



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA REGIÓN DE TRANSICIÓN DE LevC  
EN MUTANTES DE LA LEVANSACARASA SACB DE *B. subtilis***

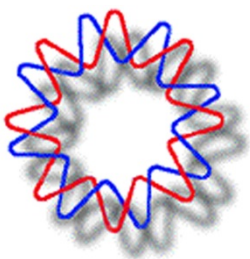
**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

**Paulina Ruiz Leyva**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Agustín López-Munguía Canales**



Cuernavaca, Morelos. Junio 2012



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Tecnología enzimática del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Agustín López Munguía.

El proyecto fue financiado por la UNAM con el apoyo de PAPIIT-DGAPA no. IN212311-3 y por CONACyT Ciencia Básica con el proyecto no. 81637 y la beca no. 234792.

*Con mucho cariño le dedico esta tesis a mi familia, quien ha sido partícipe tanto de mis logros como de mis tropiezos.*

*A mi abuela Meche y mi abuela Esperanza, las dos mujeres que más admiro.*

*A mis tutores, quienes me han formado en aspectos que van más allá de lo académico.*

*A Clau V., Aurora, Arlene, Arlette, Nancy, Sara, Edith, Anabel, Gina y Fer, por los sushis, chelas, tacos, cafés y las risas, lágrimas y enojos compartidos.*

*A Dago, por todo lo que hemos compartido.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Agustín López por la asesoría y apoyo durante mi formación como MC.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Marcela Ayala, Dra. Gloria Saab por sus valiosas contribuciones para realizar este proyecto.

A los integrantes del jurado: Dr. Gerardo Corzo, Dra. Isabel Gómez, Dra. Claudia Martínez, Dra. Romina M. Rodríguez y Dr. Sergio Aguila por sus valiosos comentarios y aportaciones durante la revisión de esta tesis.

A los Dres. Edmundo Castillo y Clarita Olvera por contribuir a las discusiones que enriquecieron este trabajo.

A Fernando Gonzalez, Ma. Elena Rodríguez y Aurelia Campo por el apoyo técnico.

A todos los miembros del grupo ALM.

Al personal de secuenciación de área de cómputo por el eficiente servicio brindado.

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY .....</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>4. ANTECEDENTES.....</b>	<b>7</b>
<b>4.1 FRUCTANAS.....</b>	<b>7</b>
<b>4.2 USOS Y APLICACIONES .....</b>	<b>9</b>
<b>4.3 FRUCTOSILTRANSFERASAS.....</b>	<b>10</b>
<b>4.4 ESTRUCTURA DE LAS FRUCTOSILTRANSFERASAS.....</b>	<b>13</b>
4.4.1 Estructura primaria	13
4.4.2 Sitio de unión a calcio	15
4.4.3 Estructura tridimensional	16
<b>4.5 MECANISMO CINÉTICO .....</b>	<b>18</b>
<b>4.6 RESIDUOS ADYACENTES AL SITIO ACTIVO IMPLICADOS EN LA FUNCIÓN DE SacB DE <i>B. subtilis</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>4.7 ACTIVIDADES TRANSFERASA E HIDROLÍTICA.....</b>	<b>24</b>
<b>4.8 FRUCTOSILTRANFERASAS DE <i>Leuconostoc sp.</i>.....</b>	<b>25</b>
4.8.1 Inulosacarasa de <i>Leuconostoc citreum</i> CW28 (IsIA)	26

## ÍNDICE

---

4.8.2 Levansacarosas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	26
4.8.3 Papel funcional de los dominios adicionales de las fructosiltransferasas de <i>Leuconostoc sp.</i>	28
<b>4.9 GENERACIÓN DE NUEVAS FUNCIONES POR LA COMBINACIÓN DE DOMINIOS .....</b>	<b>30</b>
<b>4.10 QUIMERAS DE FRUCTOSILTRANSFERASAS CON ALTA EFICIENCIA PARA LA TRANSFRUCTOSILACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>6. HIPÓTESIS.....</b>	<b>37</b>
<b>7. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>38</b>
<b>8. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>38</b>
<b>9. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>9.1 CONSTRUCCIÓN DE LAS QUIMERAS .....</b>	<b>39</b>
<b>9.2 MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA.....</b>	<b>39</b>
<b>9.3 CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE MUTAGÉNESIS .....</b>	<b>41</b>
9.3.1 Vector de expresión	41
9.3.2 Transformación	41
9.3.3 Secuenciación del inserto	42

---

**9.4 EXPRESION HETERÓLOGA DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

**43**

9.4.1	Expresión	43
9.4.2	Cuantificación de proteína	44
9.4.3	Análisis de las proteínas recombinantes	44
9.4.4	Tinción con azul de Coomassie para visualización de proteína	44
9.4.5	Purificación de las proteínas	44

**9.5 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD .....45**

9.5.1	Determinación de la actividad enzimática por azúcares reductores	45
9.5.2	Determinación de la tasa de hidrólisis/transferencia	46

**9.6 ANÁLISIS DEL PERFIL DE PRODUCTOS .....47**

9.6.1	Análisis del perfil de fructo-oligosacáridos	47
9.6.2	Obtención del perfil de polímero	47

**9.7 CONSTRUCCIÓN Y SIMULACIÓN MOLECULAR DE UN MODELO DE SACBTnLevC .....47**

9.7.1	Modelamiento de SacBTnLevC	47
9.7.2	Preparación de los modelos SacBTnLevC y SacB	48
9.7.3	Cálculo de RMSD y RMSF	50
9.7.4	Cálculo de interacciones energéticas no enlazantes	51

**10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 52**

**10.1 CONSTRUCCIÓN, CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LAS QUIMERAS R433ATn, R360STn y Y429NTn. ....52**

10.1.1	Construcción y clonación de las mutantes quiméricas	52
10.1.2	Expresión de las quimeras	53



## ÍNDICE

---

<b>10.2 RECUPERACIÓN DE LAS QUIMERAS A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSIÓN.....</b>	<b>56</b>
<b>10.3 RELACIÓN HIDRÓLISIS/ TRANSFERENCIA.....</b>	<b>58</b>
<b>10.4 PERFIL DE PRODUCTOS DE QUIMERAS Y MUTANTES .....</b>	<b>60</b>
10.4.1 Perfil de fructo-oligosacáridos	60
10.4.2 Síntesis de polímero	63
<b>10.5 CONSTRUCCIÓN Y SIMULACIONES MOLECULARES DE UN MODELO DE LA QUIMERA SacBTnLevC.....</b>	<b>68</b>
10.5.1 Construcción de un modelo de la quimera SacBTnLevC	68
10.5.2 Simulaciones moleculares del modelo de SacBTnLevC	70
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>12. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>80</b>
<b>13. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>81</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación de estructura de A) inulina y B) levana. .... 7
- Figura 2.** Reacciones catalizadas por las fructosiltransferasas (adaptado de esquema de Martínez-Fleites et al. 2005). A) Hidrólisis de la sacarosa, B) Transferencia a sacarosa y/o fructana y C) Síntesis de fructósido. .... 11
- Figura 3.** Esquema representativo de las FTF unidominio y multidominio. .... 14
- Figura 4.** Estructura de la levansacarasa de *B. subtilis*, A) las hojas  $\beta$  están coloreadas como arcoíris de acuerdo a la secuencia, inicia con la hoja en el N-terminal de color azul y la hoja en el C-terminal en color rojo. Las hélices se muestran en color morado. Los motivos conservados: RDP en rosa, EWSG en rojo, VWD en amarillo, TYS en verde y DEIER en azul. B) Estructura tridimensional en complejo con la sacarosa. Se resaltan en color morado los residuos catalíticos y la molécula de sacarosa se muestra como superficie. .... 16
- Figura 5.** Contactos de los aminoácidos del sitio activo de SacB de *B. subtilis* A) con sacarosa. Los asteriscos representan moléculas de agua, la línea verde representa la distancia del nucleófilo Asp86 con el C2 del residuo fructosilo y las líneas rosas representan enlaces de hidrógeno. B) con rafinosa. Las líneas verdes punteadas representan las interacciones por enlaces de hidrógeno, las pestañas rojas representan interacciones hidrofóbicas o fuerzas de van der Waals (Meng y Fütterer 2008). .... 18
- Figura 6.** Modelo del mecanismo Ping-Pong Bi Bi (Notación de Cleland) propuesto para la levansacarasa. E: enzima; S: sacarosa; G: glucosa; F: residuo fructosilo; L(n): levana con “n” residuos de fructosa. .... 19

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 7.</b> Modelo del mecanismo de doble desplazamiento de las FTFs. (Adaptado del artículo de Homman et al. 2007). .....	20
<b>Figura 8.</b> Interacciones interatómicas de los aminoácidos A) R433, B) R360 y C) Y429 con sacarosa, moléculas de agua (amarillo) y otros residuos cercanos.....	23
<b>Figura 9.</b> Esquema de la estructura primaria de las FTFs de <i>Leuconostoc</i> sp. ....	25
<b>Figura 10.</b> Versiones truncadas de IsIA. IsIA: enzima WT, IsIA2: deleción del dominio C-terminal, IsIA3: deleción de la región de transición y dominio C-terminal, IsIA4: deleción de regiones N/C- terminal. ....	29
<b>Figura 11.</b> Esquema del diseño de las quimeras generadas a partir del dominio catalítico de la levansacarasa SacB y la fusión de los C-terminal de las FTF's de <i>Leuconostoc</i> sp y el C-terminal de DsrP, una GTF.....	34
<b>Figura 12.</b> Esquema de la estructura primaria de SacBTnLevC que dio lugar a la construcciones de las quimeras de mutantes de SacB. En gris, el dominio catalítico de SacB, en fondo blanco punteado la región de transición.....	39
<b>Figura 13.</b> A) Sistema SacBTnLevC en caja ortorrómbica y B) SacB en caja de agua. Las moléculas de agua están representadas en turquesa.....	49
<b>Figura 14.</b> Esquema de las mutantes de SacB y las mutantes quiméricas generadas a partir de la región de transición de LevC de <i>L. mesenteroides</i> y las mutantes de SacB de <i>Bacillus subtilis</i> . ....	53
<b>Figura 15.</b> Extractos (a) solubles y (b) insolubles (restos celulares) de las células que espesan las diferentes quimeras. M) Marcador de peso molecular, 1) SacBTn-LevC, 2) R433ATn, 3) R360STn, 4) Y429NTn .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

- Figura 16.** Extractos solubles de las mutantes y quimeras expresadas. M) Marcador de peso molecular, 1) SacB, 2) SacBTnLevC, 3) R433A, 4) R433ATn, 5) R360S, 6) R360STn, 7) Y429NTn, 8) Y429NTn. .... 54
- Figura 17.** SDS-PAGE de las enzimas puras y replegadas. M) Marcador de peso molecular, 1) SacB, 2) SacBTnLevC, 3) R433A, 4) R433ATn, 5) R360S, 6) R360STn, 7) Y429N y 8) Y429NTn. .... 56
- Figura 18.** Relación hidrólisis/transferencia en la reacción de las quimeras y las mutantes. Se muestra el porcentaje de conversión de sacarosa referente al porcentaje transferido (gris) y el porcentaje de sustrato hidrolizado (blanco). Condiciones de reacción: 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5U/mL y ~80% de conversión. .... 59
- Figura 19.** FOS producidos por SacB (azul) y SacBTnLevC (negro) a partir de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5U/mL y ~80% de conversión. El perfil de productos se analizó por HPLC utilizando una columna C-18. .... 61
- Figura 20.** FOS producidos por R433A (negro) y R433ATn (rosa) a partir de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5U/mL y ~80% de conversión. El perfil de productos se analizó por HPLC utilizando una columna C-18. .... 62
- Figura 21.** FOS producidos por R360S (negro) y R360STn (azul) obtenidos a partir de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5U/mL y ~80% de conversión. El perfil de productos se analizó por HPLC utilizando una columna C-18. .... 62
- Figura 22.** FOS producidos por Y429N (negro) y Y429NTn (rojo) a partir de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5U/mL y ~80% de conversión. El perfil de productos se analizó por HPLC utilizando una columna C-18. .... 63

- Figura 23.** Polímero de SacB (línea azul) y SacBTnLevC (línea negra) obtenido a partir de una reacción a partir de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5U/mL y ~80% de conversión. SacB presenta una distribución bimodal de polímero con una masa molecular de 3500 y 8.3 KDa. SacBTnLevC sólo produce plímero de 3500 KDa. El perfil de productos se analizó por HPLC utilizando un arreglo serial de columnas Ultrahydrogel U500 y Linear . ..... 65
- Figura 24.** Polímero producido por R433A (línea negra) y R433ATn (línea rosa) una reacción a partir de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5U/mL y ~80% de conversión. R433A no produce polímero de forma significativa mientras que R433ATn produce polímero de 3500 KDa y de masa molecular intermedia. El perfil de productos se analizó por HPLC utilizando un arreglo serial de columnas Ultrahydrogel U500 y Linear ..... 66
- Figura 25.** Cromatograma obtenido a partir del análisis de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5U/mL y ~80% de conversión de A) R360S(negro), R360STn (azul) y SacB como control (verde) y B) Y429N (azul), Y429NTn (rojo) y SacB como control (negro). El análisis se realizó por HPLC utilizando un arreglo serial de columnas Ultrahydrogel U500 y Linear..... 67
- Figura 26.** Modelo de la quimera SacBTnLevC. Residuos pertenecientes al dominio catalítico (34-473) coloreados en turquesa, residuos pertenecientes a la región de transición (474-601) coloreados en violeta. .... 69
- Figura 27.** Esquema de los resultados obtenidos con la simulación molecular del modelo de SacBTnLevC. A) Modelo inicial de SacBTnLevC. B) Modelo de SacBTnLevC después de la minimización y los pasos calentamiento simulado o “simulated annealing” (SA). C) Representación de la movilidad del modelo de SacBTnLevC a lo largo de la simulación. Dominio catalítico de SacB en turquesa, en violeta la región de transición de LevC. .... 71

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

- Figura 28.** A) RMSD de SacBTnLevC (rojo), y por separado dominio catalítico (naranja) y región de transición (verde) de SacBTnLevC. RMSF de la cadena principal de la quimera SacBTnLevC. B) RMSF de SacBTnLevC. El dominio catalítico abarca del residuo 34 al 473 y la región de transición del residuo 474 a 601. .... 72
- Figura 29.** A) RMSD de los dominios catalíticos de SacB (azul) y SacBTnLevC (rojo). B) Superposición de los dominios de SacB y SacBTnLevC en referencia al RMSD calculado para cada uno de ellos. .... 73
- Figura 30.** RMSF de los dominios catalíticos de SacBTnLevC (rojo), SacB (azul); región de transición (turquesa). Se muestra además un esquema de las zonas en donde se destacan las fluctuaciones más importantes en ambas proteínas... 75

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Parámetros cinéticos, estabilidad y pH óptimo de SacB y las mutantes productoras de FOS. ....	22
<b>Tabla 2.</b> Propiedades cinéticas y bioquímicas de la inulosacarasa IsIA de <i>L. citreum</i> CW28 y sus versiones truncadas (del Moral et al. 2008). ....	29
<b>Tabla 3.</b> Parámetros cinéticos de la levansacarasa SacB y sus quimeras SacB-Tn-IsIA y SacB-Tn-LevC. ....	34
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y fusión de los genes. ....	40
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de los ciclos en la reacción de PCR para la mutagénesis sitio-dirigida. ....	40
<b>Tabla 6.</b> Medio sólido Luria Bertani (LB) para el aislamiento de <i>E. coli</i> transformadas. ....	41
<b>Tabla 7.</b> Medio SOC para la recuperación de células <i>E. coli</i> después del tratamiento térmico para transformarlas. ....	42
<b>Tabla 8.</b> Medio YT2X para la producción de enzimas recombinantes en <i>E. coli</i> TOP 10. ....	43
<b>Tabla 9.</b> Secuencia de los pasos de minimización de los sistemas SacBTnLevC y SacB en complejo con sacarosa. ....	49
<b>Tabla 10.</b> Condiciones utilizadas durante la simulación de calentamiento. ....	50
<b>Tabla 11.</b> Tamaño del gen, peso molecular y actividad de la enzima de las mutantes y quimeras a partir de extractos celulares totales. ....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

---

**Tabla 12.** Actividades específicas globales de SacB, mutantes y quimeras. .... 57

**Tabla 13.** Energías no enlazantes en el sistema SacB-Sacarosa y SacBTnLevC-Sacarosa ..... 77



## ABREVIATURAS

<b>AMM</b>	Alta masa molecular
<b>ASR</b>	Alternansacarasa
<b>BA</b>	$\beta$ -amilasa
<b>BMM</b>	Baja masa molecular
<b>BG</b>	$\beta$ -glucosidasa
<b><i>B. adolescentis</i></b>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<b><i>B. amyloliquefaciens</i></b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<b><i>B. breve</i></b>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<b><i>B. longum</i></b>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<b><i>B. megaterium</i></b>	<i>Bacillus megaterium</i>
<b><i>B. pseudocatenulatum</i></b>	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
<b><i>B. subtilis</i></b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>CPC</b>	Condiciones periódicas de contorno
<b>DNS</b>	Ácido dinitrosalicílico
<b>DM</b>	Dinámica molecular
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminico
<b>EF</b>	Enzima-Fructosilo
<b>ES</b>	Enzima-Sustrato
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>FOS</b>	Fructo-oligosacáridos
<b>FTF(s)</b>	Fructosiltransferasa(s)
<b>GH68</b>	Glicosilhidrolasas, familia 68
<b>GTF(s)</b>	Glucosiltransferasa(s)
<b><i>G. diazotrophicus</i></b>	<i>Gluconoacetobacter diazotrophicus</i>
<b>GnHcl</b>	Cloruro de guanidina
<b>GP</b>	Grado de polimerización
<b>H/T</b>	Hidrólisis/Transferencia
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Cromatography (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento)

## ABREVIATURAS

---

<b>IR</b>	Índice de refracción
<b>IS</b>	Inulosacarasa(s)
<b><i>L. johnsonii</i></b>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<b><i>L. reuteri</i></b>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<b><i>L. panis</i></b>	<i>Lactobacillus panis</i>
<b><i>L. sanfranciscensis</i></b>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
<b><i>L. citreum</i></b>	<i>Leuconostoc citreum</i>
<b><i>L. mesenteroides</i></b>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<b>LS</b>	Levansacarasa(s)
<b>min</b>	minutos
<b>ns</b>	nanosegundos
<b>ps</b>	Picosegundos
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>RMSD</b>	Root mean square deviation (Desviación media cuadrática)
<b>RMSF</b>	Root mean square fluctuation (Fluctuación media cuadrática)
<b>SA</b>	Simulated annealing (Simulación de calentamiento)
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Electroforésis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico)
<b>sp</b>	Especie
<b>ssp</b>	<i>Subespecie</i>
<b><i>S. salivarius</i></b>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<b>TnLevC</b>	Región de transición de LevC
<b>TS</b>	Trealosa sintetasa

## 1. RESUMEN

La levansacarasa (LS) SacB de *Bacillus subtilis* es una fructosiltransferasa (FTF) unidominio que sintetiza un polímero de tipo levana a partir de la transferencia de residuos fructosilo de la sacarosa a una cadena de polímero creciente. Sin embargo, la síntesis de levana está limitada por la hidrólisis del sustrato ya que el agua también puede participar como aceptor. Por otro lado, las FTFs del género *Leuconostoc* se caracterizan por presentar dominios adicionales en las regiones N y C-terminal con identidad a glucosiltransferasas (GTFs) que confieren a la enzima una mayor capacidad de transfructosilación, además de la capacidad de unirse a pared celular. Olvera-Carranza *et al.* (2012) observaron una tasa de transferencia a polímero de hasta un 90% en quimeras de SacB a las que se les fusionó una fracción del C-terminal de dos FTF multidominio: IslA y LevC denominada “región de transición” (SacBTnIslA y SacBTnLevC, respectivamente).

En el presente trabajo se utilizaron mutantes de SacB reportadas como productoras de fructo-oligosacáridos y altamente hidrolíticas (R433A, Y429N y R360S) para construir quimeras a través de la fusión de la región de transición de LevC en su extremo C-terminal, con el fin de estudiar el efecto que la adición de esta región tendría en ellas.

Se encontró que la región de transición de LevC, además de conferir una mayor capacidad para la transfructosilación, permite que se sintetice polímero de alta masa molecular (AMS) modificando el perfil bimodal que caracteriza a la levana que sintetiza SacB. De forma similar, la quimera R433ATn presentó una tasa de transferencia de 35% en comparación con la mutante R433A que sólo transfiere un 15% del sustrato. Al igual que SacBTnLevC, R433ATn produce un polímero de AMS. Sin embargo, el efecto de la región de transición en la transferencia hacia polímero que se observó en estas dos quimeras no puede generalizarse a cualquier FTF unidominio, ya que las

## RESUMEN

---

quimeras R360STn y Y429NTn, presentan tasas de hidrólisis/transferencia y un perfil de productos similares a las mutantes R360S y Y429N.

La integración de los resultados experimentales obtenidos a lo largo de este trabajo con el análisis de la simulación molecular de un modelo de SacBTnLevC sugieren que en esta quimera se dieron modificaciones en los residuos involucrados en la unión de la molécula aceptora y diferencias en la energía de interacción con la sacarosa con respecto a SacB.

## 2. SUMMARY

The levansucrase (LS) SacB, from *Bacillus subtilis* a one-domain fructansucrase (FS) that synthesizes a levan-type polymer by transferring fructosyl residues from sucrose to a growing polymer chain. However, the synthesis of levan is limited by substrate hydrolysis since water can also act as an acceptor molecule. On the other hand, FS multidomain from *Leuconostoc* are composed of additional domains in the N- and C-terminal regions with identity to glucansucrases (GS), which confer greater transfer ability to the enzyme, aside from cell wall binding capacity. Olvera-Carranza *et al.* (2012) observed a polymer transfer rate of up to 90%, in chimeras built with SacB and a C-terminal region from two FS multidomain: IsIA and LevC denominated the “transitional region” (SacBTnIsIA and SacBTnLevC).

Throughout this work, SacB mutants described as fructo-oligosaccharide producers and highly hydrolytic (R433A, R360S, and Y429N), were used to build chimeras through the addition of LevC’s transitional region to their C-Terminal end, with the aim of further studying the effect the “transitional region” would have on them.

It was found that LevC’s transitional region allowed high molecular mass (HMM) polymer to be synthesized, besides the greater polymer transfer capacity already seen in SacBTnLevC, modifying the bimodal profile known for SacB’s levan. In a similar way, R433ATn showed a transfer rate of 35%, in contrast with the mutant R433A that transferred 15% of the substrate used. As observed with SacBTnLevC, R433ATn synthesizes a HMM polymer. However, the effect of the transitional region in polymer production observed with these two chimeras could not be accounted for the chimeras R360STn and Y429NTn, whose Hydrolysis/Transfer rate and product profile remained similar to mutants R360S and Y429N.

The integration of the experimental results obtained throughout this work with the analysis of a molecular simulation of a SacBTnLevC’s model, suggest that there are structural modifications

## SUMMARY

.....

in residues involved with acceptor binding, as well as differences in the sucrose- binding interactions compared to SacB.



### 3. INTRODUCCIÓN

Actualmente los productos fructosilados: fructanas, fructo-oligosacáridos (FOS) y fructósidos son de gran interés tanto en la industria alimenticia como en la farmacéutica. Una alternativa para su obtención es el uso de fructosiltransferasas (FTFs), enzimas que sintetizan estos compuestos mediante la transferencia de un residuo fructosilo proveniente de una molécula de sacarosa a una molécula aceptora.

El presente trabajo es producto del esfuerzo de nuestro grupo de investigación por encontrar biocatalizadores eficientes para la síntesis de fructanas y fructósidos con distintas características y propiedades. Para ello se han implementado diversas herramientas de biología molecular e ingeniería de proteínas, y se ha buscado la optimización de procesos enzimáticos estudiando las propiedades y especificidades de distintas FTFs.

En este contexto, se ha utilizado como modelo de estudio la levansacarasa unidominio SacB de *B. subtilis* para llevar a cabo diversos estudios de relación estructura-función. Las levansacarasas son FTFs que sintetizan un polímero de fructosa conocido como levana, que se caracteriza por poseer enlaces de tipo  $\beta$ 2-6 en su cadena principal. SacB, es considerada una enzima robusta debido a que presenta alta estabilidad y solubilidad. Sin embargo, la capacidad de esta enzima para producir levana se ve limitada por la hidrólisis del sustrato, ya que el agua puede actuar como molécula aceptora (Olvera-Carranza *et al* 2012).

En contraste con SacB que posee un sólo dominio estructural, nuestro grupo de trabajo reportó la existencia de una subfamilia de FTF del género *Leuconostoc sp* que posee regiones que flanquean al dominio catalítico con identidad a dominios N- y C-terminal de glucosiltransferasas (enzimas que transfieren el residuo glucosilo de la sacarosa). A diferencia de las FTFs de un sólo dominio como SacB, los miembros de esta subfamilia producen fructanas con una tasa de hidrólisis reducida.



Olvera-Carranza *et al.* (2012) reportaron que es posible combinar las propiedades de estabilidad de SacB con la mayor capacidad para la transferencia de las FTFs multidominio mediante la construcción de quimeras. El dominio catalítico de SacB se fusionó con el C-terminal completo o con una fracción de éste denominada “región de transición”, de dos FTFs multidominio: IsIA y LevC. Dicho trabajo destacó, que con la adición de la región de transición al dominio catalítico de SacB, es posible aumentar la capacidad de transferencia y reducir la hidrólisis del sustrato.

Por tanto, la estrategia de adicionar la región de transición a una FTF unidominio podría representar una alternativa para contender con la hidrólisis del sustrato, ya que esta reacción resulta indeseable si se desean obtener fructanas o fructósidos de forma eficiente. El presente trabajo busca estudiar a mayor profundidad el efecto de esta región tanto en la especificidad de reacción como en la especificidad de productos, en mutantes que a pesar de tener una estructura similar a SacB presentan propiedades distintas.

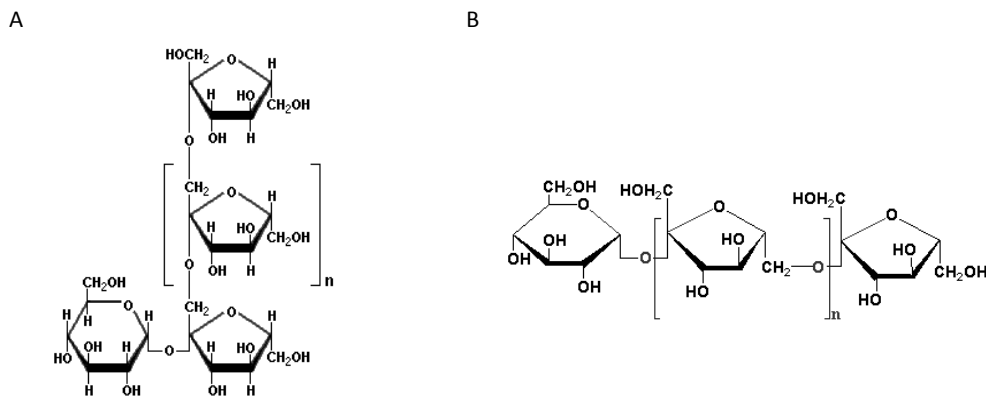


## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 FRUCTANAS

Las fructanas son homopolímeros solubles de  $\beta$ -D-fructofuranosa sintetizados a partir de sacarosa. Su estructura general consiste de una glucosa inicial unida a múltiples unidades de fructosa ( $G-(F)_n-F$ ). Dependiendo de la fuente de la enzima, estos polímeros pueden adquirir diversos grados de polimerización y pueden presentar ramificaciones. Si el grado de polimerización (GP) es menor a 10 unidades de fructosa, las fructanas se distinguen como fructo-oligosacáridos o FOS.

Cuando cada monómero de la cadena principal de las fructanas está unido por enlaces de tipo  $\beta$ 2-1 el polímero se denomina inulina (Fig.1A), pudiendo estar ramificado mediante enlaces de tipo  $\beta$ 2-6. Si la cadena principal está formada por enlaces de tipo  $\beta$ 2-6 el polímero se denomina levana (Fig.1B), y puede presentar ramificaciones con enlaces de tipo  $\beta$ 2-1. La molécula más pequeña de una fructana de tipo inulina es la 1-kestosa y la molécula de tipo levana más pequeña es la 6-kestosa.



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

Las fructanas son sintetizadas de forma natural por algunas plantas dentro de las que se encuentran cereales, pastos y agaves. Son sintetizadas como reserva de

carbohidratos y protección contra desecación y estrés a bajas temperaturas (Vijn y Smeekens 1999). Existe también una gran diversidad de bacterias productoras de fructanas de los géneros *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Actinomyces* (Hendry y Wallace 1993), así como hongos del género *Aspergillus*. Las fructanas de origen bacteriano son principalmente del tipo levana con ramificaciones del tipo  $\beta$ 2-1 y alcanzan un GP de más de 100,000 unidades de fructosa (Dedonder 1966).

Las plantas, a diferencia de las bacterias, producen fructanas que poseen una mayor diversidad estructural (Pollock y Cairns 1991). El GP de las fructanas es menor, generalmente de 30 a 50 residuos de fructosa, aunque en ocasiones puede ser mayor de 200. Además, las cadenas de fructosa suelen estar más ramificadas. En el caso de las plantas se pueden distinguir cinco tipos principales de fructanas: inulina, levana, neoserias de inulina, neoserias de levana y fructanas ramificadas. Las neoserias de inulina son moléculas unidas mediante enlaces  $\beta$ 2-1 que constan de dos cadenas de fructosa, una cadena se encuentra unida a la fructosa de la cadena principal y la otra al C'6 de la unidad de glucosa que forma la sacarosa. Las neoserias de levana, son moléculas similares a las neoserias de inulina pero que poseen enlaces de tipo  $\beta$ 2-6. El trisacárido neo-kestosa es el más pequeño de los oligosacáridos de este grupo. Las fructanas ramificadas, también conocidas como graminanas son moléculas formadas por enlaces de tipo  $\beta$ 2-6 con ramificaciones elongadas en  $\beta$ 2-1, aunque pueden llegar a ser más complejas y combinar neo-azúcares con cadenas ramificadas de fructana. Las agavinas por ejemplo, son fructanas que se encuentran en el agave que pertenecen a este grupo.

La inulina se encuentra en especies de plantas pertenecientes al orden de las Asterales como la chicoria y la alcachofa (Koops y Jonker 1996). Pastos como *Dactylis glomerata* (Bonnett *et al.* 1997) producen levanas de cadena lineal, mientras que las levanas ramificadas se encuentran en especies de plantas pertenecientes a las Poales como el trigo y la cebada (Carpita *et al.* 1989). Las neoserias de inulina se

encuentran en plantas pertenecientes a Liliaceae, como la cebolla y el espárrago (Shiomi 1989). Este tipo de fructanas son producidas por algunas especies de plantas que pertenecen a los Poales como la avena (Livingstone *et al.* 1998).

## **4.2 USOS Y APLICACIONES**

Las fructanas de tipo inulina son consideradas alimentos nutracéuticos, compuestos que además de ser nutritivos, desempeñan una actividad específica en las funciones fisiológicas del organismo humano. Un grupo importante dentro de los alimentos nutracéuticos está constituido por los prebióticos. Los prebióticos son azúcares complejos (generalmente) que resisten la degradación en el tracto digestivo y posteriormente son fermentados en el colon provocando una estimulación selectiva de bacterias benéficas de la microbiota intestinal, como las bifidobacterias. Se ha visto también, que los prebióticos benefician al sistema inmune especialmente en el intestino, y como consecuencia pueden reducir el riesgo de enfermedades gastrointestinales, entre muchos otros beneficios (Roberfroid 2007).

La inulina, por sus propiedades reológicas y sabor neutro se emplea como sustituto de grasa, también mejora las características organolépticas de algunos productos lácteos fermentados, postres como gelatinas y helados, productos horneados como galletas y pasteles y fórmulas de alimento para infantes. Por otra parte, los FOS presentan un sabor dulce y al no ser totalmente digeribles, son utilizados como sustitutos de azúcar de bajo contenido calórico (Roberfroid 2000).

Las levanas ofrecen una gran variedad de aplicaciones potenciales en los campos de la industria cosmética y la farmacéutica. Las levanas de AMM pueden ser utilizadas como goma industrial, mientras que las levanas de baja masa molecular (BMM) como edulcorantes. Debido a las propiedades texturizantes y/o estabilizantes de las levanas, se ha propuesto su aplicación como agente encapsulador y acarreador de sabores y fragancias (Han 1990; Duboc y Mollet 2001). Se han realizado estudios *in vitro* para

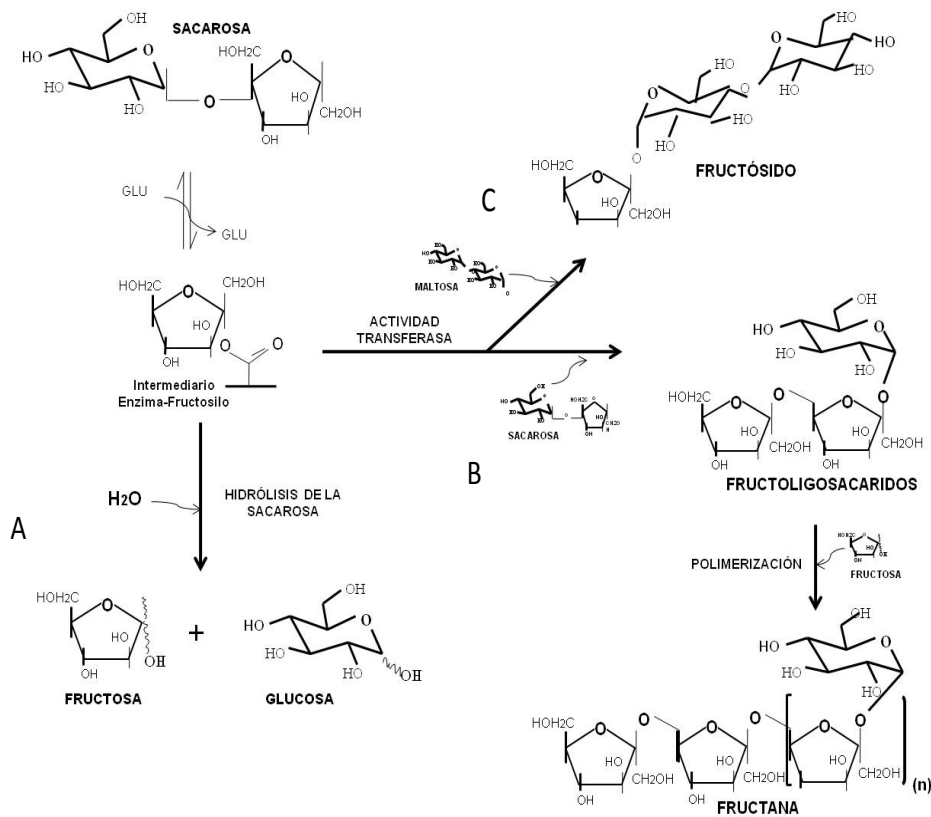
probar la habilidad para diversas bifidobacterias para fermentar levana y FOS de levana utilizando cultivos puros de *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. pseudocatenulatum*, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*. En estos estudios se encontró que el enriquecimiento con FOS de tipo levana resulta ser más efectivo para el proceso fermentativo de estos microorganismos que la levana de AMM. (Marx *et al.* 2000; Kang *et al.* 2002).

### 4.3 FRUCTOSILTRANSFERASAS

Las enzimas que sintetizan fructanas se conocen como fructosiltransferasas (FTFs) (E.C.2.4.1.-). Estas enzimas catalizan la transferencia del grupo fructosilo de la sacarosa (molécula donadora) a una molécula aceptora, liberando la glucosa al medio de reacción. Como moléculas aceptoras pueden actuar aquellas que posean un grupo hidroxilo tales como monosacáridos (glucosa), disacáridos (sacarosa), trisacáridos (rafinosa), fructanas, alcoholes y agua (Dedonder 1966; Tieking *et al.* 2005; Ozimek *et al.* 2006). Las FTF no requieren cofactores ni compuestos fosforilados de alta energía para llevar a cabo la reacción ya que utilizan la energía liberada de la ruptura del enlace glicosídico de la sacarosa para transferir el residuo fructosilo a la molécula aceptora (Chambert y Gonzy-Tréboul 1976).

Cuando el agua participa como aceptor ocurre la hidrólisis de la sacarosa liberándose al medio fructosa y glucosa (Fig. 2A). Esta actividad se define como actividad hidrolasa. Cuando la molécula aceptora es una molécula de sacarosa se inicia la síntesis de fructanas (Fig. 2B), que a su vez actúan como aceptoras dando lugar a un polímero de masa molecular variable (actividad transferasa). Si la FTF sintetiza una fructana de tipo inulina se denomina inulosacarasa (IS), si la fructana que sintetiza es de tipo levana se conoce como levansacarasa (LS). Los productos de transferencia con un GP menor de 10 unidades de fructosa se distinguen como FOS tipo inulina o levana, respectivamente. Si la transfructosilación ocurre hacia moléculas adicionales

al medio de reacción como monosacáridos, oligosacáridos, alcoholes (metanol) o el glicerol se obtienen moléculas denominadas fructósidos (Fig. 2C) (Dedonder R. 1966; Waldherr F. *et al.* 2008). Las FTFs presentan actividad tanto hidrolasa como transferasa, estableciéndose una relación entre ambas actividades (tasa de hidrólisis/transferencia o H/T), que puede considerarse como una medida de la especificidad de la enzima.



**Figura 2.** Reacciones catalizadas por las fructosiltransferasas (adaptado de Martínez-Fleites *et al.* 2005). A) Hidrólisis de la sacarosa, B) Transferencia a sacarosa y/o fructana y C) Síntesis de fructósido.

Las fructanas bacterianas requieren solamente de una FTF para su síntesis y en general, producen FTFs con actividad levansacarasa. Entre las Gram positivas se encuentran *Bacillus subtilis*, *B. circulans*, *B. amyloliquefaciens* y *B. megaterium*

además de *Lactobacillus reuteri*, *L. sanfranciscensis* y *L. panis*, *Leuconostoc mesenteroides* y algunas especies de *Streptococcus*. Entre las Gram negativas reportadas destacan *Zymomonas mobilis*, *Erwinia herbicola* y *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Pseudomonas* pv. *phaseolicola*, *Rahnella aquatilis* y *Gluconacetobacter diazotrophicus*. La función fisiológica de la levana en estos microorganismos está principalmente asociada a la de adhesión a su nicho ecológico. Para algunas especies es un factor de patogenicidad que facilita la infección e invasión. Los exopolisacáridos de *Streptococcus*, entre los que se encuentran glucanas y la levanas, están implicados en la formación de placa dentobacteriana (Rozen *et al.* 2001). *Erwinia amylovora*, que es un fitopatógeno, activa genes de infección que expresan levansacarosas, las que le confieren virulencia ya que favorecen la invasión (Zhao *et al.* 2005).

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

En el reino vegetal, la síntesis de fructanas es llevada a cabo por la acción concertada de varias enzimas. El primer paso de la síntesis involucra la formación del trisacárido 1-kestosa por medio de la transferencia de un residuo de fructosa a la sacarosa realizado por la enzima 1-SST (sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa). En el segundo paso, la enzima 1-FFT (frutana:fructana 1:fructosiltransferasa) intercambia residuos fructosilo de fructana a fructana y así, se sintetizan fructanas de diversos grados de polimerización que llegan a ser de hasta 200 unidades. Otra enzima como la 6-SST (sacarosa:sacarosa 6-fructosiltransferasa) da a las fructanas de origen vegetal una estructura heterogénea, sintetizando 6-kestosa (Duchateau *et al.* 1995).

## 4.4 ESTRUCTURA DE LAS FRUCTOSILTRANSFERASAS

Las fructosiltransferasas están clasificadas dentro de la familia 68 de las glicosilhidrolasas (GH68). Esta familia incluye las FTFs bacterianas y las invertasas de *Zymomonas mobilis* y *Bacillus sp* (CAZY.org). Las glicosilhidrolasas presentan una gran diversidad de plegamientos y de especificidades de sustrato. En la mayoría de los casos, la hidrólisis del enlace glicosídico requiere de la participación de dos residuos (generalmente ácidos) que cumplen la función de donador de protones y de base general o nucleófilo (Davies y Henrissat 1995).

### 4.4.1 Estructura primaria

De acuerdo a su estructura es posible clasificar a las FTFs en dos grupos generales: unidominio y multidominio (Fig. 3). Las bacterias Gram negativas producen FTFs de una masa molecular que varía entre 45 y 65 KDa y están constituidas por un solo dominio de 500 a 800 aminoácidos. Las FTFs de bacterias gram positivas, en cambio, alcanzan una masa molecular de hasta 170 KDa y su estructura está distribuida en tres regiones: una región **N-terminal**, el **dominio catalítico** y una **región C-terminal** relacionadas con la unión a pared celular o a polímero. Las FTFs del género de *Bacillus* y algunas del género *Streptococcus* son una excepción dentro de las bacterias Gram positivas, ya que presentan un solo dominio.

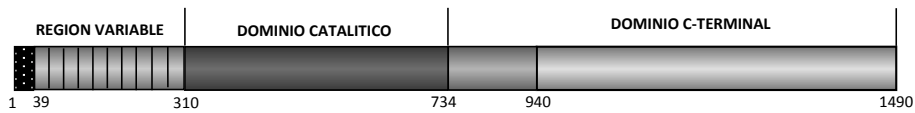
La estructura primaria de las FTFs de bacterias Gram positivas está conformada por una región amino terminal en la que se localiza un péptido señal de alrededor de 35 aminoácidos que transporta la enzima hacia la superficie celular, para que posteriormente sea secretada al medio una vez que ha sido procesada. Seguido del péptido señal hay una secuencia altamente variable (de 100 a 200 aminoácidos) cuya función aún es desconocida. En el caso de *Lactobacillus sanfranciscensis*, el análisis de su estructura primaria reveló que posee 7 elementos de repetición

(DNATSGSTKQESSIAN) con identidad a otras proteínas de secreción o que están localizadas en la superficie celular (Tieking *et al.* 2005).

**Fructosiltransferasa unidominio**



**Fructosiltransferasa multidominio**



**Figura 3.** Esquema representativo de las FTFs unidominio y multidominio.

Seguido del amino terminal se encuentra el dominio catalítico. Este dominio se encuentra conservado dentro de las FTFs y en general está formado por aproximadamente 500 aminoácidos.

Las FTFs poseen en este dominio cinco secuencias mayormente conservadas (motivos) en la familia 68GH: VWD, EWSG, RDP, DEIER y TYS (Fig. 4A). Dentro de estos cinco motivos destacan tres residuos ácidos conservados que corresponden a los residuos catalíticos y que en SacB de *B. subtilis* son el Asp86 en el motivo VWD-86, el Glu342 en el motivo DEIER-343 y el Asp247 en el motivo RDP-248. A pesar de que no participa directamente en la reacción, su función en la catálisis es la de estabilizar el intermediario enzima-fructosilo. A partir de la estructura cristalográfica de la LS SacB de *B. subtilis* se sabe que estos motivos forman parte de la cavidad catalítica y solo DEIER pertenece a un asa o “loop” (Meng y Fütterer 2003).

Las FTFs asociadas a la superficie celular como las del género *Lactobacillus* y la levansacarasa de *Streptococcus salivarius* poseen una región C-terminal de



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

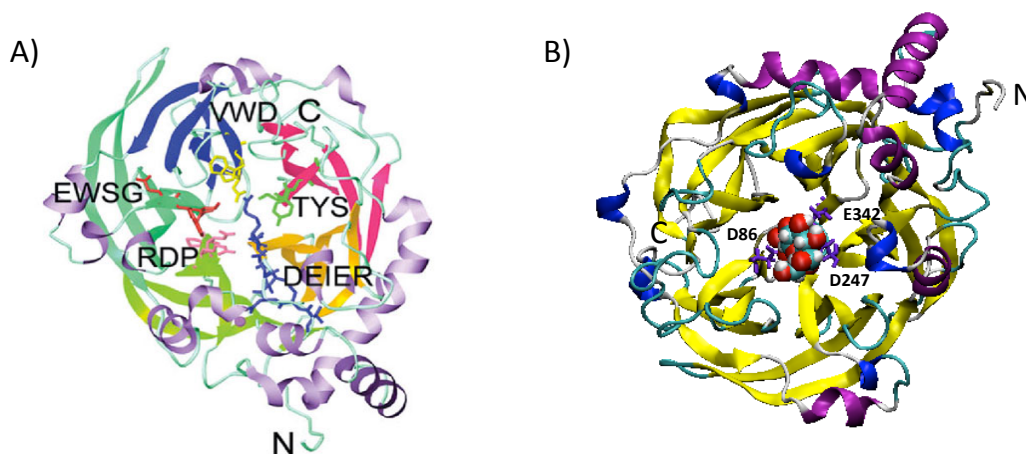
#### 4.4.2 Sitio de unión a calcio

Las FTFs de bacterias Gram positivas poseen una fuerte dependencia al ion calcio para su actividad. El papel funcional de este ion se ha demostrado utilizando varias enzimas del género *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* mediante la incorporación de  $\text{Ca}^{+2}$  y su subsecuente extracción con EDTA (Song y Jacques 1999; Anwar *et al.* 2008; Morales *et al.* 2006). La estructura tridimensional revela que en la LS de *B. subtilis*, el Asp339 presente en el motivo DEIER coordina directamente a un ión  $\text{Ca}^{+2}$ . La mutación del residuo equivalente en la FTF de *Lactobacillus reuteri* permitió observar que el ion tiene una influencia importante en la estructura de la enzima actuando sobre el plegamiento de la proteína y le proporciona mayor estabilidad, lo que redundaría en una mayor capacidad catalítica (Ozimek *et al.* 2005). Por otro lado, el alineamiento de la secuencia de los miembros de la familia GH68 revela que los residuos involucrados en la unión a  $\text{Ca}^{+2}$  están ausentes en las proteínas de bacterias Gram negativas. En el caso de la LS de *G. diazotrophicus* se encontró que la formación de un enlace disulfuro ejerce aparentemente un efecto

similar al del sitio de unión a calcio en la estabilidad de la enzima (Martínez-Fleites *et al.* 2005).

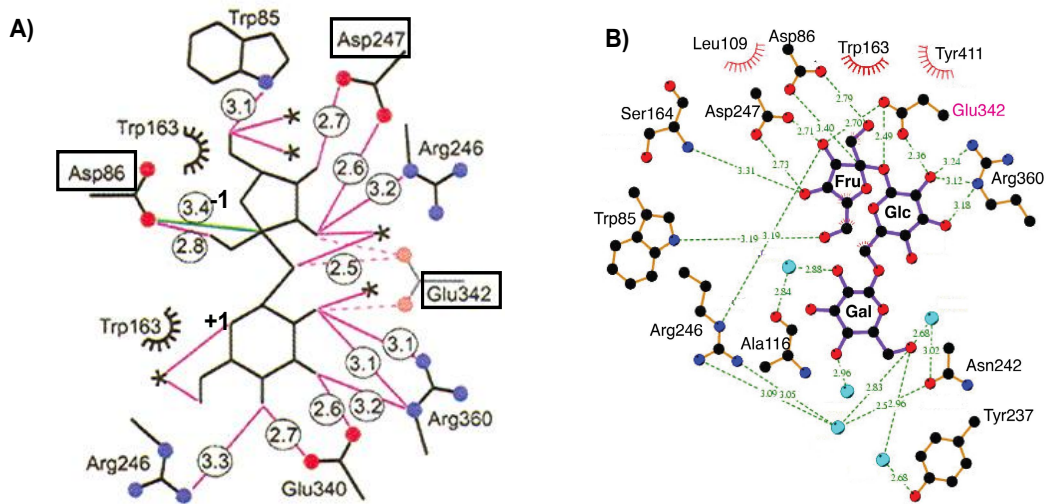
#### 4.4.3 Estructura tridimensional

Actualmente se conocen 4 estructuras de FTFs de bacterias Gram positivas: las LSs SacB de *B. subtilis* y *B. megaterium* (poseen una identidad del 74% a nivel de secuencia y comparten el mismo nombre), la LS LsdA de *G. diazotrophicus* y la IS de *L. johnsonii*. Las cuatro estructuras revelan que el plegamiento está conservado y se trata de una estructura tipo  $\beta$ -propela de 5 hojas con una topología en "W" de 4 hebras  $\beta$ -antiparalelas con una cavidad central en forma de embudo que aloja a los residuos catalíticos (Asp 86, Glu 342 y Asp 247) (Meng y Fütterer 2003; Martínez-Fleites *et al.* 2005; Pijning *et al.* 2011). A manera de ejemplo en la Fig. 4A se esquematiza la estructura de la LS SacB de *B. subtilis*.



**Figura 4.** Estructura de la levansacarasa de *B. subtilis*, A) las hojas  $\beta$  están coloreadas como arcoíris de acuerdo a la secuencia, inicia con la hoja en el N-terminal de color azul y la hoja en el C-terminal en color rojo. Las hélices se muestran en color morado. Los motivos conservados: RDP en rosa, EWSG en rojo, VWD en amarillo, TYS en verde y DEIER en azul. B) Estructura tridimensional en complejo con la sacarosa. Se resaltan en color morado los residuos catalíticos y la molécula de sacarosa se muestra como superficie.

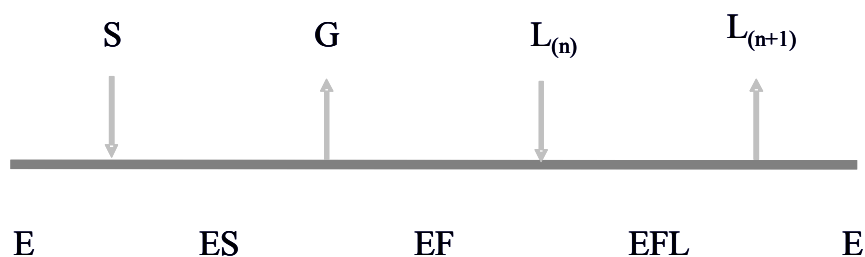
A partir de la estructura cristalográfica de SacB en complejo con la sacarosa (Fig. 4B) se han identificado los aminoácidos que dirigen el posicionamiento del sustrato donador (Meng y Fütterer 2008). De acuerdo con Davies *et al.* (1997), el sitio activo de las GH puede ser dividido en subsitios con respecto a la hidrólisis del enlace glicosídico, de tal forma que los residuos en contacto con la fructosa conforman el subsitio -1 y los residuos en contacto con la glucosa constituyen el subsitio +1. En el caso de SacB (Fig. 5A), el subsitio -1 está formado por los residuos D86, W85, R246, D247 y W163. El subsitio +1 está conformado por R360, E340, E342 y R246 (Ozimek *et al.* 2007). A partir de la estructura cristalográfica de la LS de *B. subtilis* unida a rafinosa (Fig. 5B) se determinó la existencia de un subsitio +2 formado por N242 y Y237, los cuales interaccionan con la molécula de galactosa de la rafinosa de manera indirecta a través de enlaces de hidrógeno mediados por moléculas de agua (Meng y Fütterer 2008). La modificación de la afinidad de los diferentes subsitios por la molécula aceptora puede afectar la especificidad de reacción (hidrólisis de sacarosa o transfructosilación), además de la masa molecular de las fructanas sintetizadas. En contraste con los subsitios +1 y -1, las interacciones de los residuos con los aceptores en los subsitios más alejados son más débiles.



**Figura 5.** Contactos de los aminoácidos del sitio activo de SacB de *B. subtilis* A) con sacarosa. Los asteriscos representan moléculas de agua, la línea verde representa la distancia del nucleófilo Asp86 con el C2 del residuo fructosilo y las líneas rosas representan enlaces de hidrógeno. B) con rafinosa. Las líneas verdes punteadas representan las interacciones por enlaces de hidrógeno, las pestañas rojas representan interacciones hidrofóbicas o fuerzas de van der Waals (Meng y Fütterer 2008).

## 4.5 MECANISMO CINÉTICO

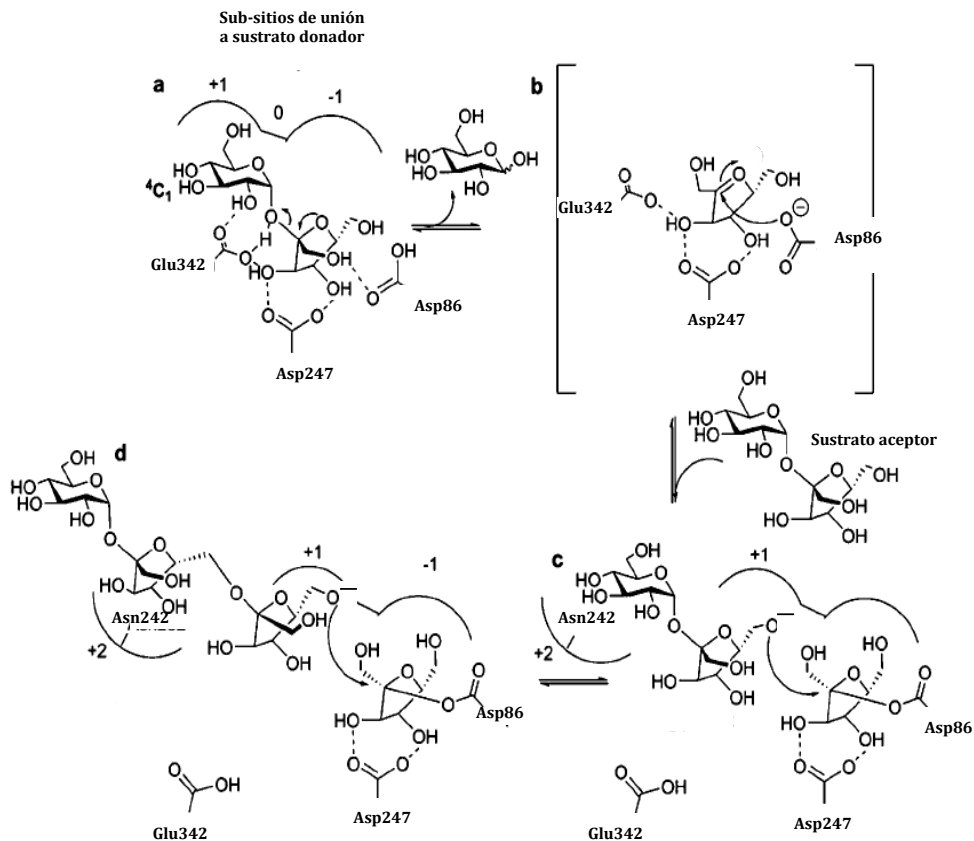
El mecanismo de reacción de las LSs de *B. subtilis*, *S. salivarius* y *G. diazotrophicus* se ajusta a un modelo cinético tipo Ping-Pong Bi Bi (Fig. 6). La reacción se lleva a cabo mediante un mecanismo que implica la formación y subsecuente hidrólisis de un intermediario covalente enzima-fructosilo (EF) (Chambert *et al.* 1974; Hernández *et al.* 1995). De acuerdo con este mecanismo se forma un complejo enzima-sustrato (ES) que, una vez liberado el residuo glucosilo, da lugar a un intermediario covalente EF. Finalmente el residuo fructosilo es transferido a la molécula aceptora, aumentando el grado de polimerización cuando la molécula aceptora es una cadena de levana o liberando la fructosa si la molécula aceptora es una molécula de agua.



**Figura 6.** Modelo del mecanismo Ping-Pong Bi Bi (Notación de Cleland) propuesto para la levansacarasa. E: enzima; S: sacarosa; G: glucosa; F: residuo fructosilo; L(n): levana con “n” residuos de fructosa.

A partir del conocimiento de los requerimientos estructurales para llevar a cabo la catálisis y de la geometría del sitio activo, es posible describir los primeros pasos en los que se lleva a cabo la reacción. Como paso inicial, el sustrato donador (sacarosa) se une a los subsitios -1 y +1 del sitio activo. El grupo  $\beta$ -carboxilo del D86 realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono 2 de la fructosa dando lugar a un enlace covalente enzima-fructosilo de tipo glucosilo-éster en el subsitio -1. Subsecuentemente E342 dona un protón al grupo glucosilo saliente que entonces es liberado del subsitio +1 de la enzima (Fig. 7A). La reacción anterior da lugar a la unión  $\alpha$  de la fructosa con la proteína, invirtiéndose la configuración (Fig. 7B).

En el segundo paso de la reacción, el sustrato aceptor se une ahora al subsitio +1 a través de la coordinación principal con R360 y al subsitio +2 por una coordinación secundaria con N242. De esta manera, el grupo ácido desprotonado de E342 sustrae un protón del carbono anomérico del aceptor, lo que da lugar a un anión altamente reactivo que realiza un ataque nucleofílico sobre el enlace éster del complejo EF, para que finalmente el residuo fructosilo unido a la enzima sea transferido al aceptor (Figs. 7C y 7D).



**Figura 7.** Modelo del mecanismo de doble desplazamiento de las FTFs. (Adaptado del artículo de Homman *et al.* 2007).

Dado que las LS catalizan la reacción de transfructosilación con retención de la configuración, debe ocurrir entonces una segunda inversión de la configuración de la fructosa al liberarse del complejo EF. Cuando ocurre la hidrólisis del sustrato donador (sacarosa o rafinosa), una molécula de agua reacciona con el intermediario EF liberando a la fructosa del complejo (Chambert *et al.* 1974; Meng y Fütterer 2008).

Hasta ahora no existen datos suficientes para poder describir el mecanismo de elongación de la cadena de fructana en forma detallada. Sin embargo, se ha propuesto que la elongación de la cadena podría ocurrir por medio de alguno de los siguientes mecanismos: a) **crecimiento procesivo o de una sola cadena**, el cual

implica que una sola cadena de polímero permanece asociada a la enzima durante la síntesis y los residuos de fructosa son agregados sucesivamente a la misma molécula de levana y b) **crecimiento no procesivo**, si el residuo fructosilo se transfiere al azar, a cualquier molécula de levana aceptora presente en el medio, liberándola al medio después de cada adición.

Ozimek y colaboradores (2006) proponen que la LS de *Lactobacillus reuteri* que sintetiza únicamente polímero lleva a cabo la síntesis de fructana a través de un mecanismo procesivo. Por su parte, la IS de *L. reuteri* utiliza un mecanismo no procesivo ya que sintetiza mayormente fructo-oligosacáridos. Esta diferencia puede deberse a que las FTFs que utilizan mecanismos procesivos poseen una mayor afinidad por las cadenas de polímero que las FTFs que utilizan mecanismos no procesivos, lo que permite a la enzima agregar sucesivamente los monómeros de fructosa a la misma cadena que se encuentra asociada a la enzima. Desde el punto de vista estructural, se propone que la afinidad por las cadenas de polímero está dada por la naturaleza y orientación de los aminoácidos que se encuentran adyacentes al sitio de unión a la sacarosa. En este sentido, Strube *et al.* (2011) encontraron que al mutar residuos alejados del sitio de unión a sacarosa (Y247A, Y247W, N252A, D257A y K373A ) en *B. megaterium*, se modifica la afinidad por la cadena de polímero y es posible modificar el GP de la levana sintetizada, sin alterar de forma significativa las constantes cinéticas de la enzima.

#### **4.6 RESIDUOS ADYACENTES AL SITIO ACTIVO IMPLICADOS EN LA FUNCIÓN DE SacB DE *B. subtilis***

Tomando como base la estructura de SacB de *B. subtilis*, Ortiz Soto *et al.* (2008) generaron diversas mutantes de SacB en aminoácidos adyacentes al sitio catalítico

para evaluar su influencia sobre la actividad y especificidad de la reacción utilizando técnicas de mutagénesis sitio-dirigida.

Basados en un alineamiento de secuencias realizado con 36 miembros de la familia GH68, identificaron 6 regiones semiconservadas dentro del sitio catalítico. De los aminoácidos encontrados en estas regiones semiconservadas, se eligieron 9 residuos de aminoácidos según la distancia y posición de su cadena lateral con respecto al sustrato. Estos 9 aminoácidos se modificaron de acuerdo a la variabilidad natural que se encontró entre los miembros de esta familia, seleccionando el aminoácido más frecuente.

Al realizar la caracterización bioquímica y cinética de estas mutantes se encontró que las mutantes R433A, R360S y Y429N perdieron la capacidad para producir polímero, sintetizando únicamente FOS. Sin embargo esta modificación se dio de una forma concomitante con un aumento en la tasa de hidrólisis hasta un 85, 90 y 95% respectivamente, en comparación con el 40% de hidrólisis que presenta la enzima silvestre (SacB). Otra consecuencia fue que la actividad global disminuyó de forma drástica y la estabilidad a la temperatura de la enzima en el caso de las mutantes R360S y R433A también se vio afectada (Tabla 1).

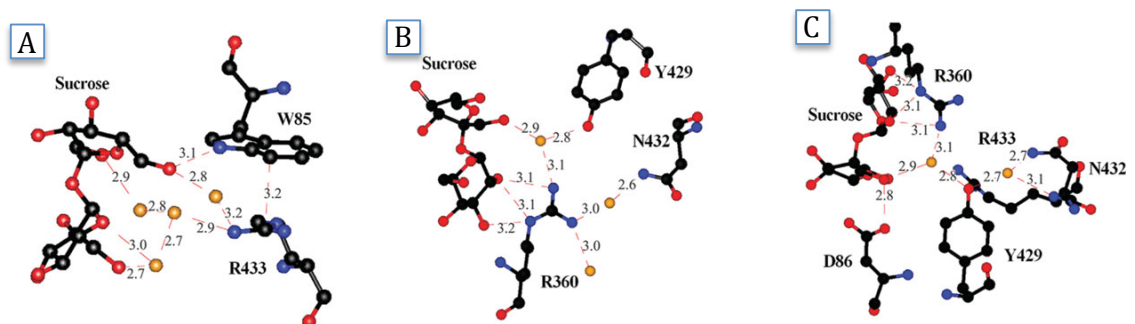
**Tabla 1. Parámetros cinéticos, estabilidad y pH óptimo de SacB y las mutantes productoras de FOS.**

<i>Enzima</i>	<i>K<sub>m</sub></i> (mM sacarosa)	<i>k<sub>cat</sub></i> (s <sup>-1</sup> )	<i>K<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub></i> (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	<i>t<sub>1/2</sub></i> 40°C (min)	<i>pH</i> óptimo
<b>SacB</b>	8	164.6	20.3	52.0 (±4.79)	6
<b>R433A</b>	29.3	87.5	2.98	16.0 (±1.61)	6-7
<b>R360S</b>	154	13.5	0.09	17.2 (±1.16)	6
<b>Y429N</b>	319.4	6.3	0.02	47.0 (±2.61)	5-6

\*Los ensayos de actividad se llevaron a cabo utilizando 0.5U/ml de actividad enzimática a 37°C y pH 6.0. La estabilidad se midió como la pérdida de actividad tras la incubación de 1mg/ml de proteína a 40°C.



A partir de la estructura cristalográfica de SacB, se puede observar que el residuo R433 forma un enlace de hidrógeno con moléculas de agua que a su vez interactúan con la glucosa del sustrato, y de forma indirecta, interactúa también con Trp85 (Ortiz-Soto *et al.* 2008) (Fig. 8A). El residuo sin mutar R360 interactúa con una molécula de agua, el 2-OH y el 3-OH de la glucosa (Fig.8B). Este residuo forma parte del subsitio -1 por lo que su localización resulta clave para que el aceptor se acomode de forma favorable y sea posible llevar a cabo la catálisis (Meng y Fütterer 2003). La modificación de una Arg por una Ser en este sitio, provoca además de las modificaciones en las constantes cinéticas y en la estabilidad de la enzima, una modificación en el perfil de productos con respecto a la enzima silvestre. R360S sólo produce FOS resultando además en una enzima altamente hidrolítica. Por otro lado, la Tyr en la posición 429 coordina una red de moléculas de agua en el sitio activo que involucra de forma indirecta a los subsitios +1 y -1 (Fig. 8C). Ortiz-Soto *et al.* (2008) sugieren que la modificación de un residuo aromático por una arginina modificó la red de interacciones en este sitio de tal forma que la mutante es capaz de transferir fructosa a moléculas aceptoras de BMM (xilosa, maltosa), sin embargo perdió la capacidad de elongar la cadena de fructanas más allá de dos residuos de fructosa.



**Figura 8.** Interacciones interatómicas de los aminoácidos A) R433, B) R360 y C) Y429 con sacarosa, moléculas de agua (amarillo) y otros residuos cercanos.

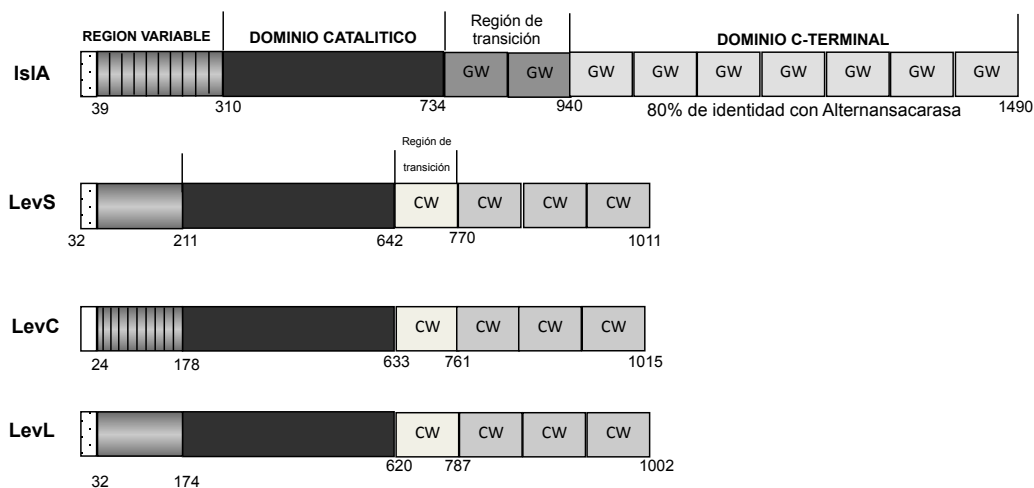
## 4.7 ACTIVIDADES TRANSFERASA E HIDROLÍTICA

La eficiencia de la actividad transferasa está limitada por la reacción de hidrólisis resultado de la competencia que existe entre la molécula de sacarosa o de fructana que actúa como aceptora y las moléculas de agua que se encuentran en solución. La selectividad entre las actividades transferasa e hidrolítica de las FTFs está influenciada por diversos factores como la fuente de la enzima (Kim *et al.* 1998), la temperatura (Ohtsuka *et al.* 1992; Jang *et al.* 2001), la concentración inicial de sustrato (Korakli *et al.* 2003) y la presencia de solventes orgánicos miscibles en agua en el medio de reacción (Chambert y Petit Glatron 1989).

Distintos trabajos se han enfocado en aumentar la eficiencia de la transferencia a polímero a través de diversas estrategias. Por ejemplo, el uso de altas concentraciones de sacarosa o la adición de fructana al medio de reacción mejora la disponibilidad de las moléculas aceptoras, lo que disminuye la actividad de hidrólisis (Tanaka *et al.* 1979; Song and Jaques 1999). Es posible también modular el rendimiento a través de la temperatura, ya que la actividad transferasa se ve favorecida a bajas temperaturas (Jang 1992; Euzenat *et al.* 1997; Ammar 2002). La síntesis en presencia de solventes orgánicos aumenta el rendimiento de producción de polímero hasta un 90% al disminuir la actividad de agua en el sistema (Castillo y López-Munguía, 2004). Finalmente, se ha logrado mejorar la eficiencia de síntesis de levana a través de la inmovilización de la levansacarasa de *B. subtilis* en hidroxiapatita (Chambert y Petit Glatron, 1993) y con la inmovilización en magnetita de la levansacarasa de *Zymomonas mobilis* (Jang *et al.*, 2001), aunque no fue posible recuperar el total de la actividad con respecto a la enzima libre.

## 4.8 FRUCTOSILTRANSFERASAS DE *Leuconostoc sp.*

En trabajos recientes, se identificó una nueva subfamilia de FTFs multidominio del género *Leuconostoc*. Esta subfamilia se caracteriza por presentar dominios adicionales en las regiones N y C-terminal con identidad a glucosiltransferasas (GTFs) que flanquean al dominio catalítico (Fig. 9). Las GTFs son enzimas que transfieren residuos de glucosa de la sacarosa. La presencia de dominios adicionales de esta subfamilia de FTFs difiere de las demás FTF de origen bacteriano que poseen un sólo dominio. Esta evidencia llevó a la conclusión de que estas enzimas son quimeras naturales que combinan características estructurales tanto de GTFs como de FTFs. Dentro de las enzimas pertenecientes a esta subfamilia de FTFs se han identificado la IS (IsIA) de *Leuconostoc citreum*, la LS (LevS) producida por *L. mesenteroides* B512F (Morales-Arrieta *et al.* 2006), y las LSs LevL y LevC de *L. mesenteroides ssp. mesenteroides* ATCC 8293 (Olvera *et al.* 2006). Estas FTFs multidominio comparten la característica de alcanzar valores de transferencia de 70% en comparación con las FTFs de un solo dominio, como por ejemplo SacB de *B. subtilis*, que transfiere sólo el 40% del sustrato.



**Figura 9.** Esquema de la estructura primaria de las FTFs de *Leuconostoc sp.*

#### **4.8.1 Inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28 (IsIA)**

La IS IsIA (Fig. 9) tiene una masa molecular de 165KDa, la masa molecular más alta reportada hasta la fecha para FTFs (Olivares *et al.* 2003). IsIA fue aislada del pozol (bebida fermentada de origen maya) y se encuentra asociada a la pared celular de *Leuconostoc citreum* CW28. Su dominio N-terminal cuenta con 10 secuencias repetidas de 12 aminoácidos (KDSKVATSDELA) y además se encontró una homología del 40% con la región variable de la alternansacarsa (ASR), una GTF que sintetiza un polímero con enlaces alternados de tipo  $\alpha$ 1-6 y  $\alpha$ 1-3, de *L. mesenteroides* NRRL B-1355. (Olvera *et al.* 2007). El dominio catalítico corresponde a FTFs conocidas. Su largo dominio C-terminal presenta una similitud del 80% con el C-terminal de la ASR. Sin embargo, los primeros 206 aminoácidos de los 756 que conforman este dominio, son llamados “región de transición” ya que solo poseen una identidad del 25% con ASR. Los 550 aminoácidos restantes comparten el 80% de identidad con la secuencia del C-terminal de ASR. Se ha demostrado que en IsIA este dominio juega un papel importante en el anclaje a pared celular, ya que en su ausencia la enzima no tiene la capacidad de asociarse a las células de *L. citreum*. Dicha propiedad se atribuye a que posee un 26% de identidad con la región de unión a pared celular de la amidasa AmiA de *Listeria monocytogenes* que contiene 8 módulos GW (del Moral *et al.* 2008).

#### **4.8.2 Levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides***

La LS LevS (Fig. 9) de *Leuconostoc mesenteroides* B512F de 111 KDa posee una estructura primaria con un patrón similar a la IS IsIA (Morales *et al.* 2006). Su dominio N-terminal incluye una región variable que tiene un 25% de identidad con una GTF de *Leuconostoc mesenteroides*. El dominio catalítico tiene identidad con las FTFs de las especies de *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*.

Por otro lado, el dominio C-terminal es similar al dominio C-terminal de GTFs de algunas especies de *Streptococcus* y *Leuconostoc*. Olvera-Carranza *et al.* (2012)

encontraron que tiene 83% de identidad con el dominio CW de la lisozima M1 (1,4-beta-N-acetylmuramidase) de *L. mesenteroides ssp mesenteroides* ATCC 8293. De forma similar a IslA el dominio C-terminal también contiene una región de transición. En este caso, la región de transición contiene dos repetidas parecidas a los motivos CW, mientras que el dominio C-terminal completo de las LSs multidominio contiene al menos 8 motivos a lo largo de su secuencia. A partir de la resolución de la estructura cristalográfica del dominio de unión a pared celular del factor de virulencia de neumococos LytA, se ha demostrado que cada módulo CW se pliega de forma independiente (Fernández Torneo *et al.* 2001). Los motivos CW se han encontrado en proteínas asociadas a células como las toxinas de *Clostridium* y *Streptococcus sp* y se les asocia con una función de reconocimiento de colina que se encuentra en la pared celular. Repetidas similares pero de mayor longitud se han encontrado en GTFs y proteínas de unión a glucano de *Streptococcus* en la cavidad oral y a su vez están relacionados con las dextranacararasas de *L. mesenteroides* (Olvera-Carranza, *et al.* 2007).

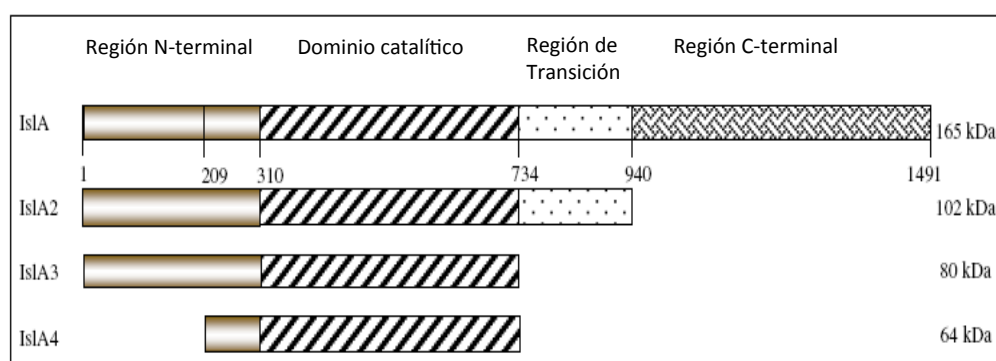
Basados en el análisis de la secuencia de LevS, el grupo de trabajo logró aislar dos LS (LevC y LevL) de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* ATCC 8293 con las mismas características químicas. Es decir, LevC y LevL presentan una disposición de dominios adicionales que flanquean a su dominio catalítico (Fig. 9). La región N-terminal, específicamente la de LevC, presenta una serie de 10 secuencias repetidas de 13 aminoácidos similares al motivo T de GTFs. Por otro lado el dominio C-terminal de ambas enzimas es idéntico al de LevS, incluyendo la región de transición (Olvera *et al.* 2007).

#### **4.8.3 Papel funcional de los dominios adicionales de las fructosiltransferasas de *Leuconostoc sp.***

Con el fin de estudiar el papel funcional de los dominios C y N-terminal de esta subfamilia de enzimas multidominio, se realizó un análisis de las propiedades bioquímicas de tres versiones truncadas de IsIA (Fig. 10), construidas por del Moral *et al.* (2008): **IsIA2, IsIA3 e IsIA4.**

En la versión IsIA2 se eliminó la sección del C-terminal que posee identidad con ASR, mientras que en la versión IsIA3 se eliminó la región de transición dejando sólo el dominio catalítico con la región N-terminal. En la tercera versión truncada (IsIA4) únicamente se mantuvo el dominio catalítico, tal y como están estructuradas las FTFs de bacterias Gram negativas.

Los resultados del análisis de especificidad 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 ni en la habilidad para sintetizar polímero. Sin embargo, la capacidad para transferir fructosa al polímero disminuyó en beneficio de la transferencia al agua, reduciendo también la afinidad hacia la sacarosa (medida como  $K_m$ ). Estos cambios se observan al eliminar el dominio C-terminal, pero particularmente cuando se elimina la región de transición (IsIA3) (Tabla 2), lo que hace suponer que la adquisición del dominio C-terminal resulta en una mejora en la eficiencia para la síntesis del polímero y que la región de transición resulta clave para dicho cambio de especificidad.



**Figura 10.** Versiones truncadas de IsIA. IsIA: enzima WT, IsIA2: deleción del dominio C-terminal, IsIA3: deleción de la región de transición y dominio C-terminal, IsIA4: deleción de regiones N/C-terminal.

**Tabla 2.** Propiedades cinéticas y bioquímicas de la inulosacarasa IsIA de *L. citreum* CW28 y sus versiones truncadas.

<b>Versión truncada</b>	<b>T óptima (°C)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> 35°C (min)</b>	<b>Hidrólisis/Transferencia* (%)</b>	<b>Km<sub>T</sub> (mM)</b>	<b>kcat (s<sup>-1</sup>)</b>	<b>kcat/Km (mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>)</b>
<b>IsIA</b>	35	420	40/60	38	25	0.65
<b>IsIA2</b>	35	407	38/62	24	28.19	1.17
<b>IsIA3**</b>	30	346	61/39	nd	nd	nd
<b>IsIA4</b>	30	128	70/30	142	105	0.73

\* Medido tras un consumo de sacarosa de 293 mM. La Km total (Km<sub>T</sub>) se determinó a partir de la tasa de consumo de sacarosa. \*\*IsIA3 no mostró un comportamiento de tipo michaeliano.

En otro ensayo, se demostró que el recorte de la enzima por sus extremos N y C-terminal (IsIA4) ocasiona un detrimento en la estabilidad a la temperatura (Tabla 2). Esta observación pone de manifiesto el efecto que estos dominios tienen en la estabilidad de la proteína. En este sentido, se estudió la influencia de los dominios sobre la estructura de la proteína por medio de ensayos de plegamiento. Tanto la enzima completa como las versiones truncadas fueron sometidas a diferentes

concentraciones de EDTA para eliminar el  $\text{Ca}^{+2}$  y favorecer el desplegamiento de la enzima. Se observó que las formas truncadas IslA3 e IslA4, se inactivan modificando su estructura terciaria cuando es eliminado el  $\text{Ca}^{2+}$ , contrario a lo que sucede con la enzima completa (IslA) y la truncada del C-terminal (IslA2), ya que en ellas no se observa un cambio significativo en la estructura terciaria. Esto señala que los dominios adicionales le confieren rigidez a la estructura de la enzima generando una mayor estabilidad a pesar de la ausencia de calcio (del Moral *et al.* 2008).

#### **4.9 GENERACIÓN DE NUEVAS FUNCIONES POR LA COMBINACIÓN DE DOMINIOS**

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

En el marco de las enzimas pertenecientes a la familia de las glicosilhidrolasas, diversos grupos de trabajo han estudiado el modelo evolutivo de acoplamiento de dominios para generar proteínas con nuevas propiedades, a través de la estrategia de la fusión de dominios funcionales. Singh y Hayashi (1995) construyeron quimeras de enzimas con actividad  $\beta$ -glucosidasa. Las  $\beta$ -glucosidasas (BG), catalizan la hidrólisis de alquil y aril- $\beta$ -glucósidos, así como de glicósidos que sólo tienen residuos de carbohidratos como la celobiosa (oligosacárido), y se sabe que la región C-terminal de estas enzimas es clave para su actividad. Para construir las quimeras se sustituyeron



segmentos de la región C-terminal de la BG de *Cellvibrio gilvus* por segmentos homólogos de una BG termoestable de *Agrobacterium tumefaciens*. Al evaluar las quimeras de BG construidas, observaron que fue posible modificar la actividad óptima y aumentar la estabilidad al pH y la temperatura.

De forma similar, en un esfuerzo por identificar las bases moleculares que determinan los requerimientos para mostrar estabilidad térmica y actividad transglicosilasa, Goyal et al. (2002) construyeron quimeras mezclando fragmentos de la región C-terminal de una BG de *Thermotoga marítima* altamente termoestable con actividad transglicosilasa, por fragmentos de la región C-terminal de la BG de *Cellvibrio gilvus*, la cual es mesofílica y no presenta actividad transglicosilasa. Dos de las quimeras construidas mejoraron dos veces la capacidad de transglicosilación, manteniendo una estabilidad y pH óptimo similares a los de la BG termoestable. A partir de estos resultados los autores sugieren que los residuos clave en la actividad de transferencia se encuentran en la región del C-terminal.

Por otro lado, un ejemplo en el que la fusión de enzimas con actividades secuencial o en serie (el producto de una enzima es el sustrato de la otra) permite el uso integral de sustratos fue la creación de una proteína bifuncional a partir de la fusión de una  $\beta$ -amilasa (BA) de *Clostridium thermosulfurogenes* con una trealosa sintetasa (TS) de *Thermus thermophilus*. Las proteínas se enlazaron por medio de una región espaciadora de 10 aminoácidos para permitir un libre plegamiento creándose una quimera bifuncional recombinante. Esta quimera bifuncional cataliza reacciones secuenciales al hidrolizar almidón para formar maltosa, y en el sitio catalítico vecino convierte la maltosa en trealosa. La estabilidad y la eficiencia catalítica (obtenida a partir de la medición de la síntesis total de trealosa a partir de almidón) de la quimera resultaron mayores a las obtenidas cuando ambas enzimas se adicionaron en relación equimolar al medio de reacción. Además, se logró minimizar el porcentaje de hidrólisis de maltosa ya que la cercanía de los sitios activos permitió el acceso inmediato de la maltosa al sitio activo de la TS. Por tanto, los autores lograron obtener una enzima

bifuncional con una alta eficiencia para sintetizar trealosa a partir de almidón (Wang 2007).

#### **4.10 QUIMERAS DE FRUCTOSILTRANSFERASAS CON ALTA EFICIENCIA PARA LA TRANSFRUCTOSILACIÓN**

Los resultados de la construcción y el análisis de las versiones truncadas de IslA de *L. citreum* CW28 ponen de manifiesto que el dominio C-terminal ejerce una influencia sobre la alta eficiencia de transfructosilación que tienen las FTFs multidominio; en especial el fragmento denominado región de transición (del Moral 2008). Con el fin de disminuir la actividad hidrolítica de SacB a través de la estrategia de fusión de dominios, Olvera-Carranza *et al.* (2012) construyeron quimeras de SacB a las que les fusionaron los dominios C-terminal completos y la región de transición de FTFs y GTFs del género *Leuconostoc*. Las quimeras construidas se esquematizan en la Fig. 10.

En las primeras dos quimeras, a SacB se le adicionó la región C-terminal completa de IslA de *L. Citreum* CW28 y de LevC de *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* ATCC 8293 resultando en las construcciones SacBCIslA y SacBCLevC, respectivamente. Para las siguientes dos quimeras, SacB se fusionó con, únicamente, la región de transición de IslA y de LevC (SacBTnIslA y SacBTnLevC). Se diseñó además una quinta quimera con la adición a SacB de la región C-terminal de DsrP, una GTF con alto grado de identidad y homología con la región C-terminal de las FTFs de *Leuconostoc sp.*

Al caracterizar bioquímica y cinéticamente estas construcciones se demostró que las quimeras de SacB, a las que se fusionó el dominio C-terminal de las FTFs multidominio IslA de *L. Citreum* CW28 y LevC de *L. Mesenteroides subsp. mesenteroides* ATCC 8293, transfieren en promedio 85% a polímero manteniendo una mínima tasa de hidrólisis incluso a bajas concentraciones de sustrato (condiciones

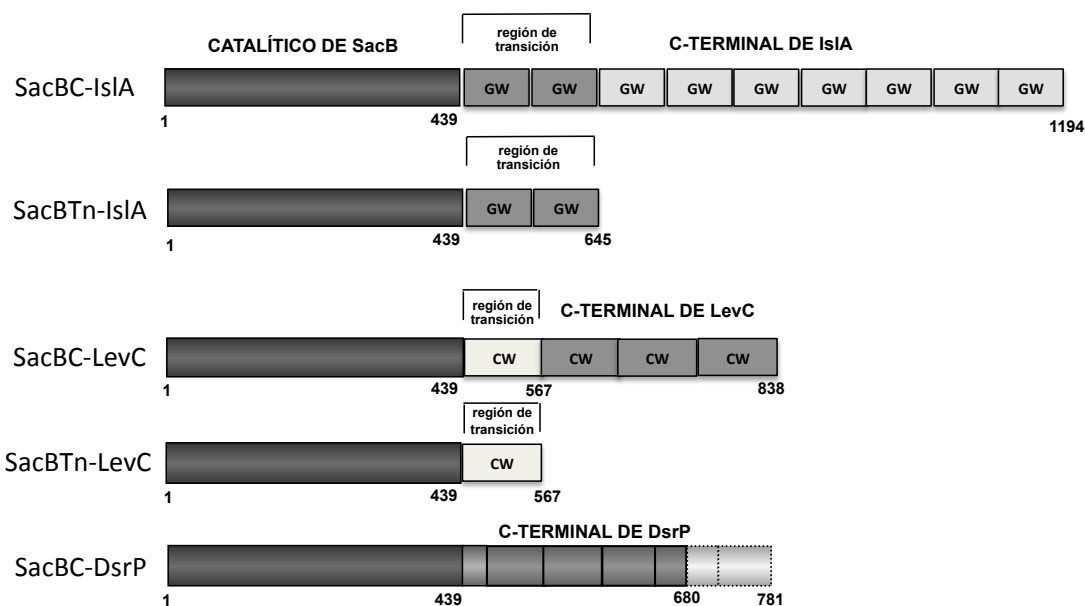
poco favorables para la transferencia), en contraste con SacB que transfiere al polímero, en el mejor de los casos, un 50% del sustrato. Además, SacB fusionado solamente con la región de transición de LevC, dio lugar a una quimera con una velocidad de transferencia a polímero 4.8 veces mayor con respecto a SacB, sin afectar la estabilidad ni la capacidad de transferencia a otros aceptores. Sin embargo, en el caso de la quimera SacBDsrP, a pesar del parecido estructural de la región C-terminal de DsrP con la región C-terminal de IsIA y LevC que es de un 25%, no mostró cambios en la actividad de transglicosilación, demostrando que este dominio no está relacionado con los determinantes moleculares que dan lugar al aumento que favorece la transferencia.

Un aspecto importante a resaltar de la caracterización cinética de las quimeras SacBTnIsIA y SacBTnLevC (Tabla 3), es que a pesar de que la constante de velocidad de transferencia a polímero ( $k_{cat_T}$ ) aumentó de forma significativa, las constantes catalíticas hacia la reacción de hidrólisis permanecen muy similares a las de SacB. Esta similitud en los parámetros cinéticos indica que las regiones adicionales en estas LSs quiméricas no afectan el acceso de moléculas de agua al sitio activo, sino que ocurre un aumento en la afinidad de la enzima por la molécula de fructana que actúa como aceptor.

Al evaluar estos resultados en conjunto con las observaciones de Del Moral *et al.* (2008), surge como hipótesis que la región de transición modifica la conformación del dominio catalítico de SacB, provocando un ajuste estructural que, vía una mayor afinidad al aceptor, aumenta la velocidad de transferencia de fructosa a la molécula de polímero aceptor traduciéndose en una mayor eficiencia hacia la transferencia.

Además, a partir del estudio cinético antes mencionado, se descarta la posibilidad de que la quimera haya visto mejorada su eficiencia como transferasa a través de la reducción de su actividad hidrolasa al restringir el acceso de moléculas de agua al sitio activo, lo que representaba una hipótesis primaria.

## ANTECEDENTES



**Figura 11.** Esquema del diseño de las quimeras generadas a partir del dominio catalítico de la levansacarasa SacB y la fusión de los C-terminal de las FTFs de *Leuconostoc sp* y el C-terminal de DsrP, una GTF.

**Tabla 3. Parámetros cinéticos de la levansacarasa SacB y sus quimeras SacB-Tn-IsIA y SacB-Tn-LevC.**

Enzima	$Km_H$ (mM)	$Km_T$ (mM)	$Km_G$ (mM)	$kcat_H$ (s <sup>-1</sup> )	$kcat_T$ (s <sup>-1</sup> )	$kcat_G$ (s <sup>-1</sup> )	$kcat_H/Km_H$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$kcat_T/Km_T$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$kcat_G/Km_G$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
SacB	11.6 (0.24)	38.2 (0.76)	21.5 (1.21)	33.3 (0.87)	48.4 (6.7)	87.4 (2.89)	2.9	1.3	4.0
SacBTnIsIA	13.2 (1.65)	72.6 (2.03)	58.7 (4.64)	35.6 (3.54)	115.6 (16.9)	166.8 (11.25)	2.7	1.6	2.8
SacBTnLevC	13.9 (2.24)	102.5 (6.78)	88.25 (4.33)	36.4 (1.02)	238.3 (21.5)	280.1 (10.89)	2.6	2.3	3.2

\* $Km$  de hidrólisis ( $Km_H$ ),  $Km$  de transferencia ( $Km_T$ ),  $Km$  global ( $Km_G$ ),  $kcat$  de hidrólisis ( $kcat_H$ ),  $kcat$  de transferencia ( $kcat_T$ ),  $kcat$  global ( $kcat_G$ ), eficiencia catalítica ( $kcat/Km$ ).

\*\* La desviación estándar se muestra entre paréntesis.

A partir de los resultados de las quimeras de SacB construidas por Olvera-Carranza *et al.* (2012) surge dentro de nuestro grupo de investigación el interés por profundizar en el estudio del efecto que provoca la adición de la región de transición, no sólo en la LS SacB de *B. subtilis* cuyo principal producto de transfructosilación es un polímero de levana, sino ampliando el análisis a estudios con mutantes de SacB cuya especificidad

## ANTECEDENTES

---

tanto de reacción como de productos son diferentes a las de la enzima silvestre, ya que no ha sido del todo esclarecido si la región de transición sólo juega un papel en la síntesis de fructanas de AMM o si es posible observar un efecto similar en mutantes que han perdido la capacidad para elongar la cadena de polímero.

## 5. JUSTIFICACIÓN

A partir de los resultados de las quimeras construidas mediante la adición de dominios C-terminal y de la región de transición de varias FTFs multidominio a la LS SacB de *B. subtilis* y en particular de la caracterización cinética de SacBTnLevC, surge el interés dentro de nuestro grupo de trabajo por evaluar con mayor detalle los efectos de la fusión de la región de transición de LevC en SacB, por un lado, y de evaluar el efecto que ejerce esta región en mutantes de SacB (R433A, R360S y Y429N) con diferente especificidad de reacción y de producto, por el otro.

## 6. HIPÓTESIS

Al construir proteínas quiméricas fusionando la región de transición de LevC de *L. mesenteroides* a mutantes con especificidad distinta a SacB (R433A, R360S y Y429N) se dan interacciones que modifican su especificidad, de tal forma que se podrá abatir la actividad hidrolítica y además, se podrá modificar la especificidad de productos en las quimeras.

## 7. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las quimeras construidas a partir de la fusión de las mutantes R433A, R360S Y429N de SacB de *B. subtilis* y la región de transición de LevC de *L. mesenteroides* para definir su especificidad tanto de reacción como de producto y analizar el comportamiento molecular de un modelo de SacBTnLevC.

## 8. OBJETIVOS PARTICULARES

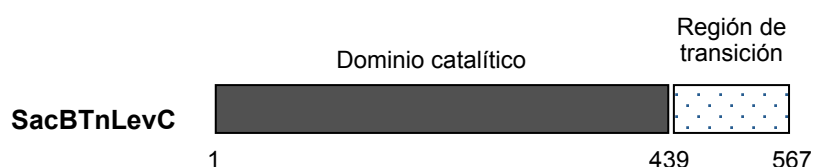
1. Construir tres quimeras a partir de la fusión de las mutantes productoras de FOS con la región de transición de LevC, clonándolas y expresándolas en *E. coli*.
2. Purificar las quimeras construidas..
3. Determinar el efecto de la adición de la región de transición sobre la especificidad de reacción y sobre el perfil de productos de las quimeras.
4. Simular el comportamiento molecular a partir de un modelo de SacBTnLevC en búsqueda de información que sustente con los cambios observados.



## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 CONSTRUCCIÓN DE LAS QUIMERAS

Con el fin de construir quimeras fusionando mutantes de SacB R433A, R360S y Y429N con la región de transición de LevC, se utilizó el diseño de la quimera de SacB de Carranza-Olvera *et al.* (2012). Dicho diseño se muestra de forma esquemática a continuación:



**Figura 12.** Esquema de la estructura primaria de SacBTnLevC que dio lugar a la construcción de las quimeras de mutantes de SacB. En gris, el dominio catalítico de SacB, en fondo blanco punteado la región de transición.

### 9.2 MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA

La construcción de las quimeras de las mutantes se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos diseñados por Ortiz-Soto *et al.* (2008) para generar mutaciones puntuales sobre la construcción de SacBTnLevC realizada en nuestro grupo. Para la construcción de las mutantes se utilizó el kit "Site Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene) siguiendo las instrucciones del proveedor.

En las Tablas 4 y 5 se muestran los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis sitio-dirigida, así como las condiciones de reacción establecidas.

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y fusión de los genes.**

Oligonucleótidos	Secuencia (5' a 3')
R433Afw	agctatatgacaaac <b>gcg</b> ggattctacgcagac
R433Arvs	gtctgcgtagaatcc <b>cgc</b> gttgtcatatagct
R360Sfw	cctgttcactgactcc <b>tct</b> ggatcaaaaatgac
R360Srvs	gtcattttgatcc <b>aga</b> ggagtcagtgacag
Y429Nfw	aatgctggtgattacaagc <b>aac</b> atgacaaacagagga
Y429Nrvs	tcctctgtttgcat <b>gft</b> gcttgaatcacgacatt

**Tabla 5. Condiciones de los ciclos en la reacción de PCR para la mutagénesis sitio-dirigida.**

CONDICIONES DE LOS CICLOS			
ETAPA	No. DE CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)
Desnaturalización	1	95	0.5
Desnaturalización (apertura)	16	95	0.5
alineamiento		55	1
extensión		65	8
extensión final	1	37	2

## 9.3 CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE MUTAGÉNESIS

### 9.3.1 Vector de expresión

Los genes productos de la mutagénesis se insertaron en el vector pET-32b(+). El vector pET-32b(+) tiene un gen de resistencia a ampicilina y se encuentra bajo el control del promotor T7 inducible por IPTG. Este vector contiene etiquetas de histidina que se fusionan con el inserto en el extremo 3', así como tiorredoxina en el extremo 5'.

### 9.3.2 Transformación

La cepa *E. coli* XL1-blue superelectrocompetente fue transformada con las construcciones insertadas en pET-32b(+). Se transformó por electroporación y las células se recuperaron en medio líquido SOC (Tabla 7) a 37°C y 250rpm durante 1 hora. Para la selección de transformantes positivas se aislaron colonias en placas de agar Luria Bertani adicionado con ampicilina (Tabla 6) a 37°C después de 16 horas de incubación.

**Tabla 6. Medio sólido Luria Bertani (LB) para el aislamiento de *E. coli* transformadas.**

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (g/L)</i>
<i>Bactotripton</i>	10
<i>Extracto de levadura</i>	5
<i>NaCl</i>	10
<i>Agar</i>	15
<i>Ampicilina*</i>	0.2

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

**Tabla 7. Medio SOC para la recuperación de células *E. coli* después del tratamiento térmico para transformarlas.**

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (g/L)</i>
<i>Triptona</i>	20
<i>Extracto de levadura</i>	5
<i>NaCl</i>	0.5
<i>KCl</i>	0.187
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	1.11
<i>MgSO<sub>4</sub></i>	1.20
<i>Glucosa</i>	3.6

### **9.3.3 Secuenciación del inserto**

La secuenciación de insertos se realizó en un secuenciador automático Applied Biosystems 3100 en la Unidad de Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias se analizaron por BLAST en la página de la “National Center for Biotechnology Information” para corroborar que las construcciones estuvieran correctas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast>).

## 9.4 EXPRESION HETERÓLOGA DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

### 9.4.1 Expresión

Para la expresión intracelular de los genes que codifican para las quimeras R433ATn, R360STn y Y429NTn se transformaron células *E. coli* BL21 electrocompetentes con los plásmidos que contienen la construcción correspondiente a cada quimera. Una vez transformadas, se incubaron en medio YT2X (Tabla 8) suplementado con ampicilina (200 µg/ml). Una vez alcanzada una absorbancia de 0.6 unidades las células fueron inducidas con IPTG 0.2 M y se incubaron 4 horas a 18°C y 100 rpm. Las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 6.5 y se dejaron en congelación durante un día. La ruptura de las células se realizó a partir de una serie de congelación/ descongelación repetida tres veces y una posterior sonicación utilizando 6 ciclos de pulsos con una duración de 30 segundos y una amplitud de 60% con interrupciones para evitar el calentamiento de la muestra con la misma duración. El extracto soluble se separó de los restos celulares mediante centrifugación a 10,000 rpm y 4 °C en un volumen de 15 ml.

**Tabla 8. Medio YT2X para la producción de enzimas recombinantes en *E. coli* TOP 10.**

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (g/L)</i>
<i>Bactotripton</i>	16
<i>Extracto de levadura</i>	10
<i>NaCl</i>	5
<i>Ampicilina*</i>	0.2

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

#### **9.4.2 Cuantificación de proteína**

El método de Bradford fue utilizado para determinar la concentración de proteína (kit Bio-Rad “protein assay” CA 94547). Como patrón se usó albúmina sérica bovina (fracción V, SIGMA).

#### **9.4.3 Análisis de las proteínas recombinantes**

Las proteínas presentes tanto en la fracción soluble como insoluble del cultivo celular se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), utilizando una cámara Mighty small II con 20 mA para la migración.

Como gel concentrador se utilizó acrilamida al 4% con pH 6.8 y como gel separador acrilamida al 10% con pH 8.8.

#### **9.4.4 Tinción con azul de Coomassie para visualización de proteína**

Para visualizar las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se realizó una tinción con azul de coomasie que consiste en la adición de una solución teñidora (ácido acético 10%, metanol 30% y azul de Coomassie al 0.2%) durante 30 min. Para remover el exceso de colorante se adicionó una solución de metanol al 50%, ácido acético al 10% por 20 min y por último se adicionó una solución desteñidora de menor concentración (metanol al 5%, ácido acético al 1%) hasta que las bandas de proteína se apreciaran con claridad.

#### **9.4.5 Purificación de las proteínas**

La purificación de las quimeras se llevó a cabo a partir de la recuperación de las mismas en cuerpos de inclusión, La fracción insoluble recuperada se lavó 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 6.5 tomando como referencia las condiciones reportadas por Olvera-Carranza *et al.* (2012) para la purificación de SacBTnlevC. La purificación de las mutantes quiméricas se realizó a partir de los

cuerpos de inclusión utilizando el kit de purificación “BugBuster” Protein Extraction Reagent™ (Novagen 70584-4) siguiendo las instrucciones del proveedor. Los cuerpos de inclusión se recuperaron en solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 6.5. La pureza de las proteínas se verificó mediante SDS-PAGE. Una vez purificados, los cuerpos de inclusión se resuspendieron suavemente en 1 volumen de una solución de cloruro de Guanidina 6M (GnHCl) a pH 6.5 mantenida a 4 °C. Para lograr el replegamiento de las proteínas, se utilizó el método de dilución. Las muestras se diluyeron 100 veces en buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 adicionado con arginina 200 mM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM. La dilución se realizó a 4 °C con agitación suave. La muestra final se concentró a un volumen final de 5ml utilizando filtros Millipore de un MWCO de 30,000. La presencia de la proteína pura se verificó mediante SDS-PAGE. La determinación de su actividad global (medida por el método para cuantificar azúcares reductores DNS) se utilizó como parámetro para considerar que se plegaron de forma correcta.

## **9.5 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD**

### **9.5.1 Determinación de la actividad enzimática por azúcares reductores**

La actividad global de las mutantes y quimeras se midió como la velocidad de consumo de sacarosa cuantificando los azúcares reductores liberados (poder reductor) utilizando el método del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). La actividad global incluye tanto la actividad de hidrólisis de la enzima como la de transfructosilación. Una unidad de actividad es igual a una  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de glucosa liberados en un minuto. La reacción se realizó en presencia de sacarosa al 12% a 37 °C en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 6.5. El promedio y la desviación estándar se obtuvieron de mediciones realizadas por triplicado .

### 9.5.2 Determinación de la tasa de hidrólisis/transferencia

Para la determinación del porcentaje de H/T se llevaron a cabo reacciones con las enzimas quiméricas y sus controles utilizando sacarosa al 12%, una concentración de enzima equivalente a 0.5 U/ml e incubación a 37 °C a 350 rpm hasta alcanzar alrededor de un 80% de conversión de sacarosa. Se midieron las concentraciones de fructosa y glucosa libres en el medio de reacción por HPLC en un sistema Waters 600E (Waters Corp. Milford, MA) equipado con un detector de índice de refracción (IR) (Waters 410), y una columna Carbohydrate (4.6 x 250 mm) mantenida a 35 °C, usando como fase móvil acetonitrilo/ agua (75:25) a un flujo de 1 ml/min. El promedio y la desviación estándar se obtuvieron de mediciones realizadas por triplicado.

La concentración de glucosa libre es resultado de la actividad total y es una medida del consumo de la sacarosa. La aparición de fructosa es el resultado de la actividad hidrolítica de la enzima, por lo tanto, la diferencia entre las concentraciones de glucosa y fructosa liberadas al medio de reacción indican la concentración de fructosa que es transferida a la fructana. A partir de este análisis se determinaron las tasas de H/T en un tiempo dado realizando los siguientes cálculos:

$$\text{Actividad total} = [Glc]/t \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{Tasa de transferencia (T)} = ([Glc] - [Fru])/[Glc] \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\text{Tasa de hidrólisis (H)} = [Fru]/[Glc] \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\% \text{ Conversión de sacarosa} = [Sac_{inicial}] - [Glc] / [Sac_{inicial}] \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

donde:  $t$  es tiempo,  $[Glc]$  y  $[Fru]$  son la concentraciones de glucosa y fructosa en el medio en el tiempo  $t$ , respectivamente.  $[Sac_{inicial}]$  es la concentración de sacarosa al inicio de la reacción.



## 9.6 ANÁLISIS DEL PERFIL DE PRODUCTOS

### 9.6.1 Análisis del perfil de fructo-oligosacáridos

La capacidad de las quimeras para producir FOS se evaluó llevando a cabo una reacción con 0.5U/ml de enzima, sacarosa 12%, 500 rpm a 37 °C durante 16 horas utilizando como control las mutantes respectivas a cada quimera. Los productos de reacción se analizaron por HPLC (Waters) con un detector IR empleando una columna C-18 a una temperatura de 30 °C. Se empleó como fase móvil agua y un flujo de 0.7 ml/min.

### 9.6.2 Obtención del perfil de polímero

La capacidad de las quimeras y los respectivos controles para producir polímero se analizó por cromatografía de permeación en gel por HPLC (Waters con) un detector IR, empleando dos columnas de permeación en gel en serie: Ultrahydrogel lineal y Ultrahydrogel 500 a una temperatura de 35 °C. Se empleó como fase móvil nitrato de sodio 100 mM a un flujo de 0.8 ml/min. El perfil de polímero se evaluó a partir de reacciones realizadas bajo las mismas condiciones utilizadas para la obtención del perfil de FOS.

## 9.7 CONSTRUCCIÓN Y SIMULACIÓN MOLECULAR DE UN MODELO DE SACBTnLevC

### 9.7.1 Modelamiento de SacBTnLevC

La secuencia primaria de aminoácidos de la quimera SacBTnLevC se introdujo en el servidor de I-tasser (Ambrish Roy *et al.* 2010) y se obtuvo un modelo de la quimera. Este servidor combina las técnicas de hilvanado, modelamiento *ab initio* y refinamiento de estructuras a nivel atómico para predecir la estructura-función de proteínas. Para

los análisis se eligió el modelo con mayor puntuación (C-score= -1.383 TM score= 0.54  $\pm$  0.15; RMSD= 10.9  $\pm$  4.6 Å).

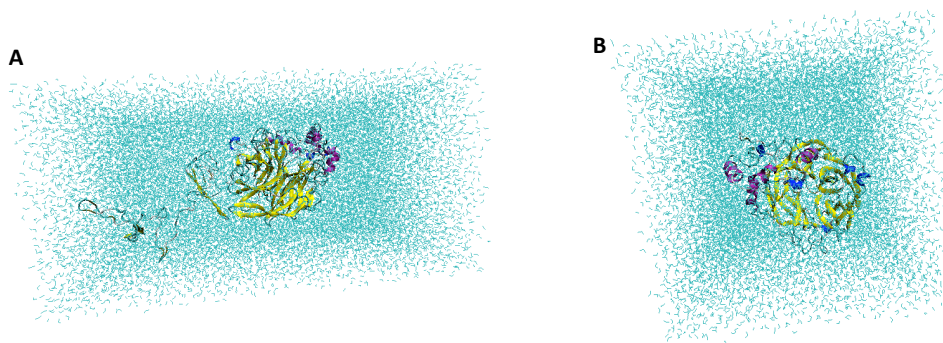
Para llevar a cabo las simulaciones moleculares se preparó el modelo de SacBTnLevC utilizando como referencia el dominio catalítico de la estructura cristalográfica de SacB en complejo con sacarosa (PDB: 1PT2). Para efectos comparativos se llevaron a cabo simulaciones con la estructura cristalográfica de SacB en complejo con la sacarosa de forma paralela.

### 9.7.2 Preparación de los modelos SacBTnLevC y SacB

Previo a la simulación molecular, es necesario refinar y preparar el sistema que se desea evaluar. Para refinar los modelos de SacBTnLevC y SacB, primero se agregaron los átomos de hidrógeno faltantes, los cuales no se incluyen en los PDBs. En la mayoría de las estructuras, también es necesario corregir impedimentos estéricos, ángulos dihedrales y estados protonación de cada residuo (Bower *et al* 2006). Para realizar este proceso se utilizó el paquete "Protein Preparation Wizard" del programa para realizar modelamiento molecular Maestro versión 9.3 (Schrödinger 2012).

Por otro lado, la estructura de las proteínas está influenciada por el ambiente del solvente y es en este ambiente en el que llevan a cabo su función (Perutz *et al.* 2001). Por esta razón, para simular el comportamiento molecular de una proteína lo más preciso posible, es necesario solvatar el sistema. Los modelos de SacBTnLevC y SacB se solvataron con el paquete "System Builder" del programa para realizar simulaciones moleculares Desmond versión 3.1 (Schrödinger, 2012) utilizando una caja ortorrómbica de 24 x 12 x 12 Å<sup>3</sup> y una caja de agua de 12 x 12 x 12 Å<sup>3</sup>, respectivamente, utilizando un modelo de moléculas de agua tipo SPC. El sistema se neutralizó añadiendo iones de Na<sup>+</sup>, para reproducir la solución amortiguadora en la que se mantiene la proteína. En ambas estructuras se utilizaron condiciones periódicas de contorno (CPC). Al utilizar CPC cada caja de simulación se replica

periódicamente, de forma que cada copia del sistema está rodeada de copias virtuales de si mismo en todas las direcciones. Si una molécula abandona la caja en una dirección durante la simulación, puede re-entrar de forma inmediata en la dirección opuesta. Así, el sistema no está limitado por ninguna superficie. En la Fig. 13 se muestran a SacBTnLevC y SacB dentro de sus cajas de solvatación.



**Figura 13.** A) Sistema SacBTnLevC en caja ortorrómbica y B) SacB en caja de agua. Las moléculas de agua están representadas en turquesa.

Como paso final para la preparación de las proteínas, el sistema se relajó con pasos de minimización. El procedimiento utilizado para minimizar el sistema se resume en la tabla 9.

**Tabla 9. Secuencia de los pasos de minimización de los sistemas SacBTnLevC y SacB en complejo con sacarosa.**

Paso	Procedimiento
1	Minimización energética del sistema con la proteína congelada manteniendo las moléculas de agua libres
2	Minimización del sistema congelando las moléculas de agua y permitiendo que la proteína se mueva libremente
3	Minimización de todo el sistema libre.

Las simulaciones moleculares se realizaron utilizando como campo de fuerza OPLS-2005. Para reproducir las condiciones experimentales de forma precisa, se consideraron condiciones de presión (1 bar), temperatura (300 K) y número de moléculas constantes.

Primero, se realizó una simulación de calentamiento o simulated annealing (SA). El SA es una estrategia que consiste en elevar la temperatura a un valor alto (400 K) antes de relajar el sistema, y se reduce en pasos subsecuentes hasta alcanzar la temperatura deseada (temperatura de trabajo). Este procedimiento permite que el sistema alcance un estado energético menor al inicial, que de otra forma no sería posible alcanzar en el lapso de tiempo en que se realiza la simulación. El SA se llevó a cabo en seis pasos que se resumen en la Tabla 10. Una vez que se equilibró el sistema a la temperatura de trabajo (300 K) se simularon 4 ns.

**Tabla 10. Condiciones utilizadas durante la simulación de calentamiento**

	1	2	3	4	5	6
<b>Tiempo (ps)</b>	30	100	200	300	500	1000
<b>Temperatura (K)</b>	10	100	300	400	400	300

### 9.7.3 Cálculo de RMSD y RMSF

El cálculo de la desviación media cuadrática, **RMSD** por sus siglas en inglés (Root Mean Square Deviation) es una medida numérica de la diferencia entre dos o más estructuras. Esta medida permite evaluar el grado de desplazamiento intrínseco de la molécula a largo de la dinámica y eventualmente identificar puntos en el tiempo en los que ocurre algún cambio conformacional importante. Se puede definir como:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{átomos}} (r_i(t_1) - r_i(t_2))^2}{N_{átomos}}} \quad \text{Ecuación 5}$$

donde  $N_{\text{átomos}}$  es el número de átomos cuyas posiciones se comparan y  $r_i(t)$  es la posición de átomo  $i$  en el tiempo  $t$ .

La fluctuación media cuadrática, **RMSF** (Root Mean Square Fluctuation) se usa como una medida de la desviación entre la posición de una partícula  $i$  y una posición de referencia. En la simulación molecular la RMSF se calcula para cada residuo de la proteína y de esta forma es posible identificar los aminoácidos con mayor o menor fluctuación en la molécula. La RMSF se puede definir como:

$$RMSF = \sqrt{\frac{\sum_{t_j=1}^T (r_i(t_j) - r_i)^2}{T}} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde  $T$  es el tiempo de duración del análisis y  $r_i$  es la posición de referencia del átomo  $i$ .

La diferencia entre RMSD y RMSF es que con esta última el promedio se calcula a lo largo del tiempo, dando un valor para cada átomo  $i$ . Con la RMSD se calcula el promedio de las posiciones de los átomos dando valores específicos de tiempo.

Se utilizaron los programas Maestro versión 3.1 y VMD versión 1.9.1 (Humphrey *et al.* 1996) para calcular la RMSD y la RMSF.

#### 9.7.4 Cálculo de interacciones energéticas no enlazantes

Las interacciones energéticas no enlazantes: energía de van der Waals y energías electrostáticas se calcularon con el paquete de Análisis de Trayectoria de Desmond. Se utilizó el programa de visualización y análisis molecular VMD para calcular los enlaces de hidrógeno que mantiene la sacarosa a lo largo de la simulación eligiendo como molécula de referencia la sacarosa dentro de la cavidad catalítica.

## 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 10.1 CONSTRUCCIÓN, CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LAS QUIMERAS R433ATn, R360STn y Y429NTn.

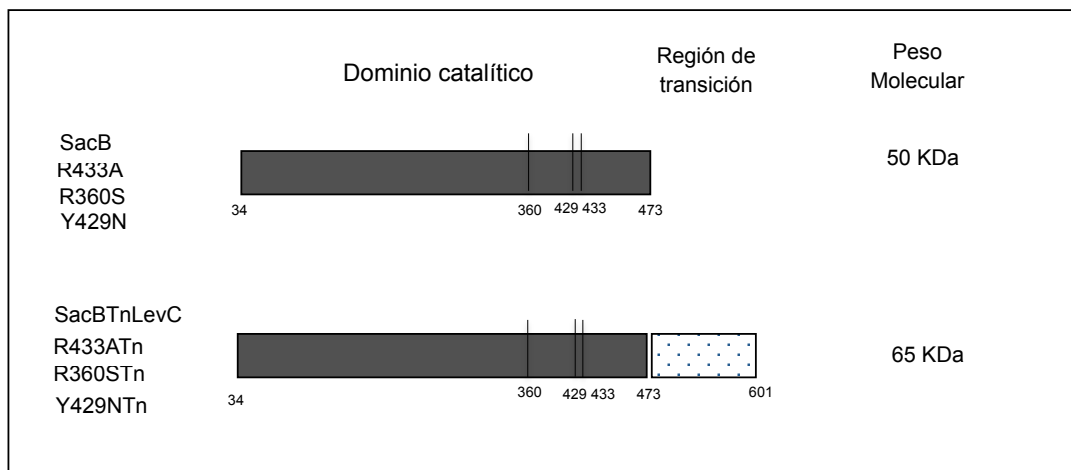
Con base en el diseño de la quimera SacBTnLevC y con el fin de evaluar el efecto de la fusión de la región de transición en mutantes con propiedades distintas de SacB, se eligieron las mutantes R433A, R360S y Y429N construidas por Ortiz Soto *et al.* (2008) dentro de nuestro grupo de trabajo. Estas mutantes se eligieron porque a diferencia de SacB, no producen polímero y sólo producen oligosacáridos, aunque como consecuencia de la mutación vieron incrementada considerablemente su actividad hidrolítica. Por otro lado, se eligió la quimera SacBTnLevC ya que dentro de las quimeras de SacB con alta eficiencia para la transfructosilación es la más eficiente en la transferencia a polímero (Olvera-Carranza *et al.* 2012).

#### 10.1.1 Construcción y clonación de las mutantes quiméricas

Bajo el esquema general del diseño de la quimera de SacB fusionada a la región de transición de LevC (Materiales y Métodos) se construyeron las quimeras de SacB correspondientes a cada mutante: R433A, R360S y Y429N (Fig.14). Como controles a lo largo del trabajo se utilizaron dichas mutantes sin la región adicional, así como la quimera SacBTnLevC.

La construcción de las quimeras se realizó tomando como patrón la construcción de SacBTnLevC insertada en el vector pET-32b(+), a partir de una reacción de mutagénesis sitio dirigida utilizando el sistema de Mutagénesis Sitio Dirigida (Stratagene). Este vector fusiona la proteína tioredoxina en la región N-terminal, así como una etiqueta de 6 histidinas en la región C-terminal.

Cabe mencionar que la región de transición de LevC posee de forma natural una región entre dominios (región espaciadora) que permite el plegamiento independiente de las proteínas.

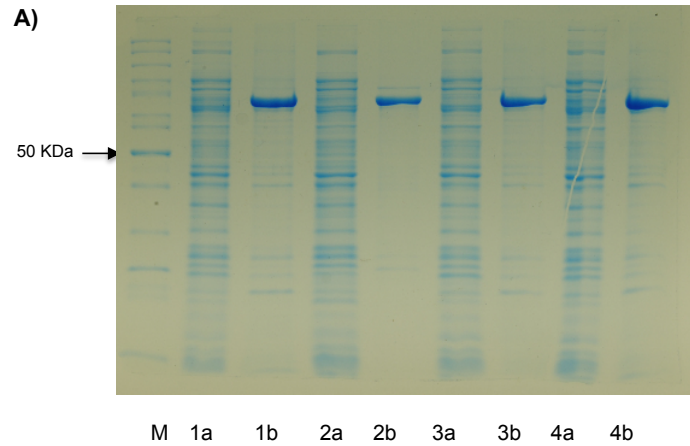


**Figura 14.** Esquema de las mutantes de SacB y las mutantes quiméricas generadas a partir de la región de transición de LevC de *L. mesenteroides* y las mutantes de SacB de *Bacillus subtilis*.

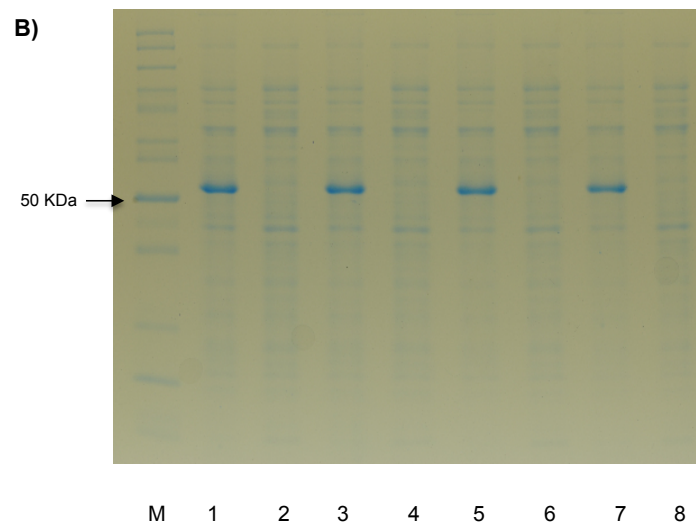
### 10.1.2 Expresión de las quimeras

Tras la obtención del extracto enzimático a partir de la metodología descrita en Materiales y Métodos se observó mediante SDS-PAGE el perfil de expresión proteica tanto en la fracción soluble como en la insoluble (Fig.15). Las quimeras de las mutantes se encontraron principalmente como cuerpos de inclusión, ya que al igual que con SacBTnLevC (Olvera-Carranza *et al.* 2012), la adición de la región de transición de LevC a las mutantes de SacB da lugar a proteínas poco solubles, probablemente debido a la gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos que posee esta región. En la Fig. 16 se compara la expresión de la fracción soluble de las mutantes de SacB con sus versiones quiméricas. Las quimeras se obtienen en la fracción soluble en una concentración muy baja, casi imperceptible mediante SDS-PAGE. Sin

embargo, fue posible determinar su presencia a través de la medición de actividad por el método para la cuantificación de azúcares reductores DNS (Materiales y métodos).



**Figura 15.** Extractos (a) solubles y (b) insolubles (restos celulares) de las células que expresan las diferentes quimeras. M) Marcador de peso molecular, 1) SacBTnLevC, 2) R433ATn, 3) R360STn, 4) Y429NTn.



**Figura 16.** Extractos solubles de las mutantes y quimeras expresadas. M) Marcador de peso molecular, 1) SacB, 2) SacBTnLevC, 3) R433A, 4) R433ATn, 5) R360S, 6) R360STn, 7) Y429NTn, 8) Y429NTn.



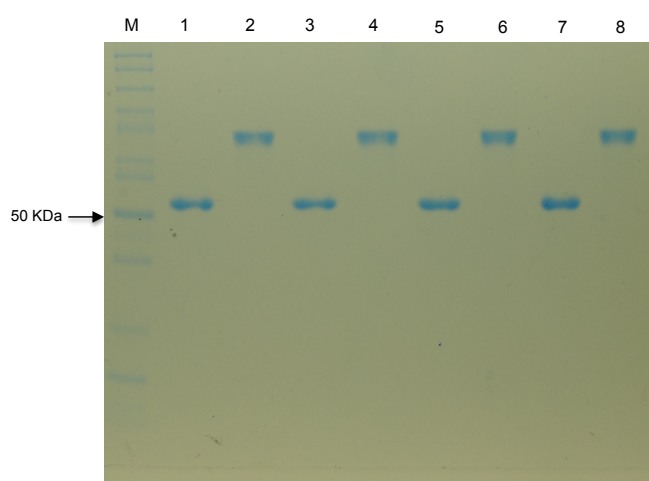
Como se observa en Tabla 9, los niveles de actividad en los extractos solubles de las quimeras comparados con los niveles de las mutantes son sensiblemente menores al incorporarles la región de transición. Este mismo fenómeno se reportó en la construcción tanto de SacBTnLevC como de SacBTnIsIA (Olvera-Carranza *et al.* 2012). Sin embargo, una vez que estas quimeras fueron purificadas y replegadas, se pudo determinar que el bajo nivel de actividad detectada en el sobrenadante (fracción soluble) se debe a la baja concentración con la que se recupera la enzima en esta fracción. Con este antecedente, se decidió proceder con la purificación y recuperación de las quimeras a partir de cuerpos de inclusión (fracción insoluble) para cumplir con los objetivos planteados a lo largo de este proyecto.

**Tabla 11. Tamaño del gen, peso molecular y actividad de la enzima de las mutantes y quimeras a partir de extractos celulares totales.**

<b>PROTEÍNA</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Tamaño (aa)</b>	<b>PM (KDa)</b>	<b>Actividad (U/ml)</b>	<b>Actividad específica (U/mg)</b>
<b>SacB</b>	1317	439	50	800	24.24
<b>SacBTnLevC</b>	1701	567	65	186.66	12.44
<b>R433A</b>	1317	439	50	216.65	14.39
<b>R433ATn</b>	1701	567	65	26.17	1.48
<b>R360S</b>	1317	439	50	11.97	0.77
<b>R360STn</b>	1701	567	65	0.93	0.07
<b>Y429N</b>	1317	439	50	6.32	0.51
<b>Y429NTn</b>	1701	567	65	0.38	0.03

## 10.2 RECUPERACIÓN DE LAS QUIMERAS A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSIÓN DE INCLUSIÓN

Con el fin de obtener proteína activa y libre de enzimas contaminantes, llevamos a cabo la purificación y el replegamiento de las quimeras a partir de cuerpos de inclusión. Se encontró que partir de las condiciones utilizadas para realizar la dilución descrita en la sección de Materiales y Métodos, fue posible recuperar la enzima de forma activa con una concentración de 1.15 mg/ml para SacBTnLevC y de 1.5 mg/ml para R433ATn, R360STn y Y429NTn (Fig. 17).



**Figura 17.** SDS-PAGE de las enzimas puras y replegadas. M) Marcador de peso molecular, 1) SacB, 2) SacBTnLevC, 3) R433A, 4) R433ATn, 5) R360S, 6) R360STn, 7) Y429N y 8) Y429NTn.

Partiendo de la suposición que la concentración de enzima recuperada se encuentra adecuadamente plegada, se determinó su actividad específica utilizando el método DNS para la cuantificación de azúcares reductores. Las actividad específica de las mutantes también se determinó empleando el mismo método (Tabla 10).

**Tabla 12. Actividades específicas globales de SacB, mutantes y quimeras.**

<i>Enzima</i>	<i>U/mg</i>	<i>Quimera</i>	<i>U/mg</i>
<b>SacB</b>	216 ± 30	<b>SacBTnLevC</b>	261 ± 4
<b>R433A</b>	104 ± 19	<b>R433ATn</b>	134 ± 1.3
<b>R360S</b>	12 ± 0.2	<b>R360STn</b>	4 ± 0.5
<b>Y429N</b>	2 ± 0.3	<b>Y429NTn</b>	1 ± 0.1

Si se toma como referencia la actividad específica de la enzima silvestre SacB (216 ± 30) como un valor del 100%, el efecto de las mutaciones en R433A, R360S y Y429N provocó un detrimento en la actividad del 52, 94 y 99% respectivamente, lo que resulta en enzimas ineficientes para la transformación de la sacarosa. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Ortiz-Soto *et al.* (2008) donde a partir de la caracterización cinética de las mutantes, se pudo observar que la *k<sub>cat</sub>* de las mutantes disminuyó considerablemente con respecto a la *k<sub>cat</sub>* de SacB.

SacBTnLevC, por su parte, es aproximadamente 20% más activa que SacB. Tal como describen Olvera-Carranza *et al.* (2012), la adición de la región de transición a SacB se traduce en un biocatalizador más eficiente para la transfructosilación tanto en la actividad de la enzima como en el rendimiento del polímero. Por tanto, las quimeras construidas a partir de las mutantes de SacB podrían poseer también una mayor actividad en comparación con las mismas mutantes.

Al medir las actividades específicas de cada quimera y compararla con su respectiva mutante (Tabla 10), encontramos que al incorporar la región transición en la quimera R433ATn la actividad específica es de 134.1 U/mg, 28% mayor que la mutante R433A.

Sin embargo, la quimera R360STn tiene una actividad específica de 4.4 U/mg, 38% menor que la de la mutante R360S. De forma similar, Y429NTn tiene una actividad de 1.1 U/mg, es decir es 48% menos activa que Y429N. La adición de la región de transición a las mutantes R360S y Y429N resultó en enzimas con una menor actividad que las mutantes de donde surgieron, lo

que resulta contrario a la hipótesis del trabajo que hacia suponer que al construir quimeras se obtendrían enzimas más eficientes para la transformación de sacarosa en productos de transfructosilación. Es probable que además de la adición de la región de transición que provoca la insolubilización de las quimeras, la cercanía de estas mutantes al sitio activo pudo haber afectado también el proceso de replegamiento al que son sometidas para recuperar la actividad, dando lugar a una solución con proteína soluble pero con poca actividad.

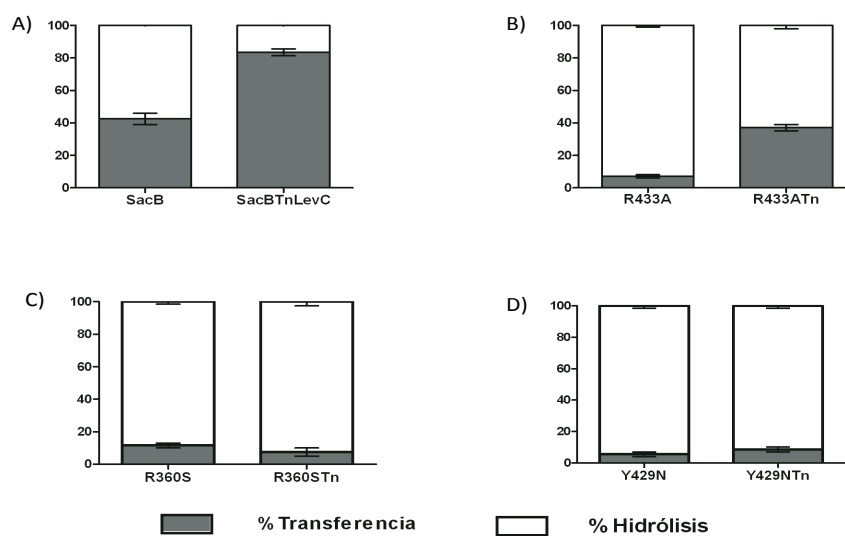
Este resultado sugiere que la estrategia de fusionar la región de transición de LevC para lograr un aumento en la actividad específica no puede generalizarse a cualquier levansacarasa incluso a aquellas que solo difieren en un aminoácido. Para que esta estrategia funcione, sería necesario primero definir el tipo de interacciones que se requieren para que la enzima mejore sus capacidades catalíticas y definir las zonas de interacción entre los fragmentos fusionados (SacB y TnLevC), lo que no es posible sin un modelo que permita concluir cómo y de qué tipo son estas interacciones. Por otro lado, también podría explorarse la posibilidad de construir quimeras adicionando la región de transición proveniente de otras enzimas, como por ejemplo IsIA de *L. citreum*, ya que a pesar de que la quimera SacBTnIsIA (Olvera-Carranza *et al.* 2012) también presenta una mayor capacidad para la transfructosilación, la identidad que conservan entre sí esta región y la región de transición de LevC es sólo de alrededor del 15%.

### **10.3 RELACIÓN HIDRÓLISIS/ TRANSFERENCIA**

Además de una mayor actividad específica, la adición de la región de transición a SacB resultó en una enzima con una mayor capacidad para transferir residuos fructosilo hacia la molécula de fructana actuando como aceptor, y en consecuencia la reducción de la hidrólisis (Olvera-Carranza *et al.* 2012). Con el fin de determinar si con las quimeras construidas a partir de las mutantes de SacB y la región de transición es posible observar un resultado similar, se

determinó la especificidad de reacción de las quimeras utilizando como controles SacB, SacBTnLevC y las respectivas mutantes. Los resultados se ilustran en la Fig. 18.

El resultado obtenido con R433ATn fue el esperado de acuerdo con la hipótesis del trabajo. Su tasa de hidrólisis es del 61% mientras que su tasa de transferencia es del 39% (Fig. 17B), además de presentar un aumento en la actividad específica. En este sentido se puede decir que R433ATn recuperó la capacidad de transferasa ya que, mientras R433A presentó una tasa de transferencia de sólo el 10%, R433ATn tuvo una tasa transferencia 4 veces mayor, reduciéndose drásticamente el efecto que ejerce la mutación sobre la hidrólisis del sustrato y permitiéndole alcanzar una tasa de transferencia que resulta muy similar a la de SacB.



**Figura 18.** Relación hidrólisis/transferencia en la reacción de las quimeras y las mutantes. Se muestra el porcentaje de conversión de sacarosa referente al porcentaje transferido (gris) y el porcentaje de sustrato hidrolizado (blanco). Condiciones de reacción: 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5 U/mL y ~80% de conversión.

Sin embargo, esto no ocurrió al analizar R360STn y Y429NTn (Fig. 17 C y D). En ambos casos, aunado a la caída de la actividad específica, la tasa de H/T resultó similar que la de sus contrapartes carentes de la región adicional.

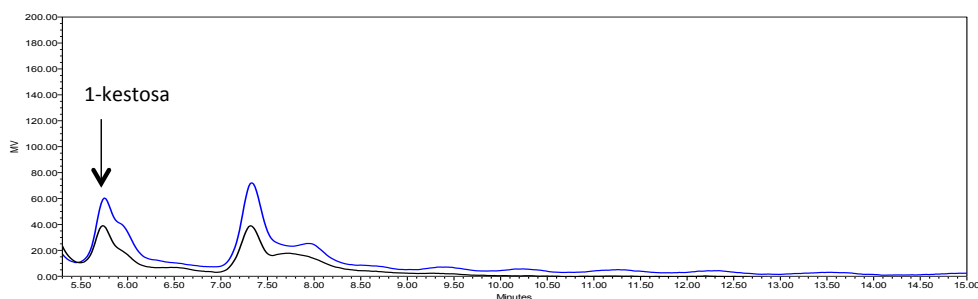
## 10.4 PERFIL DE PRODUCTOS DE QUIMERAS Y MUTANTES

### 10.4.1 Perfil de fructo-oligosacáridos

Las mutantes R433A, R360S y Y429N producen FOS como principal producto de transfructosilación (Ortiz-Soto *et al.* 2008) y no son capaces de producir polímero. Como hipótesis inicial, si la adición de la región de transición a las mutantes da lugar a enzimas con una mejor capacidad para la transferencia, la producción de FOS se vería mejorada, en particular en R433ATn cuya actividad y tasa de transferencia son mayores que R433A.

Para determinar la capacidad de las quimeras para producir FOS, se llevaron a cabo reacciones usando como controles SacB y las tres mutantes R433A, R360S y Y429N (Materiales y Métodos). SacB es capaz de producir FOS, sin embargo lo hace en baja concentración (Euzenat *et al.* 1996; Ortiz-Soto *et al.* 2008) en comparación con el polímero que sintetiza. También se evaluó la producción de FOS de su contraparte quimérica SacBTnLevC, ya que la capacidad de esta enzima para producirlos no había sido evaluada anteriormente.

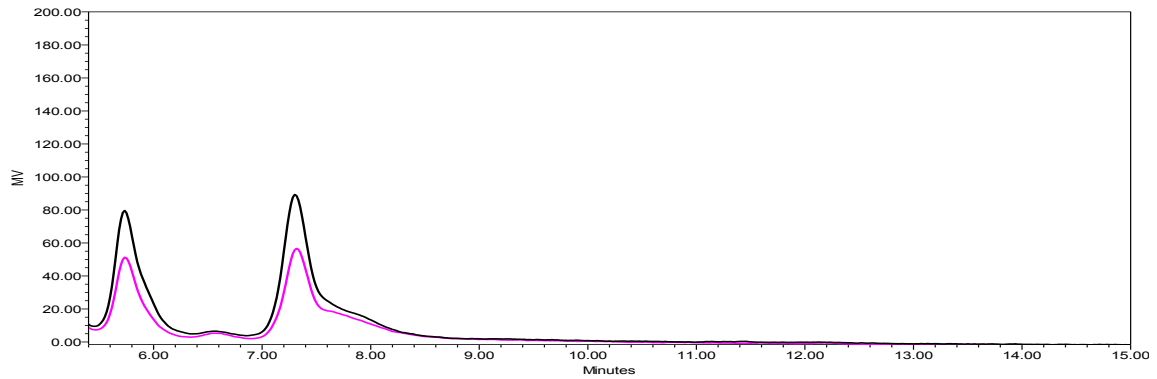
Al evaluar el perfil de productos tanto de SacB como de sus quimeras, se encontró que SacBTnLevC produce FOS de la misma naturaleza que SacB (Fig. 19), sin embargo, la quimera los produce en menor cantidad.



**Figura 19.** FOS producidos por SacB (azul) y SacBTnLevC (negro) a partir de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5 U/mL y ~80% de conversión. El perfil de productos se analizó por HPLC utilizando una columna C-18.

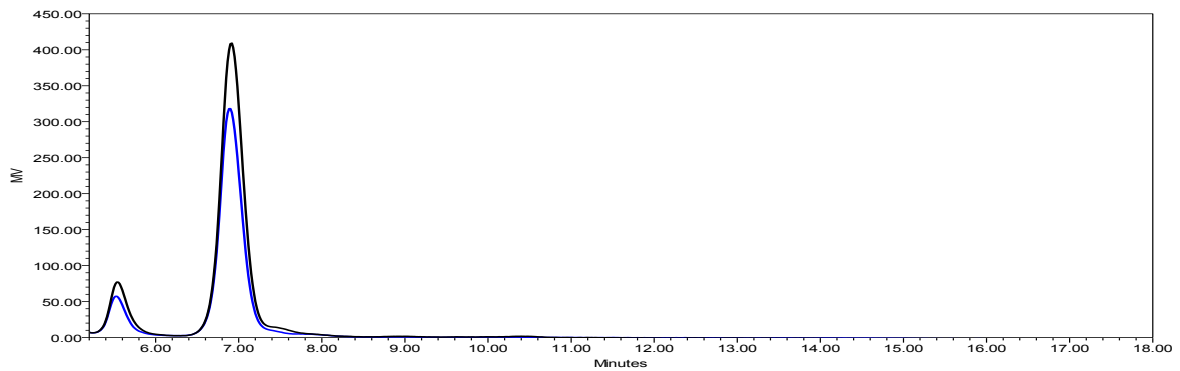
SacB sintetiza como oligosacárido principal 1-kestosa además de otros oligosacáridos de mayor grado de polimerización que aún no han sido propiamente identificados (Fig.19). El mecanismo por el cual la enzima produce estos FOS no se conoce con exactitud. Euzenat *et al.* (1996) proponen que la enzima es capaz de adicionar una fructosa a la molécula aceptora con un enlace de tipo  $\beta$ 2-1, pero dado que la levansacarasa forma preferencialmente enlaces del tipo  $\beta$ 2-6 es probable que el sitio activo posea muy baja afinidad por esta molécula recién formada, y por lo tanto no sea capaz de adicionarle otras unidades de fructosa para elongarla en pasos posteriores.

De forma similar, la quimera R433ATn produce FOS de la misma naturaleza que R433A pero en menor cantidad (Fig. 20). Si los FOS son productos de una reacción en la que éstos no pudieron ser elongados en pasos posteriores, la adición de la región de transición podría estar ejerciendo un impacto en el mecanismo procesivo de la enzima que permite una mayor y más eficiente elongación de la molécula aceptora, lo que se traduce en una menor acumulación de productos de BMM.



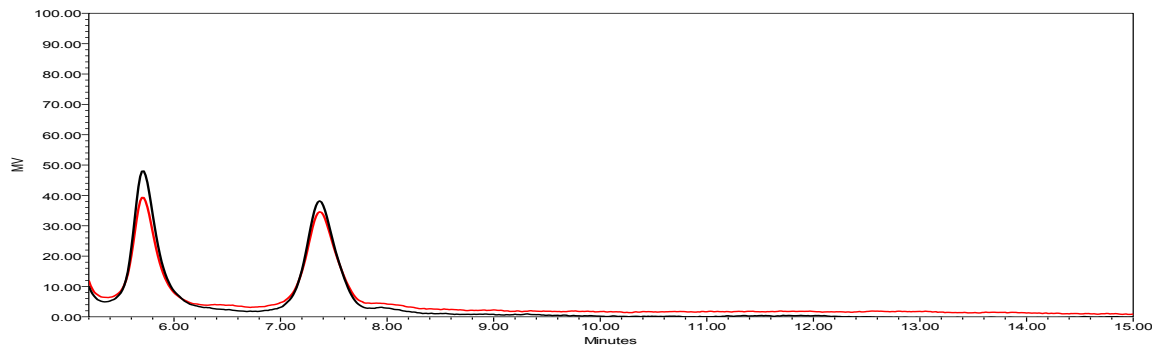
**Figura 20.** FOS producidos por R433A (negro) y R433ATn (rosa) a partir de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5 U/mL y ~80% de conversión. El perfil de productos se analizó por HPLC utilizando una columna C-18.

El perfil de FOS obtenido en R360STn y Y429NTn no se modifica con respecto al que se observa con las mutantes R360S y Y429N, respectivamente aunque se producen en una menor cantidad (Figs. 21 y 22). En este caso, la menor producción de FOS podría también atribuirse a la baja actividad de estas quimeras.



**Figura 21.** FOS producidos por R360S (negro) y R360STn (azul) obtenidos a partir de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5U/mL y ~80% de conversión. El perfil de productos se analizó por HPLC utilizando una columna C-18.





**Figura 22.** FOS producidos por Y429N (negro) y Y429NTn (rojo) a partir de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5U/mL y ~80% de conversión. El perfil de productos se analizó por HPLC utilizando una columna C-18.

Podría sugerirse que, adicionar la región de transición a enzimas que producen FOS como principal producto de transfructosilación no es una estrategia adecuada para aumentar su eficiencia y reducir la hidrólisis del sustrato. Sin embargo, R433ATn resultó ser una excepción. A pesar de que no produce FOS en mayor concentración que R433A, presenta una mayor tasa de transferencia, tal como se había planteado en la hipótesis de este trabajo. Es probable que este aumento en la transferencia se deba a la formación de fructanas de mayor masa molecular que los FOS, mismas que no pueden ser detectadas mediante los mismos métodos para detección de FOS descritos en esta sección.

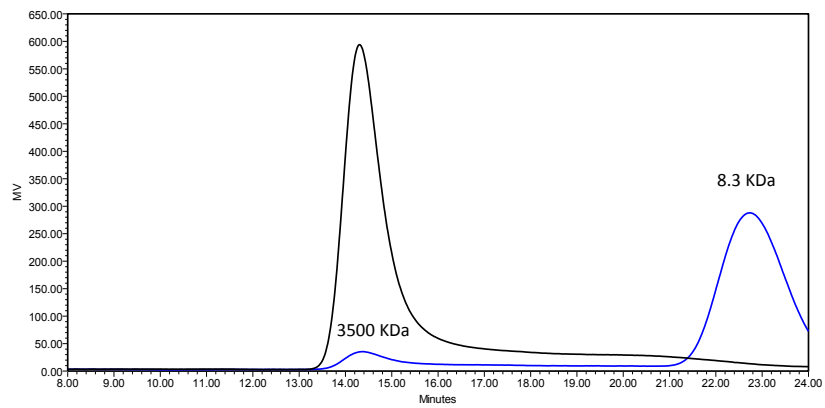
#### 10.4.2 Síntesis de polímero

Se analizó el efecto de la región de transición en las quimeras SacBTnLevC y R433ATn, sobre la producción de polímero mediante cromatografía de permeación en gel, así como para la quimeras R360STn y Y429NTn.

La caracterización del perfil de polímero que sintetiza SacBTnLevC no fue concluida por Carranza-Olvera *et al.* (2012) y por lo tanto, se completo en este trabajo. Al analizar el polímero sintetizado por SacBTnLevC bajo las mismas condiciones de reacción y tiempo de

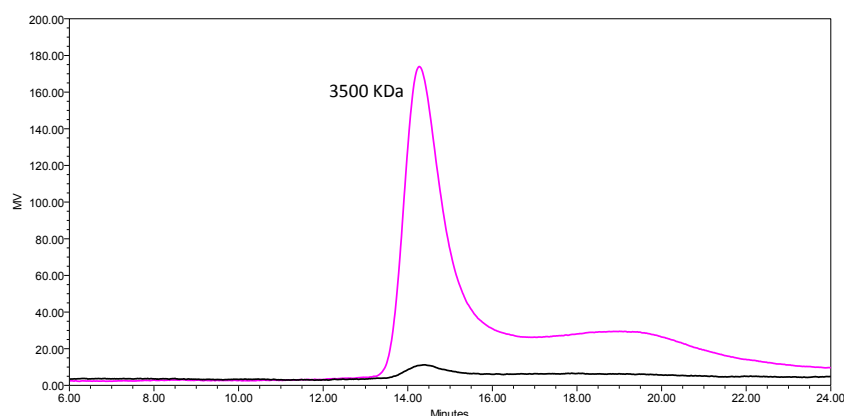
incubación que SacB, se encontró que la quimera sintetiza polímero de AMM (aprox. 3500 KDa) y no se observa una acumulación de polímero de BMM (Fig. 23). En contraste, el polímero de SacB presenta una distribución bimodal de una masa molecular promedio de 3500 KDa y 8.3 KDa respectivamente, que coinciden con los reportados por Euzenat *et al.* (1996) y Ortiz-Soto *et al.* (2008). Al fusionar la región de transición con SacB, no sólo se afectó la tasa de H/T como reportan Olvera-Carranza *et al.* (2012), sino que además bajo las condiciones probadas en este trabajo, la capacidad para sintetizar estructuras de AMM cambió. Este resultado contrasta con lo reportado por del Moral *et al.* (2008), quienes encontraron que las deleciones en el C-terminal de IsIA no ejercen una influencia importante sobre la distribución de la masa molecular de la inulina. Al llevar a cabo ensayos de cromatografía de permeación en gel, del Moral *et al.* (2008) encontraron que los polímeros tienen una distribución de masa molecular entre 90 KDa y 4,440 KDa, similar al polímero producido por la IS silvestre. Morales *et al.* (2007) reportan a su vez, que la versión de la LS LevS de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F que carece del C-terminal completo produce un polímero de masa molecular muy similar al de su versión completa (de 7400 KDa y 6000 kDa, respectivamente). En el caso de SacBTnLevC el cambio de especificidad en la masa molecular de la levana es radical, ya que no se observa polímero de BMM.

Resultaría interesante explorar distintos tiempos de reacción con el fin de observar si en algún momento de la cinética de reacción con SacBTnLevC, se observa la formación de polímero de BMM, o si la región de transición provoca una modificación en el mecanismo procesivo en SacBTnLevC que le impide formar polímero de BMM.



**Figura 23.** Polímero de *SacB* (línea azul) y *SacBTnLevC* (línea negra) obtenido a partir de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5 U/mL y ~80% de conversión. *SacB* presenta una distribución bimodal de polímero con una masa molecular de 3500 y 8.3 KDa. *SacBTnLevC* sólo produce plímero de 3500 KDa. El perfil de productos se analizó por HPLC utilizando un arreglo serial de columnas Ultrahydrogel U500 y Linear .

Se observó que la quimera R433ATn (Fig. 24) también sintetiza polímero de AMM (3500KDa) de forma similar al producido por *SacBTnLevC* y un polímero de masa molecular intermedia (Fig. 22). La adición de la región de transición a R433A provocó una reversión en la capacidad de esta mutante para producir polímero, misma que había disminuido significativamente (Ortiz-Soto *et al.* 2008). El aumento en la transferencia que se observa en la quimera R433ATn es entonces resultado de esta “recuperación” de la capacidad para producir polímero.



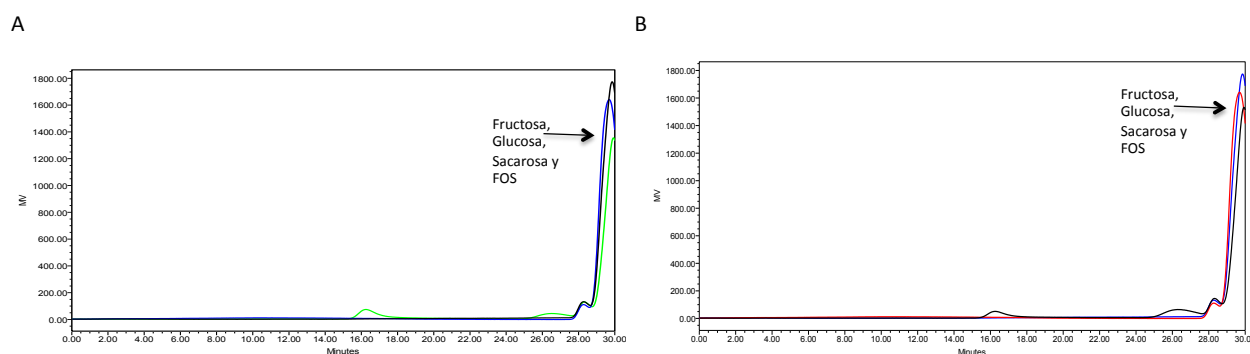
**Figura 24.** Polímero producido por R433A (línea negra) y R433ATn (línea rosa) a partir de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5 U/mL y ~80% de conversión. R433A no produce polímero de forma significativa mientras que R433ATn produce polímero de 3500 KDa y de masa molecular intermedia. El perfil de productos se analizó por HPLC utilizando un arreglo serial de columnas Ultrahydrogel U500 y Linear .

Porras *et al.* (2012) en su trabajo de maestría realizado dentro de nuestro grupo de trabajo, estudió diferentes factores que afectan la masa molecular del polímero de SacB a lo largo de la reacción, con el fin de encontrar un método estandarizado para la producción de levana con una sola distribución de masa molecular. Al evaluar distintas concentraciones de sustrato (100-600 g/l) y concentraciones de enzima (0.1, 1, 5 y 10 U/ml) encontró que la única condición en la que fue posible sintetizar polímero de AMM fue utilizando una concentración de enzima de 0.1 U/ml en el volumen de reacción. Sin embargo, al usar una concentración tan baja de enzima sólo se consiguió una conversión del sustrato de un 25% en tiempos de reacción de más de 20 horas. Usando concentraciones más altas de enzima, como 5 U/ml, la distribución de masa molecular que se obtiene es bimodal, y con 10 U/ml de enzima es posible lograr únicamente la acumulación de polímero de BMM.

Tanto SacBTnLevC como R433ATN sintetizan polímero de AMM cuando se utiliza una concentración de sustrato de 120 g/l con una tasa de conversión del sustrato del 80% a un

tiempo de reacción de 16 horas, por lo que representan biocatalizadores potenciales para la producción de levadura de AMM. Resultaría interesante llevar a cabo experimentos similares a los realizados con SacB, evaluando el rendimiento del polímero que se produce y sus características, al llevar a cabo reacciones con diferentes concentraciones de sustrato y enzima.

Por otro lado, al igual que en los ensayos anteriores, se comprobó que la estrategia de fusionar la región de transición a R360S y Y429N no tuvo efecto sobre su capacidad para la transfructosilación, ya que las quimeras R360STn y Y429NTn tampoco son capaces de sintetizar polímero (Fig. 25 A y B).



**Figura 25.** Cromatograma obtenido a partir del análisis de una reacción con 12% de sacarosa, pH 6, 37°C, 0.5U/mL y ~80% de conversión de **A)** R360S (negro), R360STn (azul) y SacB como control (verde) y **B)** Y429N (azul), Y429NTn (rojo) y SacB como control (negro). El análisis se realizó por HPLC utilizando un arreglo serial de columnas Ultrahydrogel U500 y Linear.

¿Por qué la estrategia de fusionar la adición de la región de transición resulta exitosa en el caso de la enzima silvestre y la quimera R433ATn, pero no en las quimeras que portan las mutaciones R360S y Y429N?

Una hipótesis es que a diferencia de la mutante R433A, las mutantes Y429N y R360S se encuentran en posiciones determinantes (subsitos -1 y +1, respectivamente) para que el sustrato se acomode de forma adecuada y se pueda llevar a cabo una eficiente reacción de

transfructosilación. Por tanto, se sugiere que estas mutaciones provocaron un efecto tan drástico en la enzima que la región de transición adicional que poseen las quimeras no es capaz de contrarrestar dicho efecto. Por otro lado, los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo sugieren que la Arg en la posición 433, a pesar de ser importante para una eficiente transferencia y en la estabilidad de la enzima, no interactúa de forma directa con el sustrato. La interacción indirecta con el sustrato permitiría que los cambios estructurales que se originaron al fusionar la región de transición a SacB contendieran con el efecto de haber mutado Arg 433 por una Ala en la quimera R433ATn.

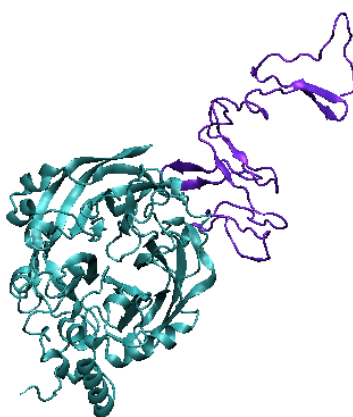
Para poder comprobar estas hipótesis sería necesario conocer la estructura de al menos una de las quimeras de SacB fusionada con la región de transición que pudiera brindar mayor evidencia sobre la forma en que se pliega esta región con respecto al dominio catalítico de SacB y diera además, indicios sobre los cambios estructurales que pudiera haber ocasionado la adición de esta región a la enzima. Sin embargo, la producción de cristales para realizar estudios de difracción no es posible a corto plazo.

## **10.5 CONSTRUCCIÓN Y SIMULACIONES MOLECULARES DE UN MODELO DE LA QUIMERA SacBTnLevC**

### **10.5.1 Construcción de un modelo de la quimera SacBTnLevC**

Una alternativa utilizada para predecir la estructura tridimensional de una proteína es la de elaborar un modelo a través de un servidor especializado. Con el objetivo de analizar el plegamiento de la región de transición de LevC con respecto a SacB, se generó un modelo de SacBTnLevC (Fig. 26) como se describe en Materiales y Métodos.

De acuerdo al servidor, el dominio catalítico se modeló a partir de la estructura cristalográfica de SacB (PDB: 1OYG) y se muestra de color turquesa en la Fig. 26. La región de transición fue modelada de acuerdo a la homología con los módulos de unión a ácidos teicoicos de la fosforilcolin esterasa PCE (CBPE) de *Streptococcus Pneumoniae* (PDB: 2BIB) conocidos como motivos CW. Esto coincide con los alineamientos estructurales donde la región de transición posee alrededor de un 20% de identidad a nivel de secuencia y una similitud del 40%. En la PCE, los módulos CW consisten en una secuencia consenso: GWXK-X<sub>4-5</sub>-WYY-Φ-X<sub>3-5</sub>-GXM<sub>2-3</sub>, donde X es cualquier residuo y Φ es un residuo hidrofóbico donde cada repetida comprende un lazo tipo “β hairpin” simétrico seguida de un loop y una región desordenada (Hermoso *et al.* 2005). La región de transición de LevC conserva el segmento de repetición YY-Φ-X de los motivos CW y a diferencia de PCE, estos motivos no se encuentran en forma consecutiva. La región de transición modelada por el servidor (en color violeta en la Fig. 26) está alejada del embudo catalítico de SacB y muestra poca estructura secundaria. Sólo se pueden observar dos lazos tipo β hairpin en el C-terminal similares a los que se encontraron en los módulos CW, separados de un tercer lazo tipo β hairpin por una región desordenada.



**Figura 26.** Modelo de la quimera SacBTnLevC. Residuos pertenecientes al dominio catalítico (34-473) coloreados en turquesa, residuos pertenecientes a la región de transición (474-601) coloreados en violeta.

### 10.5.2 Simulaciones moleculares del modelo de SacBTnLevC

El modelo tridimensional de SacBTnLevC por sí solo, no provee de información sobre las interacciones y/o modificaciones estructurales que provoca la adición de la región de transición al dominio catalítico de SacB. En la actualidad, los métodos para realizar simulaciones dinámicas son ampliamente utilizados para obtener información sobre el comportamiento de una proteína a lo largo del tiempo. A partir del análisis de esta información, es posible encontrar cómo evolucionan en el tiempo distintas conformaciones de una proteína, y obtener información cinética y termodinámica del sistema que no es posible obtener mediante métodos experimentales (Adcock y McCammon 2006). Con el fin contribuir a la comprensión de la función de la región de transición de LevC, se analizó el comportamiento dinámico de SacBTnLevC, a partir de una simulación de calentamiento o “simulated annealing” (SA) acoplada a dinámica molecular (DM). Para fines comparativos, se realizó también una simulación de SacB en complejo con sacarosa.

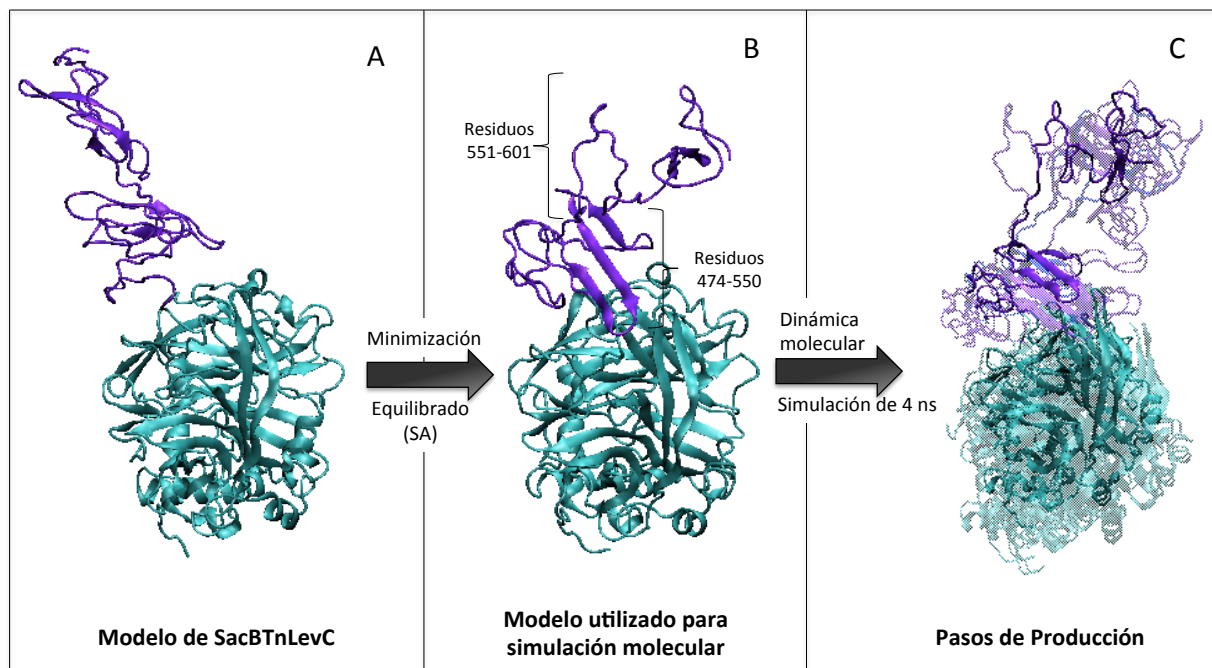
A partir del SA fue posible refinar el modelo de SacBTnLevC inicial. Al analizar la estructura al final de este proceso, se observó que los residuos 474-550 presentan una estructura de hoja  $\beta$  de tres hebras más definida, las cuales se acercaron al dominio catalítico de SacB (Fig 27).

Al analizar por separado el dominio catalítico y la región de transición, el RMSD fue de 1.4 Å y 11.2 Å, respectivamente. Esto indica que la región de transición sufrió más cambios durante estos pasos, mismos que se vieron reflejadas en el refinamiento de la estructura de los residuos 474-500 (Fig. 27A y B).

A partir de los pasos de producción de la DM, se analizó el comportamiento molecular del modelo de SacBTnLevC durante la simulación (Fig. 27C). Al analizar por separado, el dominio catalítico y la región de transición de la quimera, se encontró que las mayores fluctuaciones se encuentran en la región de transición (Fig. 28A). La región de transición presenta una gran



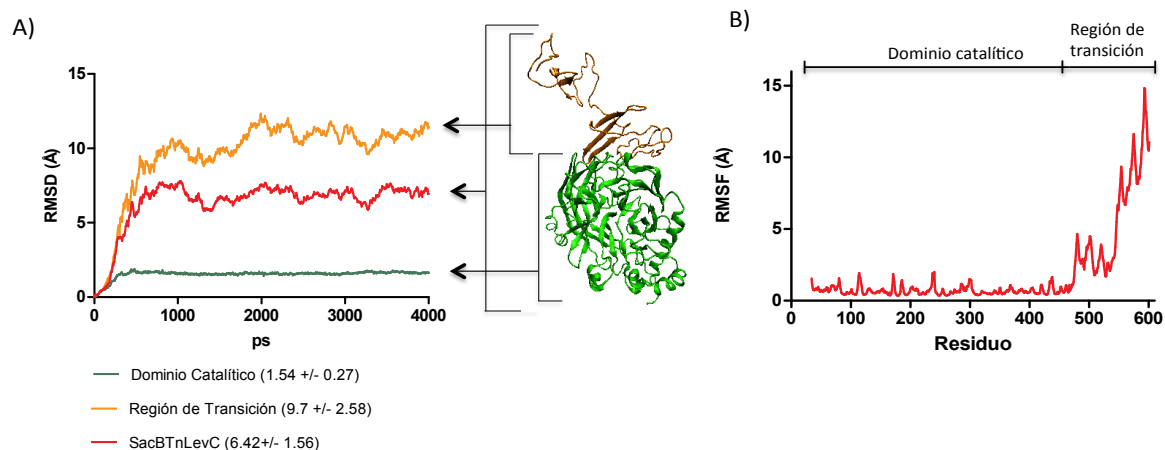
movilidad con un RMSD promedio de 9.7 Å, a diferencia del dominio catalítico cuyo RMSD es de 1.54 Å.



**Figura 27.** Esquema de los resultados obtenidos con la simulación molecular del modelo de SacBTnLevC. A) Modelo inicial de SacBTnLevC. B) Modelo de SacBTnLevC después de la minimización y los pasos calentamiento simulado o “simulated annealing” (SA). C) Representación de la movilidad del modelo de SacBTnLevC a lo largo de la simulación. Dominio catalítico de SacB en turquesa, en violeta la región de transición de LevC.

A diferencia del RMSD, que es una medida de las fluctuaciones de todos los átomos en conjunto a lo largo de la simulación molecular, la fluctuación media cuadrática (RMSF) es un parámetro que permite identificar cuáles residuos son los que presentaron mayores fluctuaciones en la proteína. En la Fig. 28B se muestra el RMSF de la cadena principal de SacBTnLevC. Se puede observar que los residuos que pertenecen a la región de transición (474-601) son los que presentan mayor movilidad. Este resultado coincide con los cálculos de

RMSD, donde se observó que la mayor fluctuación se encuentra en esta región, en particular en los residuos 551-601. Dichos residuos se encuentran alejados del dominio catalítico, por lo que no fue posible asociarlos a alguna modificación particular al mismo.

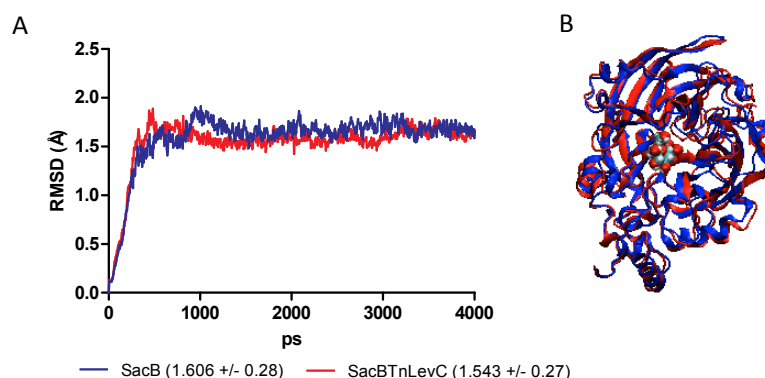


**Figura 28.** A) RMSD de SacBTnLevC (rojo), y por separado dominio catalítico (naranja) y región de transición (verde) de SacBTnLevC. RMSF de la cadena principal de la quimera SacBTnLevC. B) RMSF de SacBTnLevC. El dominio catalítico abarca del residuo 34 al 473 y la región de transición del residuo 474 a 601.

Sin embargo, es probable que la región de transición de SacBTnLevC sea una zona flexible. A la fecha, se ha resuelto la estructura cristalográfica de dos versiones truncadas de GTFs multidominio de *L. reuteri* (PDB: 3KLLK y 3TTQ), las cuales se encontraron en dos estados conformacionales distintos. A partir del análisis de estas estructuras fue posible determinar que el dominio V consiste en repetidas estructurales con homología a los módulos de unión a colina de LytA de *S. Pneumoniae*. Se determinó que estas repetidas muestran flexibilidad intrínseca, ya que fueron encontradas en diferentes posiciones en las dos formas cristalográficas y presentaron altos factores B ( $\langle B \rangle = 28-32$ ) (Vujičić-Žagar *et al.* 2010; Brison *et al.* 2012). En SacBTnLevC, esta flexibilidad podría estar relacionada con la mejor capacidad de la quimera

para producir polímero de alto peso molecular, afectando el mecanismo de síntesis y procesividad del mismo. Sin embargo, resulta necesario contar con evidencia experimental que soporte el modelo de SacBTnLevC, así como esclarecer cómo es el mecanismo de transfructosilación de las LSs. Hasta la fecha, aún no se ha logrado describir cuáles son los elementos moleculares que describen de forma detallada cómo se lleva a cabo la elongación de la cadena.

Con el fin de determinar si la fusión de la región de transición a SacB provoca un cambio estructural en el dominio catalítico, se analizó el comportamiento de los residuos que pertenecen a este dominio tanto en SacB como en la quimera. (Figs. 29 y 30). Al comparar el RMSD de los dominios catalíticos de SacB y de la quimera, se encontró que la variación de 1.54 Å de SacBTnLevC es muy similar a la variación en SacB, de 1.61 Å (Fig. 29).

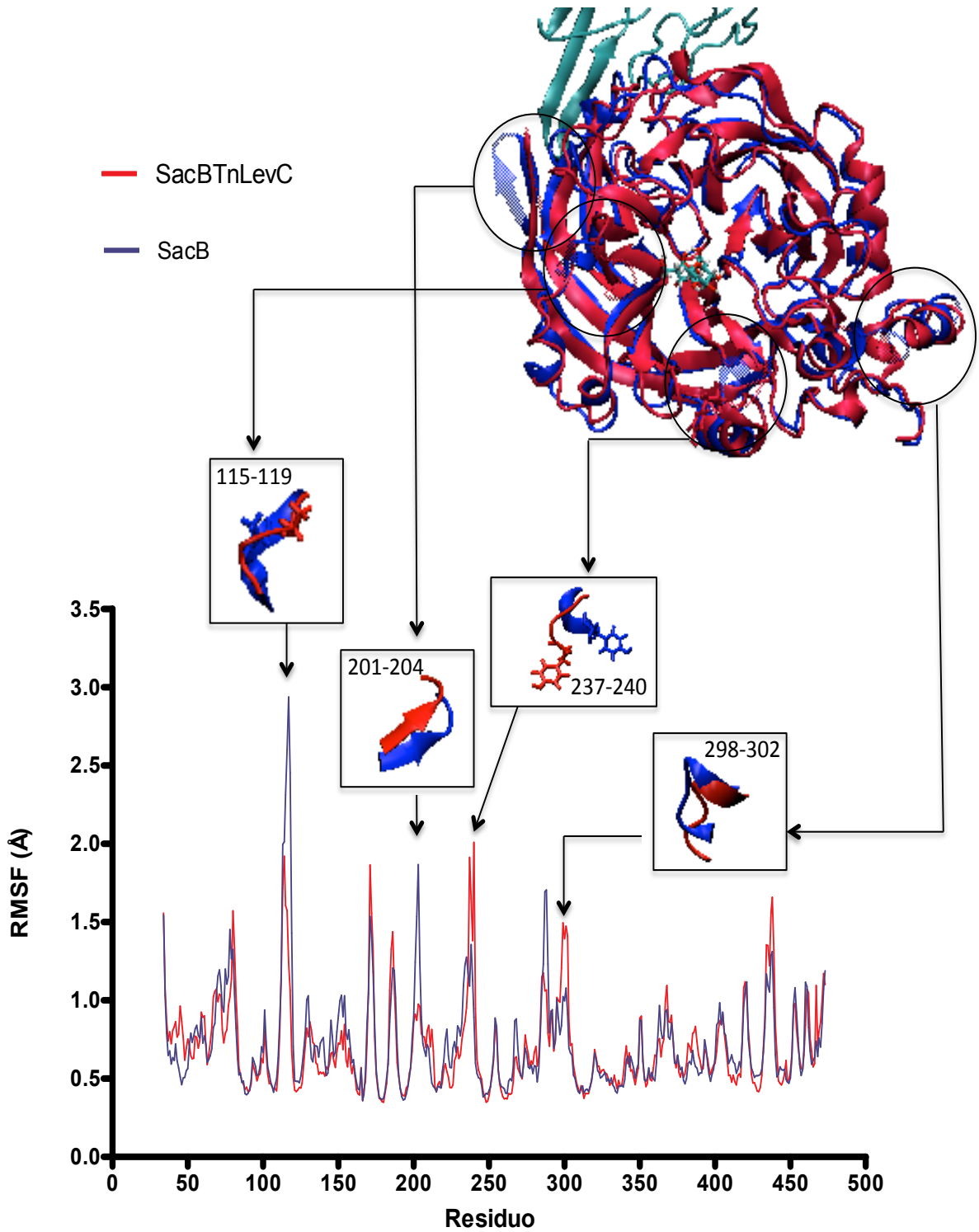


**Figura 29.** A) RMSD de los dominios catalíticos de SacB (azul) y SacBTnLevC (rojo). B) Superposición de los dominios de SacB y SacBTnLevC en referencia al RMSD calculado para cada uno de ellos.

Interesantemente, a pesar de que el RMSD del dominio catalítico de SacBTnLevC no arroja luz sobre alguna diferencia estructural durante la simulación molecular, al comparar el RMSF de la

cadena principal de los residuos en el dominio catalítico de SacB y de SacBTnLevC, se encontró que existen diferencias en la movilidad de algunos residuos (Fig. 30). En SacB, los residuos 115-119 tienen un RMSF de alrededor de 2 Å, los residuos 201-204 de aprox. 1.5 Å y 287-288 de 1.7 Å, mientras que en SacBTnLevC los residuos 237-240 y 298-302 presentan un RMSF de aprox. 1.5 Å, dos veces más alto que el promedio (0.5 Å). Cabe mencionar que ninguna de las modificaciones en las fluctuaciones observadas en las dos enzimas mostraron un comportamiento distinto en los residuos R433, R360 o Y429, que pudieran dar evidencia sobre el papel que juegan estos aminoácidos en el mecanismo de elongación, y por ende, cómo se vieron afectadas las mutantes al momento de adicionar la región de transición. Sería interesante entonces, modelar *in silico* las mutantes estudiadas en este trabajo y llevar a cabo simulaciones moleculares similares.

Al analizar las estructuras de las dos proteínas (Fig. 30), fue posible observar que los residuos 201-204, 287 y 288 en SacB se encuentran orientados hacia el solvente, lo que les da mayor movilidad. En SacBTnLevC es probable que la movilidad de estos residuos se vea restringida, ya que se encuentran de cara a la región de transición. Por otro lado, los aminoácidos 115-119 se encuentran en un asa o "loop" que conecta las láminas  $\beta$ 1B y  $\beta$ 1C, destacando la posición de Ala 116 que forma parte del subsitio +2 (Meng y Fütterer 2008) y que en la quimera se encuentra en un estado más relajado que en SacB. Tyr 237, junto con Ala 116 y Asn 242, forma parte del subsitio +2 y establece un enlace de hidrógeno mediado por agua con el hidroxilo del C'6 del residuo galactosilo en la estructura en complejo con rafinosa (Meng y Fütterer, 2008). Lys 302, a pesar de que no se conoce el papel que juega en la unión de la molécula aceptora, al mutarse por Ala en la LS de *B. megaterium*, reduce 3 veces la *k*<sub>cat</sub> aunque la tasa de H/T se mantiene similar a la de la enzima silvestre (Strube *et al.* 2011).



**Figura 30.** RMSF de los dominios catalíticos de SacBTnLevC (rojo), SacB (azul); región de transición (turquesa). Se muestra además un esquema de las zonas en donde se destacan las fluctuaciones más importantes en ambas proteínas.

Las diferencias que se encontraron en la fluctuación de los residuos del dominio de SacB y de SacBTnLevC descritas anteriormente, soportan la hipótesis de que la adición de la región de transición a la LS SacB provoca modificaciones estructurales en el dominio catalítico que dan lugar a una mayor capacidad para la transfructosilación.

Dichas modificaciones no afectan el comportamiento molecular de los aminoácidos que forman parte del subsitio -1 o +1 e interactúan con el sustrato donador. Esta observación coincide con los resultados obtenidos con R360STn y Y429NTn, cuyas mutaciones se encuentran localizadas en los subsitios -1 y +1, y la adición de la región de transición no tuvo ningún efecto sobre la tasa de H/T ni la especificidad de productos. Las modificaciones estructurales ocurren en los subsitios +2, en adelante, implicados en la unión de la molécula aceptora. Sin embargo aún se requiere de mayor evidencia para asociar estos cambios con los resultados experimentales observados con la quimera de SacBTnLevC y con R433ATn, ya que aún no ha sido posible establecer una hipótesis sobre la “reversión de la capacidad para producir polímero” que ocurrió con esta quimera. Así mismo, resulta necesario obtener información estructural que permita identificar los subsitios implicados en el acomodo de las moléculasceptoras (subsitios +3 en adelante) que permiten establecer una hipótesis sobre cómo se lleva a cabo la elongación de la cadena levana.

Por otro lado, las interacciones proteína-carbohidrato son muy dinámicas y la afinidad de la proteína por el ligando es producto de la sumatoria de varias interacciones relativamente débiles. Estas interacciones son el resultado de un balance de interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre la proteína, el solvente y el carbohidrato que resultan en cambios significativos en la entalpía y entropía del complejo (Fada y Woods 2010). Con el análisis de los resultados obtenidos en la simulación molecular, se encontró que la energía de van der Waals de la sacarosa con respecto a la proteína no varía de forma significativa en SacBTnLevC, en comparación con SacB (Tabla 13).

De forma similar, al analizar los enlaces de hidrógeno que mantiene la sacarosa dentro de la cavidad catalítica (residuos y moléculas de agua), en general, no difieren en las dos proteínas de forma significativa. Por otro lado, la energía electrostática del sustrato dentro de la cavidad catalítica de la quimera es mayor (-49.8 kcal/mol) que la de la enzima silvestre (-78.1 kcal/mol). Esta diferencia en la energía electrostática sugiere una menor afinidad del ligando dentro de la cavidad catalítica en SacBTnLevC. Este resultado concuerda con los experimentos *in vitro* realizados por Olvera- Carranza *et al.* 2012, donde se determinó que la  $K_m$  de transferencia es 2.5 veces mayor que SacB. Sin embargo, para poder explicar de forma detallada estas observaciones, sería necesario estudiar la contribución energética de cada residuo de la proteína a la energía libre del sistema.

**Tabla 13. Energías no enlazantes en el sistema SacB-Sacarosa y SacBTnLevC-Sacarosa**

Enzima	Enlace de Hidrógeno	$E_{vdw}$ (kcal/mol)	$E_{electrostática}$ (kcal/mol)
SacB	$7 \pm 3$	$-16 \pm 4$	$-78 \pm 10$
SacBTnLevC	$6 \pm 2$	$-22 \pm 4$	$-50 \pm 9$

Finalmente, al integrar estas observaciones con los resultados experimentales descritos anteriormente, podría sugerirse que la menor estabilidad de la sacarosa dentro de la cavidad catalítica provoca una liberación más rápida de la misma, permitiendo a su vez, que la molécula aceptora se acomode con mayor velocidad.

## 11. CONCLUSIONES

A partir de la estrategia de fusión de la región de transición de LevC a mutantes de SacB se logró mejorar la eficiencia de transfructosilación de R433ATn. Sin embargo, esta estrategia no puede ser generalizada a otras mutantes de SacB, ya que al incorporar la región de transición a R360S y Y429N no se observó una modificación en su capacidad para la transfructosilación ni en su perfil de productos, es probable que esto deba a que al modificar estos aminoácidos, se afectó el correcto posicionamiento de la sacarosa en el sitio activo (subsitos -1 y +1).

Se encontró que la región de transición juega un papel importante en la elongación la cadena de fructanas de AMM ya que, tanto SacBTnLevC como R433ATn sólo sintetizan polímero de AMM. En el caso de R433ATn, en particular, la construcción de la quimera dio lugar a una “reversión de la capacidad para producir polímero”, misma que se había perdido en la mutante R433A.

Fue posible refinar el modelo de SacBtNLevC generado por i-tasser a partir de pasos de minimización y una simulación de calentamiento. Además, los resultados de la simulación molecular de SacBTnLevC sugieren que la región de transición es una zona flexible, ya que presenta una gran fluctuación en sus aminoácidos y poca estructura secundaria. Sin embargo, a pesar de que esta flexibilidad fue encontrada en GTFs multidomino con elementos de repetición similares, aún no es posible asociar esta flexibilidad a alguna función en particular.

Al integrar los resultados experimentales realizados durante este trabajo con el análisis de la simulación molecular fue posible proponer que, de acuerdo a la hipótesis de este trabajo, la adición de la región de transición a SacB provoca modificaciones estructurales en residuos que



## CONCLUSIONES

---

forman parte del subsitio +2, el cual está involucrado en la unión de la molécula aceptora. Además, en SacBTnLevC, el ambiente electrostático de la proteína se ve modificado cuando se encuentra unida al ligando haciéndolo más inestable, esto podría sugerir que la menor estabilidad de la sacarosa dentro de la cavidad catalítica provoca una liberación más rápida de la misma, permitiendo a su vez, que la molécula aceptora se acomode con mayor velocidad.

## 12. PERSPECTIVAS

Evaluar si es posible obtener mediante cristalografía o Resonancia Magnética Nuclear de proteínas la estructura la quimera SacBTnLevC.

Realizar ensayos con SacB, y de ser posible con la quimera SacBTnLevC utilizando distintos aceptores que permitan proponer un modelo mecanístico de la elongación del polímero.

Evaluar el efecto de distintas condiciones de temperatura, concentración de enzima y concentración de sustrato en la síntesis de polímero de SacBTnLevC y R433ATn.

Completar la caracterización de su perfil de productos con técnicas que permitan identificar la naturaleza de los FOS que sintetizan y construir modelos de las mutantes de SacB para analizar su comportamiento a partir de simulaciones moleculares, con el fin de identificar las modificaciones estructurales que dieron lugar a los resultados obtenidos con las quimeras de las mutantes de SacB.

## 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Ambrish R, Kucukural A y Zhang J. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*. 2010; doi:10.1038.
2. Anwar MA, Kralj S, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L. The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. *Appl Environ Microbiol*. 2008. 74(11):3426-33.
3. Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, Henrissat B, Czjzek M. The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *J Biol Chem*. 2004. 279(18):18903-10.
4. Bashton M, Chothia C. The generation of new protein functions by the combination of domains. *Structure*. 2007. 15(1):85-99.
5. Bonnett GD, Sims IM, St. John JA, Simpson RJ. Purification and characterization of fructans with  $\beta$ -2,1- and  $\beta$ - 2,6-glycosidic linkages suitable for enzyme studies. *New Phytologist* 1994. 127: 261-267.
6. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976. 72:248-254.
7. Braun L., Dramsi S., Dehoux P., Bierre H. Lindahl G. and Cossart P. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Molecular Microbiology*. 1997. 25(2):285-294.
8. Brison Y., Pijning T., Malbert Y., Fabre E., Mourey L., Morel S., Potocki-Véronèse G., Monsan P., Tranier S., Remaud-Siméon M., y Dijkstra B.W. Functional and Structural Characterization of  $\alpha$ -(1-2) Branching Sucrase Derived from DSR-E Glucansucrase. *J. Biological Chemistry* 2010 287: 7915-7924.
9. Carpita NC, Kanabus J, Housley TL. Linkage structure of fructans and fructan oligomers from *Triticum aestivum* and *Festuca arundinaceae* leaves. *J Plant Physiol* 1989 **134**: 162–16.
10. Castillo E. and López-Munguía A. Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. *Journal of Biotechnology*. 2004. 114:209-217.
11. Chambert R. and Gonzy-Treboul G. Characterization of a Stabilized Fructosyl-enzyme Complex and Identification of an Aspartyl Residue as the Binding Site of the Fructosyl Group. *Eur. J. Biochem*. 1976. 71: 493-508
12. Chambert R. and Gonzy-Treboul G. Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Kinetic and Thermodynamic Aspects of Transfructosylation Processes. *Eur. J. Biochem*. 1976. 62:55-64
13. Chambert R., Gonzy-Tréboul G. and Dedonder R. Kinetics studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem*. 1974. 41:285-300.
14. Chambert R. and Petit-Glatron M. Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increase its polymerase activity. *Carbohydrate Research*. 1993. 244:129-136.
15. Chambert R. and Petit-Glatron M. Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal*. 1991. 279. 35-41.

## BIBLIOGRAFÍA

---

16. Chambert R., Rain-Guion M. Ch. and Petit-Glatron M.F. Readthrough of the *Bacillus subtilis* stop codon produces an extended enzyme displaying a higher polymerase activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992. 1132:145-153
17. Chiang CJ, Wang JY, Chen PT, Chao YP. Enhanced levan production using chitin-binding domain fused levansucrase immobilized on chitin beads. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009. 82(3): 445-51.
18. Davies G, Henrissat B, Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 1995 3:853-859.
19. Davies G., Wilson K. and Henrissat B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal Letters*. 1997. 321:557-559.
20. Del Moral-Ventura S.T., Olvera-Carranza C., Pérez-Morales R., Rodríguez-Alegría M.E. and López-Munguía A. Functional role of the additional domains of inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28. *BMC Biochemistry*. 2008. 9:6
21. Dedonder, R. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology*. 1966. 8: 500-506.
22. Desmond Molecular Dynamics System, version 2.4, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2010. Maestro-Desmond Interoperability Tools, version 2.4, Schrödinger, New York, NY, 2010.
23. Duboc P., Mollet Beat. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 2001. 11:759-768.
24. Duchateau N, Bortlik K, Simmen U, Wiemken A, Bancal P. Sucrose:Fructan 6-Fructosyltransferase, a Key Enzyme for Diverting Carbon from Sucrose to Fructan in Barley Leaves. *Plant Physiol*. 1995 107(4):1249-1255.
25. Fada Elisa y Woods Robert J. Molecular simulations of carbohydrates and protein-carbohydrate interactions: motivation, issues and prospects. *Drug Discovery Today*. 2010. 15:596- 609.
26. Euzenat O., Guibert A. and Combes D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*. 1997. 32(3):237-243.
27. Fernández-Torneo C., López R., García E., Giménez-Gallego G., Romero A. A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nature letters*. 2001. 8(12):1020-1024.
28. Goyal K., Kim B.J., Kim J.D., Kim Y-K, Kitaoka M. and Hayashi K. Enhancement of transglycosylation activity by construction of chimeras between mesophilic and thermophilic  $\beta$ -glucosidase. *Arch. Biochem. Bioph*. 2002. 407:125-134.
29. Guan L, Hu Y, Kaback HR. Aromatic stacking in the sugar binding site of the lactose permease. *Biochemistry*. 2003. 42(6):1377-82.
30. Han Jung-Hoon, Batey S., Nickson A., Teichman S., Clarke J. The folding and evolution of multidomain proteins. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 2007. 8:319-330.
31. Han Y.W. *Advances in Applied Microbiology: Microbial Levan*. 1990. 35:171-194
32. Hendry G. y RK W. The origin, distribution, and evolutionary and significance of fructans. *Science, and Technology of fructans*. 1993 pp 119-139.
33. Hermoso J., Lagartera L., Gonzalez A., Stelter M., García P., Martínez-Ripoll M., García L. José y Menendez M. Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nature structural and biology*. 2005. 12: 533-538.

## BIBLIOGRAFÍA

---

34. Hernández L., Arrieta J., Menendez C., Vazquez R., Coego A., Suarez V., Selman G., Petit-Glatron M. and Chambert R. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* 1995. 309: 113-118.
35. Homann A., Biedendieck R., Götze S., Jahn D. and Seibel J. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochemical Journal.* 2007. 407:189-198.
36. Jaques N.A. Calcium dependence of the cell associated fucosyltransferases of *Streptococcus salivarius*. *Carbohydr. Res.* 1984. 127:349-355.
37. Jang K-H., Song K.-B., Park B.-S., Kim CH., Chung B., Choue R., Lee K.S., Lee Ch., Chum U., Rhee S. Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite. *Process Biochemistry.* 2001. 37: 339-343
38. Jang K-H., Song K.-B., Kim CH., Chung B., Kang S., Chun U., Choue R. and Rhee S. Comparison of characteristics of levan produced by different preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters.* 2001. 23:339-344
39. Jonquière R., Bierne H., Fiedler F., Gounon P. and Cossart P. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology.* 1999. 34(5):902-914
40. Joucla G., Pizzut S., Monsan P., Remaud-Simeon M. Construction of a fully active truncated alternansucrase partially deleted of its carboxy-terminal domain. *FEBS Letters.* 2006. 580:763-768.
41. Kang, T.H., Jung, S.J., Kang, S.A., Jang, K.H., Jang, E.K., Kim, S.H., Kim, I.H., Kim, C.H., Rhee, S.K. and Chun, U.H. (2002b). Preparation of levan oligosaccharides by acid hydrolysis and its application in growth of lactic acid-producing bacteria. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 17, 137-141.
42. Kim HY, Choi YJ. Molecular characterization of cyclodextrin oligosaccharide fructanotransferase from *Bacillus macerans*. *Appl Environ Microbiol.* 2001. 67(2):995-1000.
43. Kim K.H., Chung C.B., Kim Y.H., Kim K.S., Han C.S. and Kim C.H. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J. Cosmet. Sci.* 2005. 56(6):395-406
44. Kim KY, Rhee S, Kim SI. Role of the N-terminal domain of endoinulinase from *Arthrobacter* sp. S37 in regulation of enzyme catalysis. *J Biochem.* 2005. 138(1):27-33
45. Koops A. J. y Jonker, H. H. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia 2. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferases and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyltransferase. 1996 *Plant Physiology.* 110: 1167-1175
46. Lively, R. Polysaccharides antigens as vaccines against bacterial pathogens. *Biomedical and Biotechnological advances in industrial polysaccharides.* Gordon and Breach Science Publishers. 1988. 133-143.
47. Lin S.Y., Chen M., Li G., Yan Y.L., Yu H.Y., Zhan Y.H., Peng Z.X., Wang J. and Lin M. Amino acid substitution of His296 alter the catalytic properties of *Zymomonas mobilis* 10232 levansucrase. *Acta Biochimica Polonica.* 2008. 55(1):201-206.
48. Livingston and Henson Apoplasticsugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winteroat: responses to secondphase cold hardening 1998 *Plant Physiol.* 116 pp. 403-408

## BIBLIOGRAFÍA

---

49. Mamo G, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. Fusion of carbohydrate binding modules from *Thermotoga neapolitana* with a family 10 xylanase from *Bacillus halodurans* S7. *Extremophiles*. 2007. 11(1):169-77.
50. Martínez-Fleites C; Ortiz-Lombardia T., Pons, N., Tarbouriech E.J., Taylor J., Arrieta L., Hernández and Davies G.J. Crystal structure of levansucrase from the gram-negative bacterium *Gluconeobacter diazotrophicus*. *Biochem. J*. 2005. 390:19-27.
51. Marx, S. P., Winkler, S, and Hartmeier, W. (2000). Metabolization of  $\beta$ -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 163–169.
52. Meng G. and Fütterer K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat. Struct. Biol.* 2003. 11:935-941.
53. Meng G. and Fütterer K. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Structural Biology*. Marzo 2008. 8 :16
54. Mesnage S., Tosi-Couture E. and Fouet A. Production and cell surface anchoring of functional fusions between the SLH motifs of the *Bacillus anthracis* S-layer proteins and the *Bacillus subtilis* levansucrase. 1999. *Mol. Micro.* 31(3):927-936.
55. Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Gilles Joucla, René-Marc Willemont, Magali Remaud-Siméon. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 2001. 11:675-685
56. Morales-Arrieta S. Rodríguez M.E. Segovia L. López-Munguía and Olvera-Carranza C. Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Gene*. 2006. 376(1):59-67
57. Navarre W.W. and Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999. 63(1):174-229.
58. Neuman D, Lehr C-M, Lenhof Hans-Peter y Kohlbacher Oliver. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004. 56: 453-457.
59. Notenboom V, Boraston AB, Kilburn DG, Rose DR. Crystal structures of the family 9 carbohydrate-binding module from *Thermotoga maritima* xylanase 10A in native and ligand-bound forms. *Biochemistry*. 2001. 40(21):6248-56.
60. Olivares-Illiana V., López-Munguía A; and Olvera C. Molecular Characterization of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a Glucosyltransferase. *J. Bacteriol*. 2003. 185:3606-3612.
61. Olivares-Illiana V., Wacher-Rodarte C., Le Borgne S. and López-Munguía A. Characterization of a cell-association inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *J. Ind. Micro. Biotech*. 2002. 28:112-117.
62. Olvera C, Centeno-Leija S, Lopez-Munguia A. Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2007. 92(1):11-20.
63. Olvera- Carranza C, Centeno-Leija S, Ruiz-Leyva P, Lopez-Munguia A. Design of chimeric Levansucrases with improved Transglycosilation Activity. *Appl. Environ. Microbiol*. 2012, 78(6):1820.

## BIBLIOGRAFÍA

---

64. Olvera-Carranza C., Fernández-Vázquez J.L., Ledezma-Candanoza L. and López-Munguía A. Role of the C-terminal region of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ in cell anchoring. *Microbiology*. 2007. 153:3994-4002.
65. M. Orozco and F. J. Luque. Theoretical methods for the description of the solvent effect in biomolecular systems. *Chem Rev.*, 101(1):4187–4226, 2001.
66. Ortiz Soto MA; Olivares Iliana and López-Munguía. Biochemical Properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 Used for Inulin Synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2004. 22 (4):275-281
67. Ortiz-Soto M., Rivera M., Rudiño-Piñera E., Olvera-Carranza C., López-Munguía A. Selected Mutations in *Bacillus subtilis* Levansucrase Semi-Conserved Regions Affecting Its Biochemical Properties. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2008. 21(10):589-595
68. Ozimek K., G.J.W. Euverink, M.J.E.C. van der Maarel, L. Dijkhuizen 2005. Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Letters*. 2005. 579:1124-1128.
69. Ozimek K. Kralj S., van der Maarel and Dijkhuizen. The levansucrase and inulosucrase enzyme of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reaction. *Microbiology*. 2006. 152:1187-1196.
70. Perutz, M. F. Electrostatic effects in proteins. *Science*, 201(4362):1187–1191, 1978.
71. Pollock C.J. y Cairns a. J. Fructan metabolism in grasses and cereals *Ann Rev Plant Physiol*, 1991, pp. 77–101.
72. Pons T., Naumoff D., Martínez-Fleites C. and Hernández L. Three acidic residues are at the active site of a  $\beta$ -propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62, and 68. *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2004. 54:424-432.
73. Rathsam C. and Jacques N.A. Role of C-terminal Domains in Surface Attachment of the Fructosyltransferases of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Journal of Bacteriology*. 1998. 180(23): 6400-6403.
74. Roberfroid, M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr*. 2000. 71:1682S-1687S.
75. Rozen, R; Bachrach, G; Bronshteyn, M; Gedalia, I; Steinberg, D. The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2001. 195:205-210.
76. Shiomi N (1989) Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in Liliaceous plants. *J Plant Physiol* **134**: 151–155.
77. Shiroza, T. and Karamitsu. Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions. *J. Bacteriology*. 1988. 170: 810-816.
78. Singh A. and Hayashi K. Construction of chimeric  $\beta$ -glucosidases with improved enzymatic properties. *J Biol Chem*. 1995. 270(37):21928-33.
79. Song D. D. and Jaques N. A. Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem. J*. 1999. 341:285-291.
80. Strube P. Christian, Hommann Anne, Gamer Martin, Diener Jahn, Seibel Jürgen, and Heinz Dirk W. Polysaccharide synthesis of the levansucrase of SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *The Journal of biological chemistry*. 2011. 286: 17593-600.

## BIBLIOGRAFÍA

---

81. Tanaka T., Yamamoto S., Oi S., Yamamoto T. Structures of heterooligosaccharides synthesized by levansucrase. *J. Biochem.* 1981. 90(2):521-526.
82. Tanaka T, Oi S, Yamamoto T. Synthesis of levan by levansucrase. Some factors affecting the rate of synthesis and degree of polymerization of levan. *J Biochem.* 1979. 85(1): 287-93.
83. Tieking M., Ehrmann M.A., Vogel R.F. and Gänzle M.G. Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005. 66:655-663.
84. Van Geel-Schutten, G. H., Faber, E. J; Smit, E; Bonting, K; Smith, M.R; Ten Brink, B; Kamerling, J. P; Vliegthart, J. F. G; y Dijkhuizen, L. Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Applied and Environmental Microbiology.* 1999. 65:3008-3014.
85. Van Hijum., Van Geel-Schutten,G.H., Rahaoui,H., Van Der Maarel,M.J.E.C. and Dijkhuizen,L. Characterization of a Novel Fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that Synthesizes High-Molecular-Weight Inulin and Inulin Oligosaccharides *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. 68:4390-4398
86. Van Hijum,S.A., Szalowska,E., van der Maarel,M.J. and Dijkhuizen,L. Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology.* 2004. 150:621-630
87. Vijn I. and Smeekens S. Fructan: More than a reserve carbohydrate?. *Plant Physiology.* 1999. 120: 351-359.
88. Vogel C., Bashton M., Kerrison N. D., Chotia C., Teichmann S. A. Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Current Opinion in Structural Biology.* 2004. 14:208-216.
89. Vujčić-Žagar M., Pijning T., Kralj S., López C.A., Eeuwema W., Dijkhuizen L., y Dijkstra B.W. Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes *PNAS* 2012 107: 21406:21411.
90. Wada, T; Ohguchi, M. y Iwai, Y. A novel enzyme of *Bacillus sp.* 217C-11 that produces Inulin from sucrose. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003. 67:1327-1334.
91. Waldherr F., Meissner D., Vogel R. Genetic and functional characterization of *Lactobacillus panis* levansucrase. *Arch. Microbiol.* 2008. 190(4):497:505.
92. Wang J.H., Tsai M.T., Lee G. C. and Shaw J.F. Construction of a Recombinant Thermostable  $\beta$ -Amylase-Trehalose Synthase Bifunctional Enzyme for Facilitating The Conversion of Starch to Trehalose. *J. Agric. Food Chem.* 2007. 55:1256-1263
93. Wang JH, Tsai MY, Chen JJ, Lee GC, Shaw JF. Role of the C-terminal domain of *Thermus thermophilus* trehalose synthase in the thermophilicity, thermostability, and efficient production of trehalose. *J Agric Food Chem.* 2007. 55(9):3435-43.
94. Yamamoto Y, Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S, Yamaguchi. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J Nutr Biochem.* 1999. 10:13-8.
95. Yanase H., Maeda M., Hagiwara E., Yagi H., Taniguchi K. and Okamoto K. Identification of functionally important amino acid residues in *Zymomonas mobilis* levansucrase. *J Biochem.* 2002. 132(4):565-572.
96. Zhang J, Liang Y y Zhang Y. Atomic-Level Protein Structure Refinement Using Fragment-Guided Molecular Dynamics Conformation Sampling. *Structure*, vol 19, 1784-1795 (2011).



## BIBLIOGRAFÍA

---

97. Zhao. Y., Blumer S. E., and Sundin G. W. Identification of *Erwinia amylovora* Genes Induced during Infection of Immature Pear Tissue. *Journal of Bacteriology*. 2005. 8088–8103

### **Programas:**

1. Desmond Molecular Dynamics System, version 3.1, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2012.  
Maestro-Desmond Interoperability Tools, version 3.1, Schrödinger, New York, NY, 2012.
2. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J. Molec. Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 33-38.
3. Maestro, version 9.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.