima soluble, reportándose un cambio en la distribución de peso molecular a través del tiempo (Ortiz-Soto y col., 2004).

Se observa también que la distribución de pesos moleculares del polímero sintetizado está en función de la concentración de sacarosa ya que a una concentración de enzima determinada, en este caso 1 U/mL, la producción del polímero HMW fue mínima para 292 mM de sacarosa; con 1170 mM de sustrato observamos la presencia de las dos distribuciones, tanto de LMW y HMW; y por otro lado, para 2046 mM de sacarosa observamos únicamente el polímero de HMW.

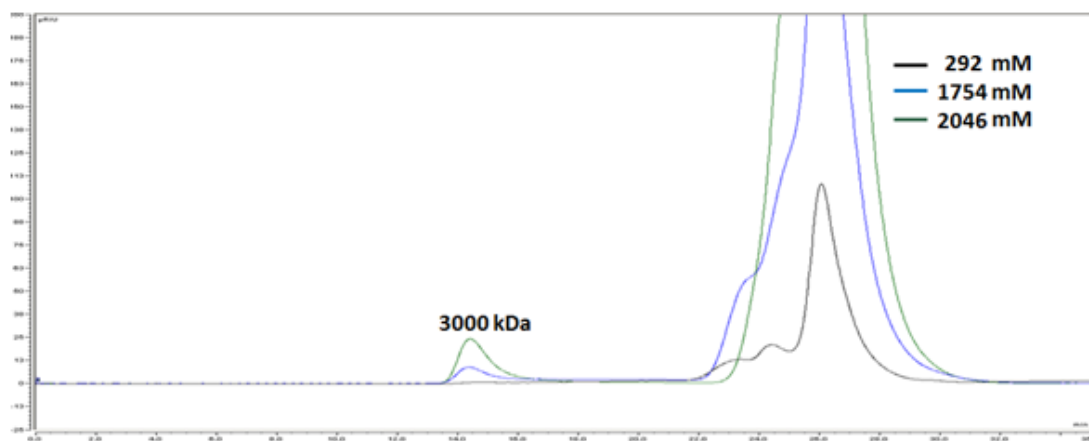


Fig. 20. Cromatograma de permeación en gel que muestra la distribución de pesos moleculares del polímero producido por la enzima IslA al final de la reacción en función de la concentración de sacarosa y 1 U/mL de enzima IslA.

En estudios con la dextranasa de *L. mesenteroides* B-512FMC, Falconer y col. (2011) encontraron este mismo comportamiento, ya que a una concentración de enzima determinada y al incrementar la concentración de sacarosa (20, 50, 100 y 200 mM), se observa el aumento en el peso molecular promedio de los polímeros de dextrana sintetizados. Lo anterior fue explicado gracias a un mecanismo procesivo para la síntesis de polímeros de HMW ya que al existir una mayor concentración de sacarosa, se puede elongar la cadena hasta un GP considerable.

Cabe mencionar que la cuantificación de los polímeros de HMW y LMW no se realizó debido a que se encuentra fuera de los objetivos de este proyecto, aunque los cambios en el área relativa permiten tener una idea cualitativa. Así mismo, es importante considerar que hasta el momento no se encuentra reportado el comportamiento bimodal para alguna enzima inulosacarasa conocida, por lo que continuar con esta investigación es de gran relevancia.

7.2.3.3. Análisis de FOS producidos por Isla

El análisis de los productos sintetizados por Isla se llevó a cabo mediante HPAEC-PAD (Fig. 21), lo que reveló la presencia del perfil característico de polímero de LMW para 292 y 1170 mM de sacarosa hasta un GP aproximado de 50 unidades de fructosa; sin embargo, para 2046 mM no se observa la misma distribución. En efecto, en este último caso la síntesis se detiene en productos de aproximadamente un GP de 25 unidades de fructosa.

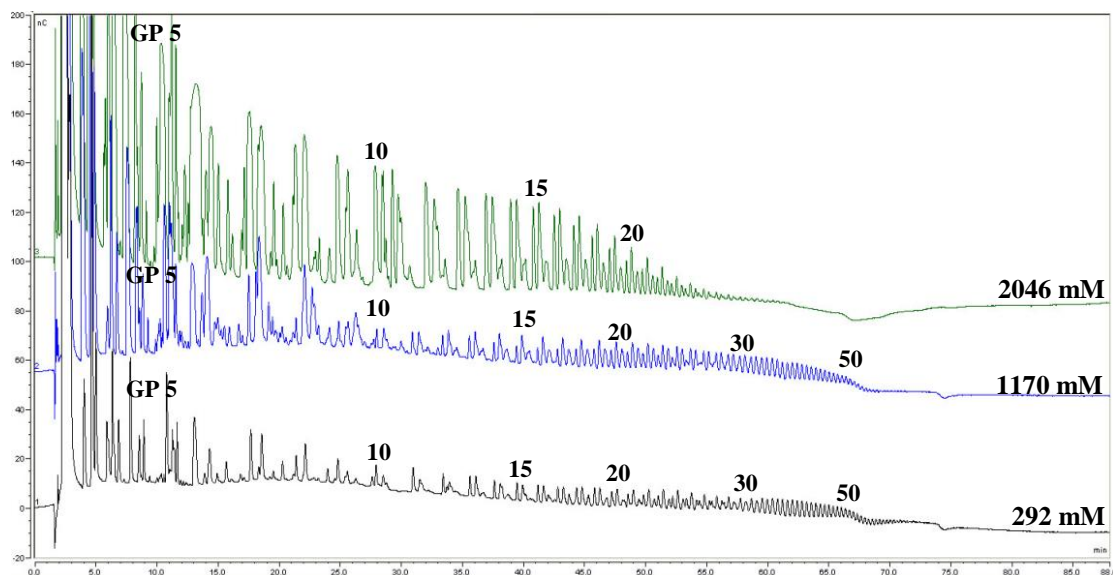


Fig. 21. Perfil de FOS analizados mediante HPAEC-PAD obtenidos en reacciones con diferentes concentraciones de sustrato y 1 U/mL de enzima IsIA.

En nuestro grupo de trabajo, Porras-Domínguez (2012) realizó estudios con la levansacarasa SacB y observó un perfil de productos con distribución bimodal poniendo en evidencia una relación inversamente proporcional entre el tamaño del polímero sintetizado y la concentración de enzima utilizada. Del reporte anterior surgió la interrogante sobre el mecanismo mediante el cual SacB, en función de la concentración, sintetiza polímeros de tan diverso tamaño. En este sentido, recientemente Raga-Carbajal (en desarrollo) en su proyecto de maestría ha investigado cómo diversos parámetros (temperatura, concentración de sustrato y enzima) influyen en el perfil de productos, encontrando que la levana de LMW se produce mediante un mecanismo no procesivo al observar claramente, mediante análisis por HPAEC-PAD, la acumulación de intermediarios a través del tiempo de reacción. Por el contrario, para el mecanismo de síntesis de levana de HMW hasta la fecha no se ha demostrado claramente un mecanismo específico, en parte derivado del gran número de intermediarios que deberían producirse en el caso de un mecanismo no procesivo, así como la ausencia de complejos enzima-levana en el caso de un mecanismo procesivo; no obstante, los resultados preliminares muestran que un aumento en la concentración de sustrato no afecta la distribución de peso molecular.

Contrario a lo observado con SacB, en el caso de IslA notamos una diferencia en la distribución bimodal que depende de la concentración de sacarosa empleada, encontrando una relación directa entre el incremento de ésta y la producción de polímero de HMW. Una hipótesis obvia en este caso es que al existir una concentración mayor de sacarosa, los donadores de grupo fructosilo son abundantes por lo que la elongación del polímero hasta una distribución de HMW puede llevarse a cabo; sin embargo, esto no sucede con IslA4. Por otro lado, parece que con 1170 y 2046 mM de sacarosa, el polímero y los FOS se sintetizan por mecanismos distintos. Sólo en el caso específico de la reacción con 2046 mM de sacarosa, podría proponerse que los productos de menor GP son elongados hasta un mayor GP, probablemente hasta el polímero de HMW. En estudios previos para la caracterización de IslA, se observó esta distribución bimodal con la enzima soluble, reportándose un cambio en la distribución de peso molecular a lo largo del tiempo ya que en los primeros min de reacción se observa únicamente la fracción de LMW y posteriormente decrece y aumenta la fracción de HMW (Ortiz-Soto y col., 2004). Sin embargo, es importante realizar ensayos que nos ofrezcan evidencias sólidas acerca del mecanismo por el cual IslA sintetiza uno o ambos polímeros según las condiciones de reacción empleadas, además de las causas en las que bajo ciertas condiciones la actividad se dirige además hacia la síntesis de FOS. Cabe mencionar que no se probaron otras concentraciones de enzima debido a que estos experimentos tienen como único objetivo comparar el comportamiento de IslA4 con la enzima silvestre.

7.2.4. Análisis comparativo de reacciones catalizadas por IslA e IslA4

Como observamos en los resultados anteriormente mencionados, el incremento de la actividad transferasa debido al aumento en la concentración de sacarosa como sustrato es claro e incuestionable; no obstante, la síntesis se dirige a diferentes productos según la enzima. Con IslA4 el aumento en la transferencia se dirigió principalmente a la producción de una amplia gama de FOS disminuyendo la síntesis de polímero; por el contrario, con IslA los polímeros tanto de HMW como LMW fueron los principales productos de reacción. Al no tener disponible una estructura para IslA e IslA4 no se puede asegurar que el plegamiento del núcleo catalítico sea el mismo; no obstante, si nos

basamos en que este dominio es semejante en las dos enzimas, claramente la diferencia radica en la influencia de los dominios N y C-terminal, ausentes en Isla4.

En enzimas GTFs, pertenecientes a la familia GH70, la función de la región variable no está del todo clara; no obstante, en estudios con la mutansacarasa de *Streptococcus downei* Mfe28 se observó un decremento en la actividad conservando sólo 1.5% de la actividad inicial global al eliminar esta región (Monchois y col., 1999); así mismo, un comportamiento similar fue observado en versiones truncadas de la ASR de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 (Joucla y col., 2006). Por el contrario, la delección de esta región en la reuteransacarasa GTFA de *L. reuteri* 121 no tuvo efecto drástico en actividad (Kralj y col., 2004).

Numerosos estudios han demostrado que el dominio C-terminal está involucrado en la unión del glucano debido a la presencia de unidades repetidas designadas como A, B, C, D, N así como YG (Giffard y Jacques, 1994), sugiriendo que este dominio juega un papel de facilitador en la transferencia de los productos desde el sitio catalítico (Monchois y col., 1998). En construcciones truncadas de la ASR de *L. mesenteroides* NRRL B-1355 (Joucla y col., 2006) se observó que la eliminación del GBD disminuyó drásticamente la actividad polimerasa. El mismo comportamiento fue observado para versiones truncadas de la de la GTF-I de *Streptococcus mutans* GS5 (Kato y Kuramitsu, 1990), la dextransacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F (DSR-S) (Monchois y col., 1998), la GTF-I de *Streptococcus sobrinus* 6715 (Konishi y col., 1999) y para la GTFA de *L. reuteri* 121 (Kralj y col., 2004). En este último reporte se propone que aunque este dominio no es esencial para la unión de la sacarosa, podría de una u otra manera afectar el mecanismo de reacción interviniendo en la reorganización estructural del sitio catalítico. Cabe mencionar que en ninguno de los reportes anteriores se observó alteración alguna en el tipo de enlace glicosídico formado; no obstante, sí se observaron algunos cambios en los pesos moleculares de los productos, como en el caso de la GTFA de *L. reuteri* 121 (Kralj y col., 2004) y la levansacarasa de *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 (Tieking y col., 2005) en los que se identificaron productos de menor GP en construcciones sin el C-terminal y por ende sin GBD.

Al igual que en las enzimas GTFs, el dominio C-terminal de las FTFs puede afectar la especificidad de la enzima y el tamaño de los productos. De las pocas evidencias reportadas hasta ahora, en cuanto a enzimas FTFs se refiere, encontramos un estudio en el que se reporta que un alargamiento del C-terminal de la levansacarasa de *B. subtilis* ocasionó una mayor producción de polímero (Chambert y col., 1992).

Se propone que IslA es una enzima mucho más eficiente para la polimerización, debido a la presencia del GBD en el C-terminal (ausente en IslA4) el cual podría aumentar la afinidad de la enzima por la cadena de polímero en crecimiento, tanto de HMW como LMW. Así mismo, se encontró que la presencia de la unidad repetida A, presente en el C-terminal de IslA, es esencial para la elongación de polímeros de dextrana, ya que la DRS-S Core ΔA , una variante truncada de la DSR-S que contiene únicamente el dominio catalítico, sólo produce polímero de LMW (Moulis y col., 2006). Por el contrario, con IslA4 se observó claramente un mecanismo no procesivo para la síntesis de FOS por lo que subsitios +2, +3 y más lejanos tienen relativamente menor afinidad para unir la cadena de fructana en crecimiento debido a la ausencia del GBD explicando la producción de estos productos de menor GP.

8. CONCLUSIONES

Por diversas circunstancias asociadas a la dificultad de clonación del inserto *islA4* mutagénico, la estrategia propuesta para la obtención de una variante de IslA4 eficiente para la síntesis de FOS mediante evolución dirigida no fue exitosa.

Se estudió la expresión del gen que codifica para la enzima IslA4 con el fin de obtener la mayor cantidad posible de enzima en la fracción soluble, alcanzándose una actividad volumétrica de hasta 1000 U/L de fermentación. Así mismo, se purificó de la enzima IslA4 encontrándose una actividad específica de 97.85 U/mg de proteína equivalente a un factor de purificación de 17.

A partir de la estrategia de ingeniería de reacción y mediante el análisis detallado del efecto conjunto de la concentración de sustrato y enzima, fue posible definir la especificidad de reacción para dirigirla hacia la síntesis de polímero y/o hacia la síntesis de FOS tipo inulina. En este contexto, se recuperó la eficiencia para transfructosilación de la versión truncada IslA4 alcanzando una especificidad hacia transferencia de 70%, encontrándose que cuando se emplean concentraciones altas de sacarosa como sustrato inicial, IslA4 sintetiza una amplia gama de FOS, incluyendo productos característicos de esta actividad tales como 1 y 6-kestosa, neokestosa, nistosa, y f-nistosa, así como FOS de GP>5 no identificados con los estándares disponibles,

Al llevar a cabo estudios comparativos con IslA, la enzima silvestre, se observó que a diferencia de IslA4, sintetiza principalmente polímeros tanto de alto como de bajo peso molecular con actividad restringida hacia la síntesis de FOS, debido a la presencia del dominio de unión a glucano (GBD) en el dominio C-terminal. Este hallazgo permite concluir que IslA4 es una herramienta valiosa para la síntesis de una nueva familia de FOS con efectos prebióticos por explorar.

9. PERSPECTIVAS

- Buscar opciones con el fin de lograr la clonación del inserto *islA4* mutagénico y así obtener el banco de mutantes sobreproductoras de polímero.
- Estudiar a profundidad el mecanismo de síntesis de FOS y polímero con IslA4, así como la elongación de inulinas de alto y bajo peso molecular con IslA para poder explicar detalladamente el efecto observado de las condiciones de reacción en la especificidad.
- Ampliar los estudios de ingeniería de reacción a las versiones truncadas IslA2, Δ NIslA2 e IslA3.
- Purificar los FOS producidos con el fin de determinar su estructura.
- Probar el efecto prebiótico de los FOS sintetizados en diversas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.
- Inmovilizar la enzima para mejorar sus propiedades catalíticas.

10. REFERENCIAS

1. Anwar MA, Kralj S, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. 2008. The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. *Appl Environ Microbiol.* 74: 3426-33.
2. Anwar MA, Kralj S, Villar Piqué A, Leemhuis H, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. 2010. Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology.* 156: 1264-74.
3. Biedrzycka E, Bielecka M. 2004. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci Tech.* 15: 170-5.
4. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-54.
5. Brower V. 2005. A nutraceutical a day may keep the doctor away. *EMBO Rep.* 6: 708-11.
6. Cabanes D, Dehoux P, Dussurget O, Frangeul L, Cossart P. 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 10: 238-45.
7. Cadwell RC, Joyce GF. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Method Applic.* 2: 28-33.
8. Castillo E, López-Munguía A. 2004. Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. *Biotechnol.* 114: 209-17.
9. Chambert R, Gonzy-Tréboul G, Dedonder R. 1974. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem.* 41: 285-300.
10. Chambert R, Gonzy-Tréboul G. 1976. Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Kinetic and Thermodynamic Aspects of Transfructosylation Processes. *Eur J Biochem.* 62: 55-64.
11. Chambert R, Rain-Guion MC, Petit-Glatron MF. 1992. Readthrough of the *Bacillus subtilis* stop codon produces an extend enzyme displaying a higher polymerase activity. *Biochim Biophys Acta.* 1132: 145-53.

12. Chuankhayan P, Hsieh CY, Huang YC, Hsieh YY, Guan HH, Hsieh YC, Tien YC, Chiang CM, Chen CJ. 2010. Crystal structures of *Aspergillus japonicus* fructosyltransferase complex with donor/acceptor substrates reveal complete subsites in the active site for catalysis. *J Biol Chem.* 285: 23251-64.
13. Collins MD, Gibson GR. 1999. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for the nutritional modulation of microbial ecology. *Am J Clin Nutr.* 69: 1052s-7s.
14. Crittenden RG, Doelle HW. 1994. Identification and characterization of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* ATCC 39676. *Appl Microbiol Biotechnol.* 41: 302-8.
15. Davies G, Wilson K, Henrissat B. 1997. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J.* 321: 557-9.
16. Del Moral S, Olvera C, Rodríguez ME, López-Munguía A. 2008. Functional role of the additional domains in inulosucrase (IslA) from *Leuconostoc citreum* CW28. *BCM Biochem.* 9: 6.
17. Ebisu S, Kato K, Kotani S, Misuki A. 1975. Structural differences in fructans elaborated by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus salivarius*. *J Biochem.* 78: 879-87.
18. Euzenat O, Gilbert A, Combes D. 1997. Production of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochem.* 32: 237-43.
19. Falconer DJ, Rupendra M, Robyt JF. 2011. Biosynthesis of dextrans with different molecular weights by selecting the concentration of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextransucrase, the sucrose concentration, and the temperature. *Carbohydr Res.* 346: 280-4.
20. Gibson R, Probert M, Rastall R. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 17: 259-75.
21. Giffard P, Jacques N. 1994. Definition of a fundamental repeating unit in streptococcal glucosyltransferase glucan-binding regions and related sequences. *J Dent Res.* 73: 1133-41.
22. Guigoz Y, Rochat F, Perruisseau-Carrier G, Rochat I, Schiffrin EJ. 2002. Effects of oligosaccharide on the faecal flora and non-specific immune system in elderly people. *Nutr Res.* 22: 3-25.

23. Hang YD, Woodams EE, Jang KY. 1995. Enzymatic conversion of sucrose to kestose by fungal extracellular fructosyl transferase. *Biotechnol Lett.* 17: 295-8.
24. Harmsen HJM, Raangs GC, Franks AH, Wildeboer-Veloo CM, Welling GW. 2002. The effect of the prebiotic inulin and the probiotic *Bifidobacterium longum* on the fecal microflora of healthy volunteers measured by FISH and DGGE. *Microb Ecol Health Dis.* 14: 211-9.
25. Hendry J. 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans—a climatological biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist.* 123: 3-14.
26. Hendry GAF, Wallace RK. 1993. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. En: Suzuki M, Chatterton NJ, editores. *Science and Technology of Fructans.* Boca Raton FL: CRC Press. pp 119-39.
27. Henrissat B, Davies G. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol.* 7: 637-44.
28. Hinch DK, Hellwege EM, Heyer AG, Crowe JH. 2000. Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. *Eur J Biochem.* 267: 535-40.
29. Jackson KG, Taylor GRJ, Clohessy AM, Williams CM. 1999. The effect of the daily intake of inulin on fasting lipid, insulin and glucose concentrations in middle-aged men and women. *Br J Nutr.* 82: 23-30.
30. Joucla G, Pizzut S, Monsan P, Remaud-Simeon M. 2006. Construction of a fully active truncated alternansucrase partially deleted of its carboxy-terminal domain. *FEBS Lett.* 580: 763-8.
31. Katapodis P, Kalogeris E, Kekos D, Macris BJ. 2004. Biosynthesis of fructo-oligosaccharides by *Sporotrichum thermophile* during submerged batch cultivation in high sucrose media. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63: 378-82.
32. Kato C, Kuramitsu HK. 1990. Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme. *FEMS Microbiol Lett.* 72: 299-302.
33. Kaur N, Gupta AK. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci.* 27: 703-14.

34. Kawakami A, Yoshida M. 2002. Molecular characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose:fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66: 2297-305.
35. Konishi N, Torii Y, Yamamoto T, Miyagi A, Ohta H, Fukui K, Hanamoto S, Matsuno H, Komatsu H, Kodama T, Katayama E. 1999. Structure and enzymatic properties of genetically truncated forms of the water-insoluble glucan-synthesizing glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. *J Biochem.* 126: 287-95.
36. Kralj S, van Geel-Schutten GH, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. 2004. Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* reuteransucrase. *Microbiology.* 150: 2099-112.
37. Lopez MG, Mancilla-Margalli NA, Mendoza-Diaz G. 2003. Molecular Structures of Fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *J Agric Food Chem.* 51: 7835-40.
38. L'Hocine L, Wang Z, Jiang B, Xu S. 2000. Purification and partial characterization of fructosyl transferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023. *J Biotechnol.* 81: 73-84.
39. Meng G, Fütterer K. 2003. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struct Biol.* 11: 935-41.
40. Meng G, Fütterer K. 2008. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct Biol.* 8: 16.
41. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31: 426-8.
42. Monchois V, Reverte A, Remaud-Simeon M, Monsan P, Willemot RM. 1998. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. *Appl Environ Microbiol.* 64: 1644-9.
43. Monchois V, Vignon M, Russell RRB. 1999. Isolation of key amino acid residues at the N-terminal end of the core region *Streptococcus downei* glucansucrase, GTF-I. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52: 660-5.

44. Moore NCC, Yang L-P, Storm H, Oliva-Hemker M, Saavedra JM. 2003. Effects of fructo-oligosaccharide-supplemented infant cereal: a double-blind, randomized trial. *Br J Nutr.* 90: 581–7.
45. Moulis C, Joucla G, Harrison D, Fabre E, Potocki-Veronese G, Monsan P, Remaud-Simeon M. 2006. Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *J Biol Chem.* 281: 31254-67.
46. Niness KR. 1999. Inulin and oligofructose: What are they? *J Nutr.* 129: 1402S-6S.
47. Olivares-Illana V, Wachter-Rodarte C, Le Borgne S, López-Munguía A. 2002. Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan Origin. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 28: 112-7.
48. Olivares-Illana V, López-Munguía A, Olvera C. 2003. Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within glucosyltransferase. *J Bacteriol.* 185: 3606-12.
49. Olvera C, Centeno-Lejia S, López-Munguía A. 2007. Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Int J Gen Mol Microbiol Antonie van Leewenhoek.* 92: 11-20.
50. Ortiz-Soto ME, Olivares-Illana V, López-Munguía A. 2004. Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis. *Biocatal Biotrans.* 22: 275-81.
51. Ortiz-Soto ME, Rivera M, Rudiño-Piñera E, Olvera C, López-Munguía A. 2008. Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Eng Des Sel.* 21: 589-95.
52. Oscarson S, Sehgelmeble FW. 2002. Chemical synthesis of inulin and levan structures. *J Org Chem.* 67: 8457-62.
53. Ozimek LK, Kralj S, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. 2006. The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyze processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology.* 152: 1187-96.
54. Pijning T, Anwar MA, Böger M, Dobruchowska JM, Leemhuis H, Kralj S, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. 2011. Crystal structure of inulosucrase from

- Lactobacillus*: insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *J Mol Biol.* 412: 80-93.
55. Porrás-Domínguez JR. 2012. Obtención de fructooligosacáridos a partir de levanas bacterianas mediante el uso de endolevanasas. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
 56. Raga-Carbajal E. (En desarrollo). Estudios del mecanismo de elongación de levanas de SacB de *Bacillus subtilis*. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
 57. Rehm J, Willmitzer L, Heyer AG. 1998. Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. *J Bacteriol.* 180: 1305-10.
 58. Roberfroid MB. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr.* 71: 1682S-7S.
 59. Rodríguez-Alegría ME, Enciso-Rodríguez A, Ortiz-Soto ME, Cassani J, Olvera C, López-Munguía A. 2010. Fructooligosaccharide production by a truncated *Leuconostoc citreum* inulosucrase mutant. *Biocatal Biotrans.* 28: 51-9.
 60. Rosell KG, Birkhed D. 1974. An inulin-like fructan produced by *Streptococcus mutans* strain JC2. *Acta Chem Scand B.* 28: 589.
 61. Sangeetha PT, Ramesh MN, Prapulla SG. 2004. Production of fructooligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. *Process Biochem.* 39: 753-8.
 62. Sangeetha PT, Ramesh MN, Prapulla SG. 2005a. Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. *Process Biochem.* 40: 1085-8.
 63. Sangeetha PT, Ramesh MN, Prapulla SG. 2005b. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci Tech.* 16: 442-57.
 64. Schwab C, Walter J, Tannock GW, Vogel RF, Ganzle MG. 2007. Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*. *Syst Appl Microbiol.* 30: 433-43.

65. Seibel J, Moraru R, Götze S. 2005. Biocatalytic and chemical investigations in the synthesis of sucrose analogues. *Tetrahedron*. 61: 7081-6.
66. Song DD, Jacques NA. 1999. Purification and enzymatic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem J*. 341: 285-91.
67. Tiekling M, Ehrmann MA, Vogel RF, Gänzle MG. 2005. Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl Microbiol Biotechnol*. 66: 655-63.
68. van der Veen BA, Skov LK, Potocki-Véronèse G, Gajhede M, Monsan P, Remaud-Simeon M. 2006. Increased amylosucrase activity and specificity, and identification of regions important for activity, specificity and stability through molecular evolution. *FEBS*. 273: 673-81.
69. van Hijum SAFT, van Geel-Schutten GH, Rahaoui H, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. 2002. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol*. 68: 4390-8.
70. van Hijum SAFT, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L, van Geel-Schutten IGH. 2006. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 70: 157-76.
71. Vjin I, Smeekens S. 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol*. 120: 351-60.
72. Wachter-Rodarte C. 1995. Estudio sobre la microbiología del pozol. Tesis Doctoral. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
73. Wada T, Ohguchi M, Iwai Y. 2003. A novel enzyme of *Bacillus sp.* 217C-11 that produces inulin from sucrose. *Biosci Biotechnol Biochem*. 67: 1327-34.
74. Wang XD, Rakshit SK. 2000. Isooligosaccharide production by multiple forms of transferase enzymes from *Aspergillus foetidus*. *Process Biochem*. 35: 771-5.
75. Yun JW. 1996. Fructooligosaccharides—occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microb Technol*. 19: 107–17.