



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“ESTUDIOS DEL MECANISMO DE ELONGACIÓN DE LEVANAS DE
SacB DE *Bacillus subtilis*”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
I.Q. Enrique Raga Carbajal

TUTOR PRINCIPAL:
Dra. Clarita Olvera Carranza (IBT-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dra. Liliana Pardo López (IBT-UNAM)
Dr. Gabriel del Río Guerra (IFC-UNAM)

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

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

ÍNDICE

ÍNDICE	i
TABLA DE FIGURAS	iii
INTRODUCCIÓN.....	1
I. GENERALIDADES	3
1.1 Las fructanas.....	3
1.1.1 Propiedades y aplicaciones.....	4
1.2 Fructosiltransferasas	5
1.2.1 Estructura Tridimensional	6
1.2.2 Mecanismo de reacción	7
1.2.3 Arquitectura del sitio catalítico	8
1.3 Síntesis de polímero vs fructo-oligosacáridos.....	9
1.3.1 Efecto de las condiciones de reacción.....	11
1.3.1.1 Fuerza iónica y disolvente	11
1.3.1.2 Concentración de sustrato y temperatura.....	12
1.3.1.3 Incorporación de levana al medio de reacción.....	12
II. OBJETIVOS	14
2.1 Hipótesis.....	14
2.2 Objetivo General	14
2.3 Objetivos Particulares.....	14
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 Producción de SacB.....	16
4.1.1 Expresión heteróloga de SacB en E. coli.	16
4.1.2 Expresión heteróloga de la mutante nula E342A en E. coli.....	16
4.1.3 Purificación de enzimas.....	16
4.2 Análisis de proteína	16
4.2.1 Cuantificación de proteína.....	16
4.2.2 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).....	17
4.3 Ensayo estándar de actividad enzimática	17
4.4 Estudio del efecto de las condiciones de reacción en el grado de polimerización de productos de SacB	17
4.5 Identificación y análisis de productos.	18
4.5.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	18
4.5.2 Cromatografía de permeación en gel (GPC).....	18
4.5.3 Cromatografía de capa fina (TLC).....	18
4.5.4 Cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia con detección de pulso amperométrico (HPAE-PAD).....	18
4.6 Producción de fructooligosacáridos	19
4.6.1 Producción y purificación de levana	19

4.6.2 Hidrólisis de levana	19
4.7 Análisis de aglomeración de SacB	19
4.7.1 Dispersión dinámica de Luz (DLS).....	19
4.7.2 Resonancia magnética nuclear (RMN).....	20
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1 Las condiciones de reacción y su efecto sobre la especificidad de SacB.....	21
5.1.1 Modificación de la especificidad de reacción: relación Hidrólisis- Transferencia	22
5.1.2 La concentración de enzima y su efecto modulador del perfil de productos sintetizados por SacB	23
5.1.2.1 Concentración de enzima: ¿efecto cinético o estructural?.....	26
5.1.3 El incremento de la concentración de sustrato y la elongación no procesiva de LevanB.....	29
5.1.4 La disminución de la temperatura y su efecto sobre la relación H/T	30
5.1.5 ¿SacB forma conglomerados enzimáticos?	32
5.1.5.1 Ensayos de dispersión de luz	33
5.1.5.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)	34
5.2 Síntesis de LevanA y LevanB por SacB: dos procesos separados	35
5.2.1 Búsqueda de intermediarios en la síntesis de LevanA	36
5.3 Moléculasceptoras inherentes a la reacción de SacB y su papel en el mecanismo de elongación.....	39
5.3.1 Producción de posibles moléculasceptoras: FOS, hidrolizado de levana..	39
5.3.2 Incorporación de FOS en el medio de reacción	41
CONCLUSIONES	45
PERSPECTIVAS	47
BIBLIOGRAFÍA	48

TABLA DE FIGURAS

Fig. 1	Estructuras de las fructanas tipo levana e inulina no ramificadas.....	3
Fig. 2	Representación esquemática de las reacciones catalizadas por las FTFs.	6
Fig. 3	Vistas ortogonales del plegamiento β -propela.	7
Fig. 4	Representación del mecanismo de reacción.....	8
Fig. 5	Interacciones en los complejos SacB-sacarosa y SacB-rafinosa	9
Fig. 6	Esquemas de los mecanismos de elongación Procesivo y No Procesivo.	10
Fig. 7	Conversiones de reacción alcanzadas.	21
Fig. 8	Relaciones H/T a tiempos finales de las condiciones de reacción ensayadas.....	22
Fig. 9	Evolución en el perfil de levanas sintetizadas por SacB con 100 g/L, 37°C.....	24
Fig. 10	Evolución en el perfil de oligosacáridos producidos por SacB con 100 g/L de sacarosa, 37°C..	25
Fig. 11	Comparación de los perfiles en HPAE-PAD de LevanB purificada, Inulina de achicoria e Inulina de dalia.....	26
Fig. 12	Evolución en el perfil de levanas sintetizadas por 0.1 U/mL de SacB activa con 100 g/L de sacarosa a 37°C empleado distinta cantidad de proteína total.	27
Fig. 13	Evolución en el perfil de levanas sintetizadas por 0.55 μ g/mL (0.1 U/mL) de SacB con la adición de Albúmina y E342A hasta 55 μ g/mL de proteína total.	28
Fig. 14	Evolución en el perfil de levanas sintetizadas por 5.5 μ g/mL (1 U/mL) de SacB con con la adición de Albúmina y E342A hasta 55 5 μ g/mL de proteína total.	28
Fig. 15	Evolución en el perfil de levana sintetizada por SacB con 400 g/L de sacarosa, 37°C.....	29
Fig. 16	Evolución en el perfil de oligosacáridos producidos por SacB con 400 g/L de sacarosa, 37°C.	30
Fig. 17	Evolución en el perfil de levana sintetizada por SacB con 100 g/L de sacarosa, 25°C.....	31
Fig. 18	Evolución en el perfil de levana sintetizada por SacB con 400 g/L de sacarosa, 25°C.....	31
Fig. 19	Perfil de oligosacáridos producidos por SacB a 25°C	32
Fig. 20	Distribuciones de tamaño por volumen registradas en DSL.....	34
Fig. 21	Espectro HSQC de SacB (54 kDa) marcada con 15 N.	35
Fig. 22	GPC de las fracciones obtenidas por precipitación con etanol de las levanas sintetizadas por SacB.....	37
Fig. 23	Perfiles de GPC de la síntesis de LevanA y su posterior concentración.....	38
Fig. 24	Perfil de HPAEC-PAD de LevanA y LevanB.	38
Fig. 25	Análisis en TLC de la evolución en la hidrólisis de LevanB catalizada por LevB de <i>B. licheniformis</i>	40

Fig. 26 Perfil cromatográfico de los FOS producto de la hidrólisis de LevanB y su comparación con estándares.....	40
Fig. 27 Evolución del perfil de levanas sintetizadas en la reacción de SacB con 100 g/L de sacarosa.	41
Fig. 28 Comparación de los perfiles de levanas sintetizados con saturación inicial de FOS a tiempos finales de reacción	42
Fig. 29 Evolución del perfil de oligosacáridos sintetizados en la reacción de SacB con 100 g/L de sacarosa y adición de FOS.	43

INTRODUCCIÓN

Las fructanas son azúcares complejos derivados de la sacarosa constituidos por una molécula de glucosa y varias unidades de fructosa. Estos sacáridos han atraído el interés debido a sus características nutraceuticas, tales como la estimulación selectiva del crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos de la flora intestinal y la prevención del cáncer de colon; además de favorecer tanto la disminución del colesterol total y lípidos triacilgliceroles en el suero sanguíneo como la absorción de iones calcio y magnesio (Ritsema y Smeekens, 2003). Las fructanas son sintetizadas para reemplazar o suplementar al almidón como carbohidrato de reserva por un gran número de especies de plantas, mientras que en varios taxones bacterianos (e.g. *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Erwinia* y *Actinomyces*) se les asocia a la protección de las células contra la deshidratación y como auxiliar en los procesos de adhesión celular. La síntesis de fructanas en plantas requiere de varias enzimas con distintas especificidades de donadores y aceptores de fructosilos, en cambio, en bacterias la síntesis de fructanas es catalizada por una sola enzima, denominada fructosiltransferasa (FTF).

Las FTFs son las enzimas responsables de la síntesis de fructanas que pueden contener enlaces glicosídicos β -2,1(fructana tipo inulina) o β -2,6 (tipo levana). De aquí que las FTFs que sintetizan enlaces β -2,1 se denominan inulosacarasas (ISs) y las que generan enlaces β -2,6 levansacarasas (LSs). Más aún, estas enzimas divergen en el grado de polimerización (GP) de su producto, existiendo ISs y LSs capaces de producir polímeros con GP de hasta miles y otras que restringen sus productos a GP menores a 10, productos denominados fructo-oligosacáridos (FOS).

La base molecular que da lugar a los diferentes GP en los productos de las FTFs está definida por el mecanismo de elongación que desarrollan, sin embargo dichos mecanismo de síntesis aún permanecen esencialmente incomprendidos. Se han desarrollado diversos estudios relacionados con la especificidad de producto de LSs bacterianas, en contraste con la especificidad de las ISs cuya información es limitada. Dentro de dichos estudios, la mutación de residuos en subsitios de unión a aceptores ha permitido la modificación de la

especificidad en lo que se refiere a las relaciones hidrólisis/transferencia y FOS/polímero brindando señales sobre la posible vía de elongación de las FTFs (Kralj y col., 2008). Sin embargo, dos cuestionamientos acerca de estas enzimas, y en general de las glicosiltransferasas persisten: ¿qué factores estructurales y/o ambientales definen el peso molecular del producto (oligo- o polisacáridos) y cuál es la dinámica molecular que llevan a cabo para tales efectos?

El presente trabajo pretende contribuir a la elucidación de los mecanismos de elongación de fructanas desarrollados por las FTFs, estudiando los elementos fisicoquímicos y estructurales que afectan dichos mecanismos, teniendo como objeto de estudio la LS SacB de *B. subtilis*. De este modo, se busca obtener información esencial no solo para entender la base molecular de la acción de estas enzimas sino también para el diseño racional de biocatalizadores y/o de su medio de reacción dado el interés de productos de reacción de tamaños específicos.

I. GENERALIDADES

1.1 Las fructanas

Fructana es el término genérico empleado para referirse al compuesto cuya estructura contiene enlaces glicosídicos fructosa-fructosa. Los fructo-oligosacáridos (FOSs) son fructanas que contienen entre 2 y 10 moléculas de fructosa, mientras que una fructana, propiamente dicha, es un polisacárido con más de 10 moléculas de fructosa en la cadena. En lo que al tipo de enlace se refiere, se habla de levanas cuando las fructosas están unidas a través de enlaces β -2,6 y pueden presentar ramificaciones en conformación β -2,1. Por otro lado, las inulinas son fructanas constituidas principalmente, pero no exclusivamente, por enlaces β -2,1 (

Fig. 1). Algunas fructanas pueden poseer un grupo glucosilo inicial (tipo GF_n), mientras que otras pueden no incluirlo (tipo F_n), sin embargo, ambas especies están incluidas bajo la misma nomenclatura según el tipo de enlace presente (Roberfroid, 2007).

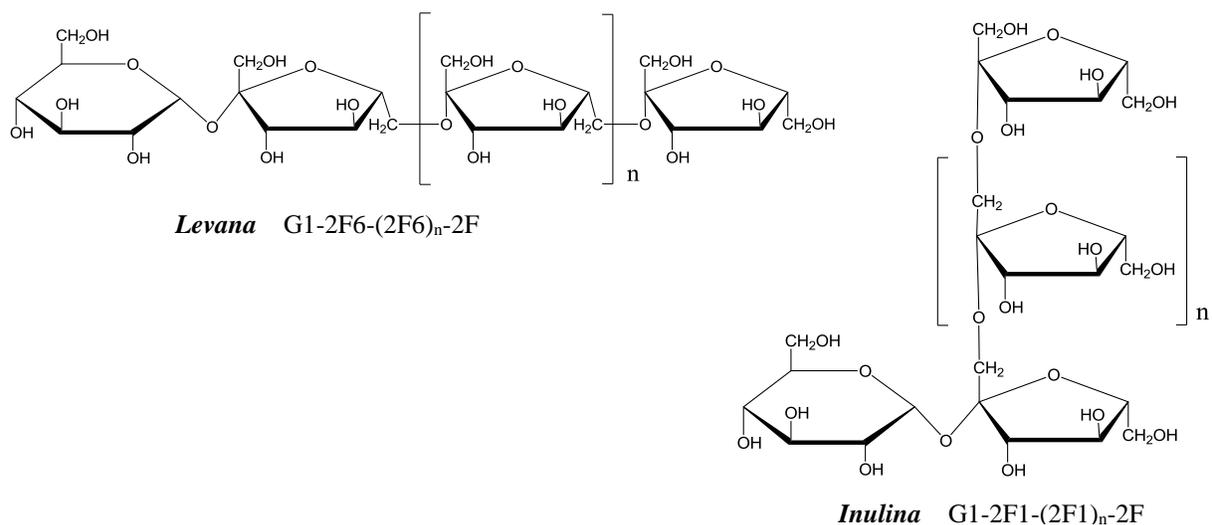


Fig. 1 Estructuras de las fructanas tipo levana e inulina no ramificadas.

Estos sacáridos son producidos por un amplio espectro de bacterias de diferentes fisiologías, por un número limitado de hongos y por aproximadamente el 15 % de especies de plantas. De acuerdo al origen pueden diferir en el tipo de enlace entre las unidades de fructosa adyacentes, la posición de los residuos de glucosa, la presencia de ramificaciones y el grado de polimerización. Por ejemplo, las fructanas de plantas poseen diferentes estructuras y longitudes de cadena, que van desde más de tres hasta varios cientos de unidades de fructosa; mientras que las levanas e inulinas producidas por bacterias poseen grados de

polimerización (GP) de 10^4 a 10^6 , constituyendo las fructanas más grandes de la naturaleza (Ulloa y col., 2010).

1.1.1 Propiedades y aplicaciones

Las fructanas poseen una importante variedad de propiedades y aplicaciones que las convierte en productos de gran interés. Debido a la configuración β del carbono anomérico C2 en sus monómeros de fructosa, estos carbohidratos resisten la digestión enzimática en el tracto gastrointestinal superior alcanzando virtualmente intactos el colon en donde se lleva a cabo la fermentación bacteriana, es así que pueden actuar como fibra dietética mejorando las funciones intestinales tales como producción de heces y excreción fecal. Además son considerados prebióticos puesto que su fermentación es selectiva, causando cambios significativos en la microflora intestinal mediante el incremento del número de bacterias benéficas (bifidobacterias y lactobacilos). Por otra parte, se ha reportado que mejoran la absorción de minerales, tales como calcio y magnesio, y modulan la secreción de péptidos gastrointestinales involucrados en la regulación del apetito así como en el metabolismo de lípidos. Más aún, estudios en animales y datos preliminares en humanos muestran que la ingesta de fructanas reduce el riesgo de padecer cáncer de colon y mejora el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino (Roberfroid, 2007). Muchos de estos estudios se han realizado principalmente con fructanas del tipo inulina, sin embargo para las levanas existen reportes que les atribuyen efectos prebiótico, hipocolesterolémico, antioxidante y antitumoral (Kilian y col., 2002; Abdel-Fattah y col., 2012). Así mismo, se ha demostrado que las levanas pueden ejercer excelentes efectos en la proliferación de células, humectación de piel y alivio de piel irritada si son incorporadas como componentes en cosméticos (Kim y col. 2005). Además tienen aplicación como material de recubrimiento en formulaciones para liberación de fármacos y como surfactante de uso doméstico debido a sus excelentes propiedades tensoactivas (Soon Ah Kang y col., 2009).

El grado de polimerización puede determinar las propiedades y por ende las aplicaciones en las que se puede emplear una fructana determinada. Se ha reportado que inulinas de mayor GP tiene efectos prebióticos y antioxidantes más pronunciados, y promueven mayores cambios benéficos en la microflora y el metabolismo lipídico que los

FOS (Van de Wiele y col., 2007; Żary-Sikorska E. y Juśkiewicz J., 2008). Además fructanas de alto peso molecular son empleadas como sustitutos de grasas debido a sus propiedades similares y a la ausencia de dulzor, en cambio los FOS son preferidos como sustitutos de azúcar puesto que son más solubles, tienen entre 30-50% del poder edulcorante de la sacarosa y poseen cualidades funcionales similares a esta y a los jarabes de fructosa (Kelly, 2008).

1.2 Fructosiltransferasas

Las fructosiltransferasas (FTFs) son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fructosil perteneciente a una molécula donadora (comúnmente la sacarosa) a otra molécula denominada aceptora, como se indica en la siguiente ecuación:



En presencia únicamente de sacarosa, y dependiendo de las condiciones de reacción, las FTFs son capaces de realizar dos reacciones: pueden sintetizar FOS o polímero, transfiriendo la fructosa a las cadenas de fructana que van creciendo, o bien, pueden hidrolizar la sacarosa generando fructosa libre (Fig. 2). Cuando se agrega una molécula aceptora ajena al medio de reacción (tal como alcoholes primarios, monosacáridos o disacáridos), la enzima puede transferirle el grupo fructosil, dando lugar a un fructósido, en lo que se conoce como reacción de aceptor.

Las FTFs de plantas tienen diversas especificidades de donadores, aceptores y productos, actuando generalmente dos o más enzimas en la síntesis de fructanas. En contraste, en bacterias la síntesis se lleva a cabo por la acción de una sola enzima, que de acuerdo al tipo de fructana que produce puede ser levansacarasa (LS) clasificada como EC 2.4.1.10 o inulosacarasa (IS) clasificada como EC 2.4.1.9. Las LSs e ISs se agrupan en la familia 68 de las glicosil-hidrolasas (68GH), y las FTFs de hongos y plantas se encuentran clasificadas dentro de la familia 32GH, en conjunto estas dos familias forman el clan GH-J debido a la similitud estructural que presentan sus integrantes (CAZy, Cantarel y col., 2009).

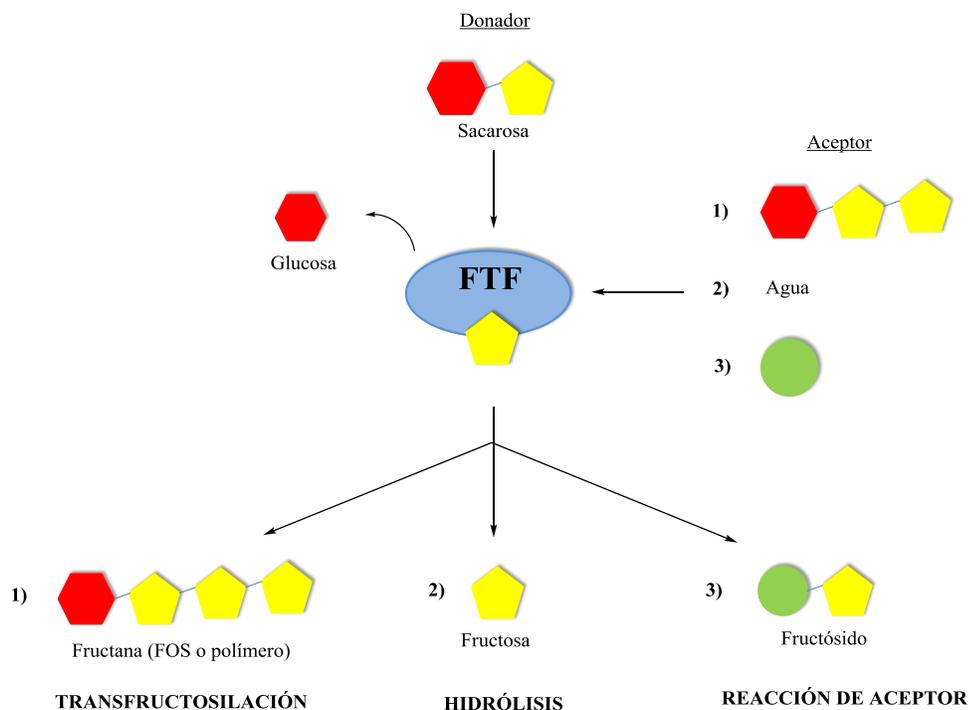


Fig. 2 Representación esquemática de las reacciones catalizadas por las FTFs.

1.2.1 Estructura Tridimensional

Actualmente se encuentran disponibles las estructuras cristalográficas de las LSs de *B. subtilis* (SacB), *G. diazotrophicus* y *B. megaterium* (Meng y Fütterer, 2003; Martínez-Fleites y col., 2005; Strube y col., 2011). Además han sido elucidadas las estructuras 3D de la primera IS proveniente de *L. johnsonii* NCC533 (Pijning y col., 2011) y de una FTF de *A. japonicus*, la cual sintetiza FOSs del tipo inulina tal como diversas fructan-hidrolasas de la familia GH32 (Chuankhayan y col., 2010). Las estructuras de estas proteínas muestran un plegamiento en forma de una β -propela de cinco hojas circundando una cavidad central para unión a sustrato, que tiene forma de embudo y está cargada negativamente (Fig. 3). Las 5 hojas beta, adoptan la clásica topología “W” de 4 hebras β antiparalelas (Meng y Fütterer, 2003).

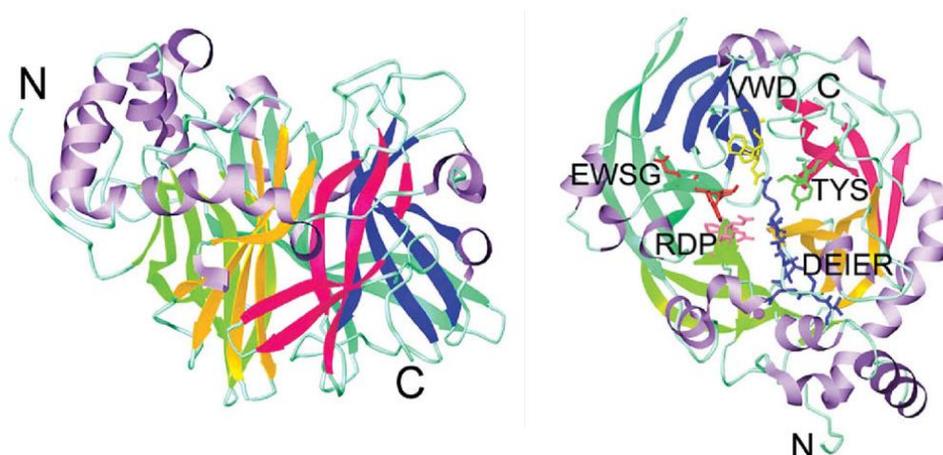


Fig. 3 Vistas ortogonales del plegamiento β -propela. En distinto color se muestra cada una de las 5 hojas constitutivas y en la figura de la derecha se indica la localización de motivos conservados de las FTFs (Meng y Futterer, 2003)

1.2.2 Mecanismo de reacción

Chambert y col. (1974) determinaron que el mecanismo de reacción de la LS de *B. subtilis* se ajusta a un modelo de dos pasos tipo ping-pong que involucra la formación de un intermediario covalente fructosil-enzima. En el primer paso (glicosilación), el grupo β -carboxilato de un residuo aspártico realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico del sustrato (C2 de la fructosa), formando un intermediario fructosil-enzima. El catalizador ácido/base actúa como ácido general donando un protón al grupo glicosil saliente (glucosa). En el segundo paso (desglicosilación) el catalizador ácido/base actúa ahora como una base general, removiendo un protón del grupo fructosil entrante (perteneciente al agua u otro aceptor apropiado), dando lugar a un anión altamente reactivo que realiza un segundo ataque nucleofílico sobre el enlace éster del complejo enzima-fructosa (Fig. 4). Además se ha encontrado que otro residuo aspártico, aunque no participa directamente en el mecanismo de reacción, coordina enlaces de hidrógeno con el fructofuranósido en las posiciones 3-OH y 4-OH de forma tal que estabiliza el estado de transición (Meng y Futterer, 2003).

Recientemente, se ha propuesto la extensión de este esquema con la incorporación de un residuo arginina altamente conservado (dentro del motivo RDP) que funciona como

activador del catalizador ácido-base cuando el sustrato entra a la cavidad catalítica (Yuan y col., 2012).

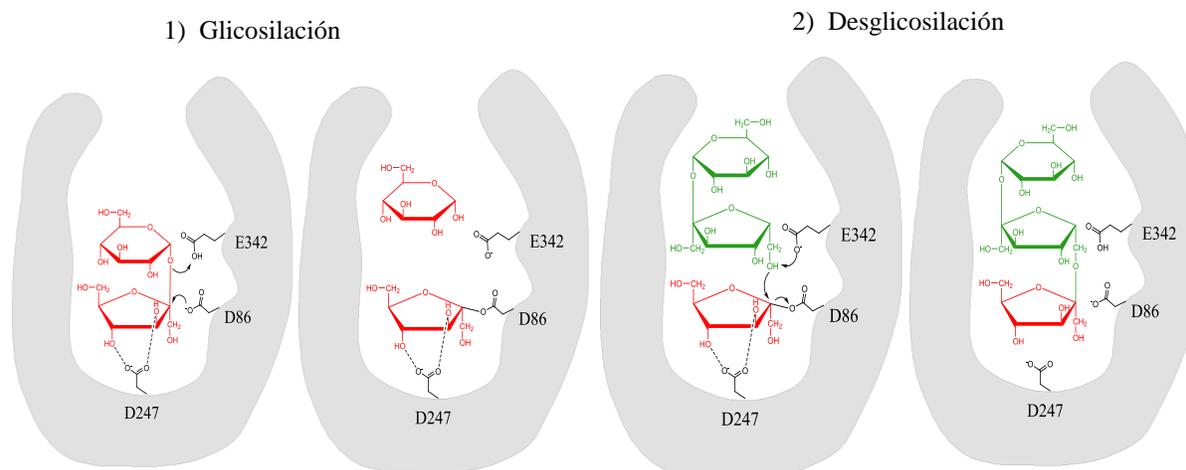


Fig. 4 Representación del mecanismo de reacción. Nucleófilo (D86), estabilizador del estado de transición (D247) y catalizador ácido/base (E342), numeración de SacB (adaptado de Chuankhayan y col., 2010)

1.2.3 Arquitectura del sitio catalítico

De acuerdo con Davies y col. (1997), el sitio activo de las GH puede ser dividido en subsitios de unión a sustrato con respecto a la ruptura del enlace glicosídico, de tal forma que por definición, los residuos en contacto con la fructosa conforman el subsitio -1 y los aminoácidos en contacto con la molécula de glucosa constituyen el subsitio +1. La identificación de subsitios de unión al sustrato -1, +1, +2 se ha logrado gracias a las estructuras 3D de SacB en complejo con sacarosa y con rafinosa (Fig. 5) así como de diversos estudios de mutagénesis en FTFs. De esta forma se han identificado nueve residuos conservados en las FTFs involucrados en catálisis y/o interactuando con la unión de fructosa y glucosa dentro de los subsitios -1 (W85, D86, W163, R246 y D247) y +1 (R360, E340, E342 y R246; numeración de SacB). El subsitio -1 es altamente específico en la unión de unidades de fructosa, mientras que el +1 es más flexible, exhibiendo afinidad tanto para glucosa dentro de la sacarosa y rafinosa, como para sustratos aceptores durante la transglicosilación, y afinidad para diferentes glicopiranosidos (manosa, galactosa, fucosa y xilosa) y disacáridos (maltosa, lactosa y melobiosa) (Seibel y col., 2005). También se ha determinado que el subsitio +2 está formado por los residuos N242 y Y237, los cuales

interactúan con la molécula de la galactosa de la rafinosa de manera indirecta a través de puente de hidrógeno mediados por moléculas de agua (Meng y Fütterer, 2008).

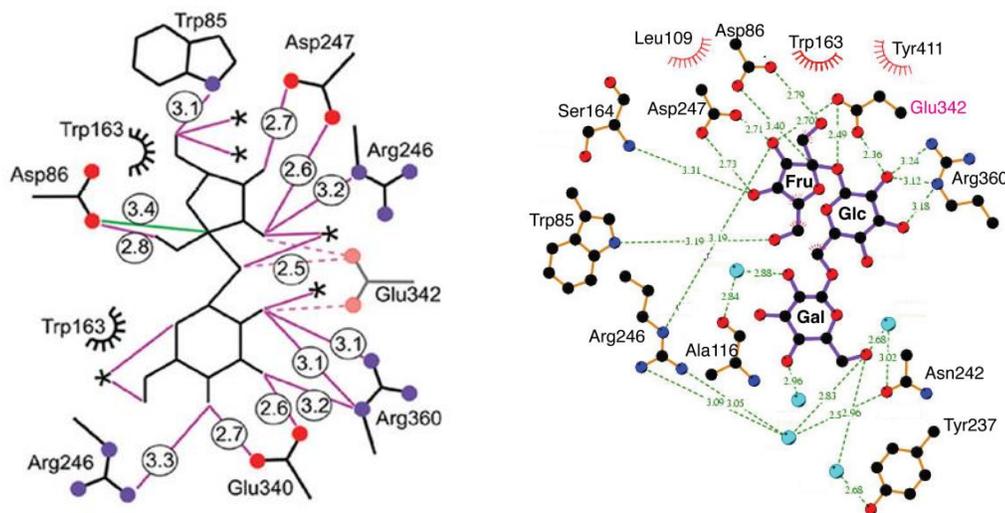


Fig. 5 Interacciones en los complejos SacB-sacarosa (izquierda) y SacB-rafinosa (derecha) (Meng y Fütterer, 2003, 2008)

Adicionalmente, se han elucidado las estructuras cristalográficas de la FTF de *A. japonicus* (AjFT) en complejo con varios sustratos donadores/aceptores (sacarosa, 1-kestosa, nistosa y rafinosa). Los análisis de estas estructuras revelaron cuatro subsitios completos de unión a sustrato (-1 a +3) dentro de la cavidad catalítica, con forma y rasgos distintos de aquellas de las enzimas del clan GH-J (Chuankhayan y col., 2010). En particular el complejo con nistosa permitió demostrar que Tyr404 y Glu405 (numeración de AjFT) definen los subsitios +2 y +3 con gran flexibilidad estructural.

1.3 Especificidad de productos de las FTF. Síntesis de polímero vs FOS.

El mecanismo de elongación empleado por una FTF dictaminará la producción de polímero y/o FOS, esta relación de síntesis difiere significativamente dependiendo de la estructura de la enzima, y esta a su vez depende de su origen. Así por ejemplo, se encuentran enzimas que sintetizan principalmente polímero sin la acumulación de fructanas de peso molecular intermedio, tales como las LSs de *B. subtilis*, *L. reuteri* 121 y *B. megaterium* (Ortiz-Soto y col., 2008; Ozimek y col., 2006 y Homann y col., 2007). Para dichas enzimas

se ha propuesto un mecanismo procesivo de elongación, en el que la cadena del polímero en crecimiento permanece en interacción con la enzima y es liberada hasta que alcanza un alto grado de polimerización. En contraste, las LSs de *G. diazotrophicus*, *Z. mobilis*, y *L. sanfranciscensis*, así como la IS de *L. reuteri* 121, sintetizan mezclas de FOSs de distintos GP (Hernandez y col., 1995; Doelle y col., 1993; Korakli y col., 2003; Ozimek y col., 2006). De esta manera, en estas últimas enzimas se propone que la elongación ocurre mediante un mecanismo no procesivo (Kralj y col., 2008), que implica la liberación de la fructana al medio de reacción una vez que la enzima le transfiere el grupo fructosil.

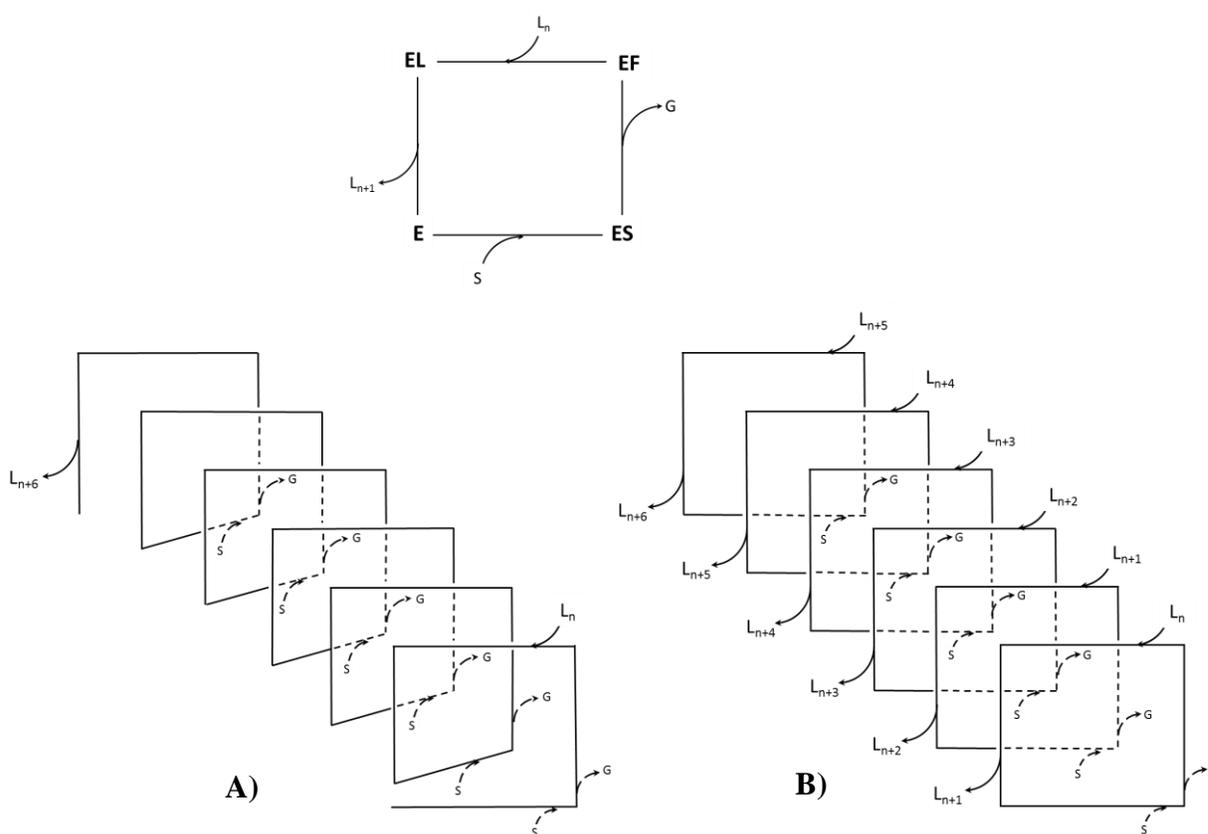


Fig. 6 Esquemas de los mecanismos de elongación Procesivo (A) y No Procesivo (B) para las FTFs. El cuadro superior representa el ciclo catalítico básico.

En un mecanismo procesivo la enzima mantiene una fuerte asociación con la cadena en crecimiento, la cual es utilizada como única molécula aceptora transfiriéndole sucesivamente los grupos fructosilos hasta que alcanza un determinado tamaño en el que se desfavorece la interacción y es liberada (Fig. 6-A). De esta forma, como productos de

reacción se obtienen cadenas de un peso molecular determinado sin la presencia de moléculas de tamaño intermedio. Por otro lado, la elongación de cadenas mediante un mecanismo no procesivo involucra muchos ciclos de captación del aceptor, transferencia del grupo fructosilo y liberación del producto de transferencia (Fig. 6-B), es así que durante la reacción se observará la acumulación de una serie de moléculas de distinto GP en el medio de reacción.

1.3.1 Efecto de las condiciones de reacción

En estudios relacionados con las condiciones de reacción de las FTFs, se ha encontrado que la selección de dichas condiciones puede afectar la especificidad de reacción (hidrólisis y transferencia) e incluso delimitar el grado de polimerización que alcanza el producto, esto último permite suponer que las condiciones de reacción de alguna forma afectan al mecanismo de elongación. Como se mencionó anteriormente SacB de *B. subtilis* es una enzima altamente hidrolítica que sin embargo sintetiza polímero, con una distribución bimodal de pesos moleculares (PM), esto es, produce una distribución de levanas de alto PM con promedio de 3500 kDa y otra de bajo PM de aproximadamente 8.3 kDa (Ortiz-Soto y col., 2008). En 1980 Tanaka, Oi y Yamamoto a partir de análisis de metilación determinaron que la levana de bajo PM consiste de 2.2 ramas, cada una compuesta por 22.4 residuos fructosilos; mientras que para la levana de alto PM estimaron que la longitud de la unidad repetida lineal consiste de 11.1 residuos fructosilos.

1.3.1.1 Fuerza iónica y disolvente

Tanaka y col. (1979 y 1980) desarrollaron los primeros estudios sobre los factores que afectan la velocidad de síntesis y el grado de polimerización en reacciones catalizadas por SacB. En ellos observaron que condiciones de alta fuerza iónica (0.4-0.8 M de amortiguador de fosfato) esta enzima sintetiza únicamente levana de bajo PM. Este efecto fue también observado para la LS de *B. licheniformis* (LsRN) que también sintetiza dos levanas de distinto PM (612 kDa y 11 kDa), de las cuales la de menor PM es favorecida al incrementar la fuerza iónica con 0.5 M de NaCl (Nakapong y col., 2013).

Por otra parte, se ha demostrado el incremento de la actividad polimerasa de SacB en medios no acuosos. En soluciones concentradas de dimetil sulfóxido y 2M2B la reacción de

transfructosilación comprende el 80% de la actividad total de SacB mientras que en otros solventes orgánicos tales como 1,4 dioxano, acetona y acetonitrilo la actividad hidrolítica es completamente eliminada (Chambert y Petit-Glatron, 1989; Castillo y López-Mungía, 2004). Además se ha reportado que en presencia de alcoholes, tales como etanol o polietilenglicol, SacB puede modificar su perfil de productos sintetizando únicamente levana de alto PM (Tanaka y col., 1979).

1.3.1.2 Concentración de sustrato y temperatura

En general se ha reportado para varias LSs que la disminución de la temperatura favorece la síntesis de levanas (Tanaka y col., 1979; Sangiliyandi y Gunasekaran, 2001; Nakapong y col., 2013). Euzenat y col. (1997) emplearon la LS de *B. subtilis* C4 para la producción de levana a altas temperaturas (50 y 60°C) y altas concentraciones de sacarosa (1-2.69M), bajo estas condiciones no convencionales encontraron que la enzima cataliza tanto la formación de levana (de bajo y alto PM) como de oligosacáridos con un grado de polimerización menor a 50. Sus resultados mostraron además que el PM promedio que alcanza la levana de bajo PM al final de la reacción decrece mientras más altas son la temperatura y la concentración de sacarosa. Por su parte, LsRN de *B. licheniformis* sintetiza levanas de alto PM como mayor producto a 60°C mientras que a menores temperaturas (30°C) la levana de bajo PM es sintetizada mayoritariamente (Nakapong y col., 2013)

1.3.1.3 Incorporación de levana al medio de reacción

Otra condición interesante la constituye el hecho de que la adición de levana al inicio de reacción acelera la velocidad de polimerización en la catálisis por LSs. Se ha encontrado que la activación por levana en SacB es dependiente tanto del peso molecular como de la concentración del polímero empleado (Tanaka y col., 1979; Ortiz-Soto y col., 2008). Además Tanaka y col. (1979) desarrollaron estudios de adición de levana de bajo PM marcada radiactivamente a la reacción catalizada por SacB, en dichos estudios se demostró que la molécula añadida no es incorporada dentro del polímero de alto PM sintetizado.

En nuestro grupo de trabajo se obtuvo información relativa al efecto estabilizador de las levanas sobre SacB, este efecto quedó demostrado mediante experimentos calorimétricos

que revelaron un incremento en la T_m (temperatura media de desnaturalización) de la proteína en presencia de levana de bajo PM. Más aun, estudios sobre la reacción de activación por levana demostraron que dicha molécula añadida al medio es elongada previo a la formación de los productos propios de la reacción (levana de alto y bajo PM). Dado que este fenómeno sucede además a una mayor velocidad de transfructosilación (activación) se propone que resulta de una mayor afinidad de la levana como molécula aceptora del residuo fructosil, en detrimento de la elongación de nuevas moléculas de sacarosa.

Cabe señalar que varios de estos estudios se han desarrollado con fines productivos, buscando disminuir la relación hidrólisis/transferencia y aumentar el rendimiento en la producción de levana. Debido a esto, se hace necesario estudios enfocados al efecto de las condiciones de reacción sobre el mecanismo de elongación en sí, los cuales permitirán conocer con mayor detalle la naturaleza del proceso de síntesis de levanas desarrollado por SacB.

II. OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

A partir del conocimiento del mecanismo de elongación de SacB de *Bacillus subtilis* es posible definir condiciones de reacción y/o modificaciones estructurales que orienten hacia la síntesis de levanas de un peso molecular determinado.

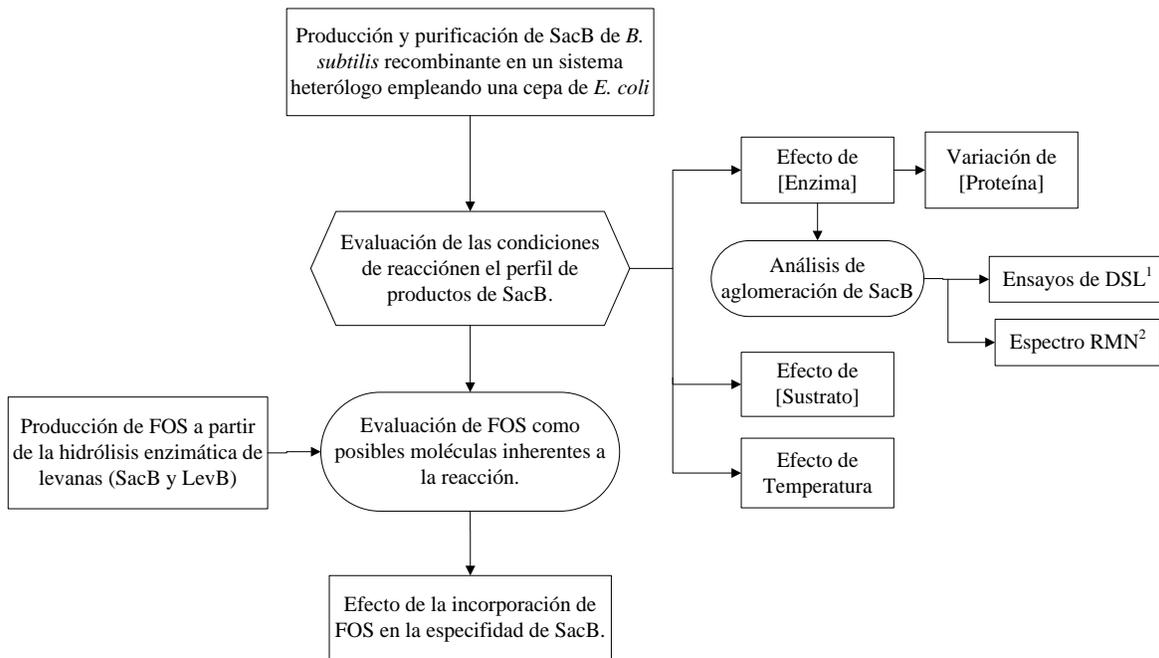
2.2 Objetivo General

Estudiar los elementos fisicoquímicos y estructurales que afectan el mecanismo de síntesis de levanas en SacB de *B. subtilis*.

2.3 Objetivos Particulares

- Estudiar las condiciones de reacción y su efecto en la especificidad de reacción de SacB
- Evaluar el perfil de productos de SacB de *B. subtilis* y sus posibles mecanismos de elongación.
- Producir y purificar moléculas aceptoras inherentes a la reacción de SacB.
- Estudiar el mecanismo de síntesis de levanas mediante el uso de moléculas aceptoras inherentes a la reacción.

III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



¹ Dispersión dinámica de Luz.

² Resonancia magnética nuclear.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Producción de SacB

4.1.1 Expresión heteróloga de SacB en E. coli. El gen de la levansacarasa SacB de *B. subtilis* clonado en el plásmido pET22b fue transformado en células electrocompetentes de *E. coli* cepa BL21 (DE3). Para la producción de la enzima recombinante cinco colonias de células transformadas se inocularon en 50 mL de medio LB con ampicilina 200 µg/mL dentro de un matraz de 250 mL y se incubó O/N a 37°C y 200 rpm. Posteriormente, 15 mL del cultivo se emplearon como inóculo para 1 L de medio LB con ampicilina 200 µg/mL en un matraz Fernbach, este cultivo fue incubado a 37°C y 200 rpm hasta tener una OD₆₀₀ de 0.6. La inducción se realizó con 200 µL de IPTG 1M durante 8 h a 18°C y 120 rpm. Las células fueron cosechadas mediante centrifugación a 4000 rpm durante 20 min y posteriormente se lavaron en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 6.0. La lisis celular se desarrolló empleando lizozima 1 mg/mL y congelando-descongelando tres veces, posteriormente se sometió a sonicación con 4 pulsos de 10 seg y por último se centrifugó a 9000 rpm durante 40 min. El producto se resuspendió en 50 mL de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 6.0.

4.1.2 Expresión heteróloga de la mutante nula E342A en E. coli. El gen de SacB fue mutado y clonado en trabajos previos (Ortíz-Soto, 2008). La expresión heteróloga en *E. coli* se llevó a cabo bajo las mismas condiciones arriba especificadas.

4.1.3 Purificación de enzimas. Las enzimas recombinantes se purificaron mediante FPLC en un equipo AKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech) empleando una columna de intercambio catiónico CM-sepharose. La elusión se realizó con un gradiente de fosfatos 0.05-0.1M pH 6.

4.2 Análisis de proteína

4.2.1 Cuantificación de proteína. La proteína total del producto enzimático fue cuantificada mediante el sistema Protein Assay (Bio-Rad) basado en el método de Bradford y utilizando una curva de seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.

4.2.2 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE). La enzima purificada fue analizada por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 10%, la proteína se mezcló con amortiguador de carga que contiene 0.125 M tris-Cl pH 6.8, 4% SDS (w/v), 10% glicerol (v/v), 10% de β -mercaptoetanol (v/v) y azul de bromofenol 0.05% (w/v) y posteriormente se hirvió durante 5 min. El gel se cargó con 50 μ g de cada proteína y la electroforesis se llevó a cabo a 20 mA durante aproximadamente 1 hora y media. Los geles fueron teñidos con solución de azul de Coomassie 0.125% y desteñidos en agua durante una noche.

4.3 Ensayo estándar de actividad enzimática

La actividad fue determinada a pH 6.0 en amortiguador de fosfatos 50 mM a 37°C, midiendo la velocidad inicial de liberación de poder reductor mediante la técnica de DNS a partir de una solución de sacarosa de 100g/L (preparada con el mismo amortiguador) en un volumen de reacción de 600 μ l. Se tomaron alícuotas de 50 μ L del medio de reacción cada determinado tiempo, se les añadió 50 μ L de DNS y fueron calentadas a ebullición durante 5 minutos. Después de enfriar las muestras en hielo por 5 min se midió la absorbancia a 540 nm. Una unidad de actividad de LS fue definida como la cantidad de enzima requerida para obtener un μ mol de azúcar reductor equivalente a fructosa por minuto a 37°C y un pH de 6, tal actividad corresponde a la actividad LS global, ya que incluye las dos actividades de la enzima: hidrólisis y transfructosilación. La medición de actividad se realizó por duplicado y se empleó para la dosificación de la enzima en los estudios desarrollados.

4.4 Estudio del efecto de las condiciones de reacción en el grado de polimerización de productos de SacB

Se realizaron reacciones empleando SacB purificada considerando 3 variables de reacción: concentración de enzima (0.1, 1 y 10 U/mL), concentración de sacarosa (100 y 400 g/L) y temperatura (25 y 37°C). Para cada set de condiciones se desarrollaron 5 reacciones independientes detenidas a diferentes intervalos de tiempo. Todas las reacciones se realizaron en volúmenes de 600 μ L, empleando amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6 con agitación de 350 rpm. Cada reacción fue detenida a cada tiempo determinado congelándola inmediatamente en una mezcla de hielo seco/acetona y posteriormente calentada en agua

hirviendo durante 10 min para la inactivación de la enzima. Las muestras de reacción fueron enfriadas y congeladas para su posterior análisis.

4.5 Identificación y análisis de productos.

4.5.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La cuantificación de azúcares simples (fructosa, glucosa, sacarosa) se llevó a cabo en un sistema Waters 600E (Waters Corp. Milford, MA) equipado con un detector de índice de refracción (Waters 410) y una columna Prevail Carbohydrate ES (4.6 x 250 mm) mantenida a 30°C, usando acetonitrilo/agua (75:25) como fase móvil a un flujo de 1 mL/min.

4.5.2 Cromatografía de permeación en gel (GPC). La distribución de PM de las levanas sintetizadas fue analizada por HPLC con detección de índice de refracción (Waters 410). Se empleó un sistema en serie de columnas Ultrahydrogel SEC de Waters: Ultrahydrogel Linear (7.8 x 300 mm) y Ultrahydrogel 500 (7.8 x 300 mm) con un índice de exclusión entre 0.50 y 10,000 kDa. Se realizó una elusión isocrática teniendo nitrato de sodio 0.1 M como fase móvil a un flujo de 0.8 mL/min y una temperatura de 30°C.

4.5.3 Cromatografía de capa fina (TLC). La detección de fructooligosacáridos se realizó en primera instancia por cromatografía en capa fina empleando placas de sílica gel ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ 10x20 cm (Macherey-Nagel). Las placas se desarrollaron en una cámara horizontal (CAMAG) usando como fase móvil una mezcla de ácido acético-cloroformo-etanol-agua (3:11:11:1, v/v/v/v). El revelado de las placas se realizó por aspersion con α -naftol y calentamiento.

4.5.4 Cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia con detección de pulso amperométrico (HPAE-PAD). Un análisis más fino en la detección de oligosacáridos se desarrolló mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia (previa centrifugación y sonicación de las muestras) en un equipo Dionex equipado con un detector de pulso amperométrico (ED50 Dionex) y una columna CarboPac PA-200 (3 x 250 mm). La columna fue equilibrada a 30°C con 150 mM de NaOH a un flujo de 0.35 mL/min y las fructanas fueron eluidas con un gradiente de acetato de sodio (5-100 mM de acetato de sodio

por 20 minutos, 100-400 mM de acetato de sodio por 60 min y 10 min de reequilibración a condiciones iniciales). Se emplearon como estándares glucosa, fructosa, sacarosa, 1-kestosa, 6-kestosa, neokestosa, nistosa, fructofuranosil-nistosa así como Raftilosa P95 (Orafti), que consiste en una mezcla de oligofructosa de inulina con DP entre 2 y 8.

4.6 Producción de fructooligosacáridos

4.6.1 Producción y purificación de levana. La síntesis de levana de bajo PM se llevó a cabo en un volumen de 50 mL, con 400 g/L de sacarosa y 10 U/mL de SacB, la reacción se desarrolló por 20 h a 37°C y 350 rpm. La levana producida fue precipitada mediante la adición de dos volúmenes de 50 mL de etanol absoluto al crudo de reacción y separada del sobrenadante por centrifugación y decantación. El precipitado se resuspendió en agua y se dializó contra agua destilada 48 h en una membrana de diálisis con poro de exclusión molecular de 10 kDa, realizando cambios del disolvente cada día. Por último, la solución de levana fue liofilizada.

4.6.2 Hidrólisis de levana. La hidrólisis enzimática de levana se realizó mediante la acción de 1 U/mL de endolevanasa LevB de *B. licheniformis* sobre 200 g/L de levana (una unidad de actividad endolevanasa fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de azúcar reductor equivalente a fructosa por minuto a 37°C, pH 6 y 100 g/L de levana de bajo PM como sustrato). La hidrólisis se desarrolló por 3 h a 37°C, pH 6 y 350 rpm. Los FOS obtenidos fueron finalmente filtrados y congelados hasta su utilización.

4.7 Análisis de aglomeración de SacB

4.7.1 Dispersión dinámica de Luz (DLS). El análisis de dispersión de luz se llevó a cabo en un Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK) equipado con láser 4 mW He-Ne (633 nm) y ángulo de dispersión fijo de 173°C a 25°C. La distribución de tamaños se obtuvo a partir de mediciones de intensidad y volumen por triplicado. Las muestras de proteína empleadas fueron diluidas a las concentraciones estudiadas con buffer fosfatos 50 mM pH 6 (filtrado previamente tres veces usando filtros Whatman 0.22 μm).

4.7.2 Resonancia magnética nuclear (RMN). El marcaje isotópico de SacB con ^{15}N se obtuvo realizando la expresión en medio mínimo M9 conteniendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ de acuerdo al método reportado por Marley y col. (2001). La purificación se realizó como se indica en la sección 4.1.3. El espectro de RMN se obtuvo a 25°C en un equipo Varian 700 MHz (Varian Inc., USA) equipado con sonda criogénica.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Las condiciones de reacción y su efecto sobre la especificidad de SacB

En esta primera sección de resultados se describe el estudio del efecto de las condiciones de reacción en el mecanismo de elongación de la levansacarasa de *B. subtilis* a partir del análisis del perfil de productos generados durante su catálisis. En este estudio se emplearon tres concentraciones enzimáticas (0.1, 1 y 10 U/mL), dos concentraciones de sustrato (100 y 400 g/L de sacarosa) y dos temperaturas (37 y 25°C). La Tabla 1 indica los tiempos finales de reacción desarrollados para cada set de condiciones, mientras que las máximas conversiones alcanzadas se muestran en la Fig. 7.

Tabla 1. Tiempos finales de reacción.

Temperatura	[Sacarosa] (g/L)	[Enzima] (U/mL)	Tiempo
37°C	100	0.1	100 h
		1	5 h
		10	30 min
	400	0.1	200 h
		1	20 h
		10	2 h
25°C	100	0.1	200 h
		1	10 h
		10	1 h
	400	0.1	284 h
		1	50 h
		10	5 h

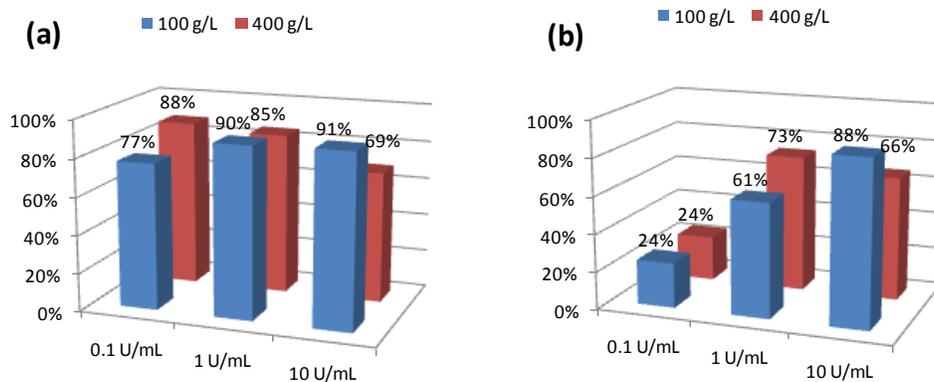


Fig. 7 Conversiones de reacción alcanzadas en las reacciones a distintas condiciones de reacción (a) 37°C (b) 25°C.

En las reacciones a 25°C que involucraron una concentración enzimática de 0.1 U/mL las conversiones alcanzadas fueron mucho menores a las conversiones registradas en otras condiciones, sin embargo la homologación de los porcentajes de conversión para estas condiciones requeriría tiempos demasiado largos (> 300 h). Es así que para dichas condiciones resultará imposible realizar una comparación adecuada.

5.1.1 Modificación de la especificidad de reacción: relación Hidrólisis-Transferencia

Uno de los principales efectos de las condiciones de reacción en la catálisis por LSS se da en la relación hidrólisis/transferencia (H/T). En la Fig. 8 se recopilan las relaciones H/T registradas a tiempos finales de los distintos experimentos llevados a cabo. Dichos valores de H/T, fueron determinados a partir de la cuantificación de fructosa (F) y glucosa (G) libres producidos de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\%H = \frac{F}{G} \quad \%T = \frac{G - F}{G}$$

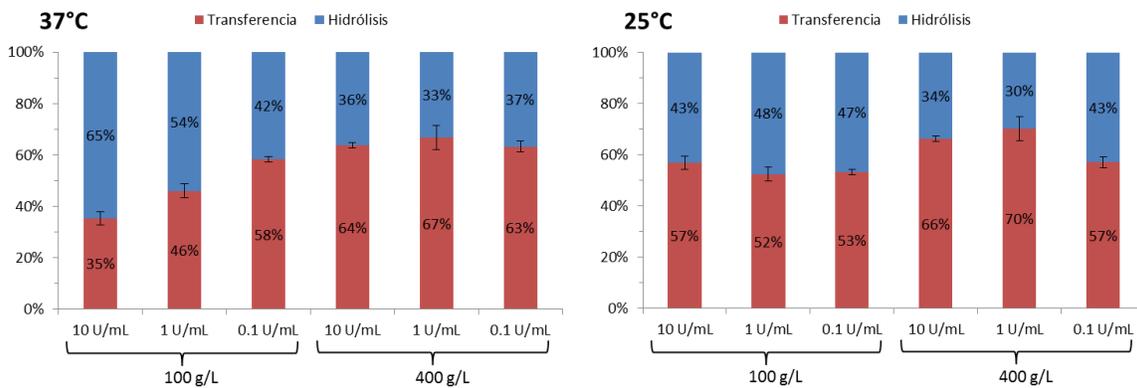


Fig. 8 Relaciones H/T a tiempos finales de las condiciones de reacción ensayadas.

En condiciones estándares de reacción (1 U/mL, 100 g/L de sacarosa y 37°C) la relación H/T es típicamente de 54/46 ±2.68%, este valor se vio modificado entre 65/35 y 30/70 producto de la variación en las condiciones de reacción estudiadas. Los resultados obtenidos no permiten establecer una relación directa entre el cociente H/T y la concentración de enzima debido a que en general se observó la misma relación H/T para los experimentos desarrollados a la misma concentración de sacarosa y temperatura sin importar la concentración de enzima empleada. Por el contrario, al cambiar la concentración de sustrato

y la temperatura, dicha relación si se vio modificada; el incremento de la sacarosa inicial y la disminución de la temperatura de reacción favorecieron la reacción de transferencia, registrándose los más altos porcentajes de esta reacción (66 y 70%) a 25°C con 400 g/L de sacarosa. Dichas tendencias concuerdan con reportes en la literatura; Tanaka y col. (1979) observaron una mayor efectividad en la síntesis de levana al reducir la temperatura registrando valores aparentes de transferencia de 56.37% a 30°C y de 77.78% a 4°C empleando 100 g/L de sustrato (estos valores son aparentes puesto que se calcularon a partir de los datos reportados de poder reductor y glucosa libre). Por su parte, Porras-Dominguez (2012) reportó una mayor eficiencia en la síntesis de levana conforme se aumenta la concentración de sustrato desde valores de 23% de transferencia con 200 g/L de sacarosa hasta 83% con 600 g/L de sacarosa a 35°C.

5.1.2 La concentración de enzima y su efecto modulador del perfil de productos sintetizados por SacB

Partiendo de la concentración enzimática estándar se realizaron reacciones empleando una cantidad de enzima 10 veces mayor y otra 10 veces menor para determinar su efecto en el perfil de productos de SacB. Con una concentración enzimática de 1 U/mL y condiciones estándar de reacción (Fig. 9-B) SacB produce típicamente dos distribuciones de polímero: levana de alto PM o LevanA (2300 kDa, GP ~14200) y levana de bajo PM o LevanB (7.2 kDa, GP ~44), sin que se observen productos de tamaño intermedio entre ambas distribuciones. La formación de ambos productos se observa simultáneamente desde el primer y hasta el último de los tiempos analizados, con una mayor proporción de LevanB. La determinación del PM de las levanas sintetizadas se realizó a partir de una curva de calibración desarrollada en GPC con estándares de dextranas.

En los experimentos desarrollados con concentraciones de 1 y 10 U/mL de enzima, la distribución bimodal se elimina y claramente se favorece la síntesis de un solo tipo de levana; mientras que con 0.1 U/mL se produce LevanA (Fig. 9-A), con 10 U/mL se sintetiza solo LevanB (Fig. 9-C). Una hipótesis que puede explicar este fenómeno es que la cantidad de enzima en la reacción determina el número de núcleos de formación de polímero; de forma que una mayor cantidad de enzima aumenta los núcleos de formación durante la síntesis y

por lo tanto disminuye el peso molecular de las cadenas sintetizadas (Porrás-Domínguez, 2012).

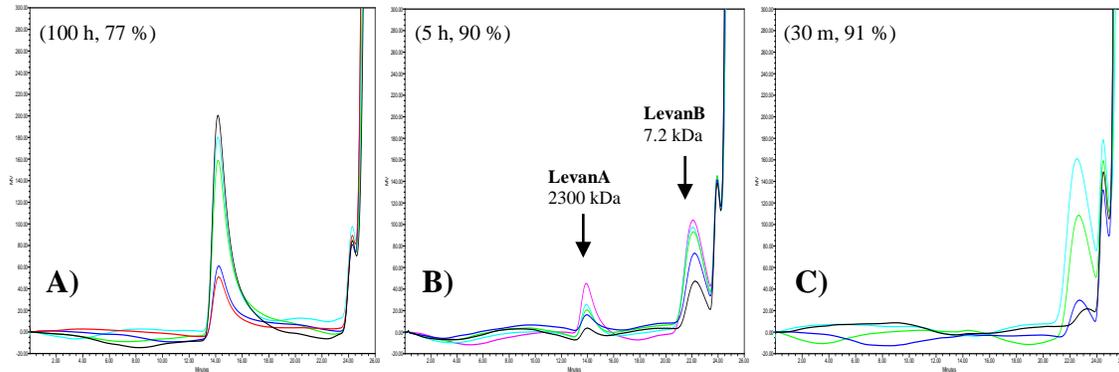


Fig. 9 Evolución en el perfil de levanas sintetizadas por SacB con 100 g/L, 37°C. A) 0.1 U/mL, B) 1U/mL, C) 10 U/mL. Entre paréntesis se indica el tiempo final de reacción y la conversión alcanzada.

Si bien la mayoría de las LSs sintetizan principalmente polímero, con el empleo de técnicas analíticas de alta eficiencia se ha reportado que estas enzimas también producen, aunque en pequeñas cantidades, moléculas de oligosacáridos (Euzenat, 1997; Homann y col., 2007). Por lo anterior, el análisis de los perfiles de producción de oligosacáridos de SacB a las distintas condiciones estudiadas se realizó empleando HPAE-PAD, una técnica de alta sensibilidad para la detección y análisis de carbohidratos. Los cromatogramas de las Fig. 10-B y 10-C muestran la producción de oligosacáridos con GP de hasta 80 en las reacciones donde las concentraciones de enzima fueron de 1 y 10 U/mL respectivamente. Las primeras y más intensas señales corresponden a glucosa, fructosa y sacarosa residual así como de trisacáridos identificados como 1-kestosa (β 2,1Fru- β 2,1Fru- α Glc), 6-kestosa (β 2,6Fru- β 2,1Fru- α Glc) y neokestosa (β 2,6Fru- α Glc- β 1,2Fru) además de blastosa (β 2,6Fru-Glc), un isómero de la sacarosa (Homann y col., 2007). La acumulación de 1-kestosa, se observa durante el transcurso de la reacción, este subproducto se ha reportado en la catálisis de otras LSs como las de *Z. mobilis* y *B. megaterium* (Goldman y col., 2008; Homann y col., 2007). Es así que la presencia de 1-kestosa indicaría cierta inespecificidad de la enzima (que se caracteriza por la síntesis de enlaces β 2,6) durante las primeras fases de elongación, sin embargo, al formarla no es capaz de transferirle residuos fructosilos generando su acumulación en el medio de reacción (Euzenat, 1996). Por el contrario, la 6-kestosa que está

presente en cantidades aparentemente constantes durante la reacción, es continuamente empleada como molécula aceptora para la formación de levana, evitando así su acumulación. Con respecto a la neokestosa y blastosa, su origen durante la catálisis de la LS aún no se entiende completamente.

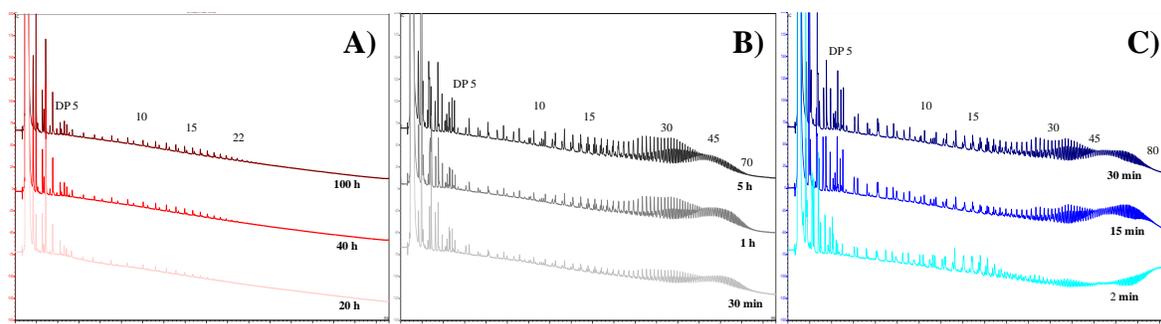


Fig. 10 Evolución en el perfil de oligosacáridos producidos por SacB con 100 g/L de sacarosa, 37°C. A) 0.1 U/mL, B) 1U/mL, C) 10 U/mL.

Los perfiles de oligosacáridos de las condiciones de 1 U/mL y 10 U/mL (Fig. 10-B y 10-C) muestran series de compuestos de distinto PM. En estas dos condiciones se lleva a cabo la síntesis de LevanB, caso contrario lo constituye la condición de 0.1 U/mL en la que no hay síntesis de LevanB ni presencia de oligosacáridos con GP arriba de 22 (Fig. 10-A), con base en esto se concluye que la síntesis de LevanB involucra la formación y acumulación de múltiples moléculas intermedias libres en el medio de reacción. Más aún, considerando que LevanB está constituida por una distribución de levanas cuyo PM promedio es 7.2 kDa (~44 fructosas) se establece que los oligosacáridos de mayor tamaño (DP>22) observadas por HPAE-PAD constituyen *per sé* lo que denominamos LevanB y que hasta ahora había sido analizada únicamente por GPC.

Lo anterior se corroboró mediante la producción y purificación de LevanB. La Fig. 11 muestra la composición de esta levana en la que está presente la misma serie de oligosacáridos de distinto PM observada anteriormente, con la ausencia de azúcares simples y de pequeño PM separados durante la diálisis incluida en la purificación (Sección 4.6.1). En la comparación del perfil de oligosacáridos de LevanB con otras fructanas de tipo inulina destacan el mayor tamaño que en promedio alcanza la levana así como la presencia de

moléculas de tamaños similares pero distinta estructura (posiblemente distintas ramificaciones), los perfiles de las inulinas de achicoria (*Cichorium intybus*) y dalia (*Dahlia variabilis*) no muestran dichas moléculas debido a que están constituidas principalmente por moléculas lineales.

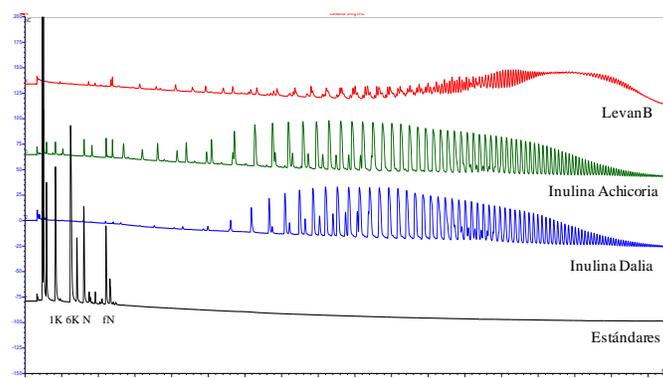


Fig. 11 Comparación de los perfiles en HPAE-PAD de LevanB purificada, Inulina de achicoria e Inulina de dalia. Estándares: 1-kestosa (DP3), 6-kestosa (DP3), nistosa (DP4) y f-nistosa (DP5).

Por último, resulta de especial interés el perfil de oligosacáridos de la condición de 0.1 U/mL (Fig. 10-A). En esta condición se observa la síntesis de LevanA desde tiempos iniciales sin la producción de LevanB ni polímero de PM intermedio, el análisis en HPAE-PAD muestra la presencia pero no acumulación de oligosacáridos con un GP<22, esto puede ser indicio del desarrollo de un mecanismo semiprocésivo para la elongación de LevanA, en el que los oligosacáridos presentes podrían indicar el tamaño de la molécula aceptora con suficiente afinidad para activar la síntesis procesiva de LevanA.

5.1.2.1 Concentración de enzima: ¿efecto cinético o estructural?

Los experimentos anteriores pusieron de manifiesto una modificación en el mecanismo de elongación de SacB atribuido a la variación de actividad enzimática presente en el medio de reacción. Para discernir si la naturaleza de este cambio es debido a factores cinéticos o a la concentración proteica en sí, se llevaron a cabo reacciones bajo la misma actividad enzimática (0.1 U/mL) pero variando la concentración de proteína total (0.55, 5.5 y 55 $\mu\text{g/mL}$). Lo anterior se logró añadiendo la mutante nula SacB E342A en combinación

con la enzima activa. Dicha variante presenta una mutación del residuo que funge como catalizador ácido-base (E342), se ha reportado su utilización en la cristalización de complejos SacB-Sacarosa y SacB-Rafinosa (Meng y Fütterer, 2003, 2008). La incubación de la mutante bajo las mismas condiciones de reacción ensayadas con SacB activa no generó glucosa, fructosa o síntesis de levanas, con lo que se corroboró su nula actividad en las condiciones de estudio.

Las concentraciones de proteínas empleadas (0.55, 5.5 y 55 $\mu\text{g/mL}$) corresponden a las actividades enzimáticas antes estudiadas (0.1, 1 y 10 U/mL respectivamente) y tal como se puede observar en la Fig. 12 se obtuvo el mismo patrón en la modificación de perfiles de productos. La Fig. 12-A muestra la síntesis mayoritaria de LevanA a baja concentración enzimática (0.1 U/mL que corresponde a 0.55 $\mu\text{g/mL}$ de SacB activa). El incremento en la concentración proteica mediante la adición de la variante nula E342A a 0.55 $\mu\text{g/mL}$ de SacB activa desembocó en la modificación del perfil de productos hacia la síntesis bimodal para 5.5 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 12-B) y síntesis mayoritaria de LevanB para 55 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 12-C). Este experimento demostró que la modificación en la especificidad de SacB por el incremento de la actividad enzimática observado en el apartado anterior no depende de factores cinéticos intrínsecos de la catálisis sino posiblemente de elementos estructurales de la enzima, como podrían ser interacciones enzima-enzima.

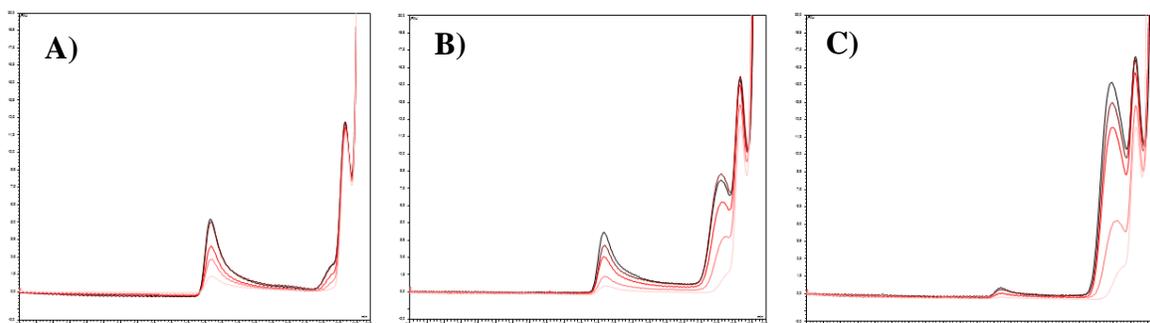


Fig. 12 Evolución en el perfil de levanas sintetizadas por 0.1 U/mL de SacB activa con 100 g/L de sacarosa a 37°C empleado distinta cantidad de proteína total. A) 0.55 $\mu\text{g/mL}$, B) 5.5 $\mu\text{g/mL}$, C) 55 $\mu\text{g/mL}$.

Con el objetivo de demostrar si dicha posible interacción enzima-enzima es específica se llevó a cabo un análisis incrementando la concentración de proteína en el medio de reacción de SacB pero ahora empleando albúmina como aditivo. Como se muestra en las Fig.

13-A y Fig. 14-A la adición de albúmina hasta 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína total no generó el cambio drástico observado al adicionar la variante nula E342A (Fig. 13-C y Fig. 14-C), con la cual, para ambas actividades enzimáticas ensayadas (0.1 y 1 U/mL), se induce la producción de únicamente LevanB. Sin embargo, los perfiles obtenidos con la adición de albúmina tampoco fueron idénticos a los que genera SacB por sí sola (Fig. 13-B y Fig. 14-B, sin aditivos), sino que se observa un incremento en la síntesis de LevanB en las dos actividades enzimáticas ensayadas. El hecho de que la adición de albúmina sea capaz de interferir en cierta medida en el mecanismo de elongación de SacB nos señala que la interacción enzima-enzima es no específica.

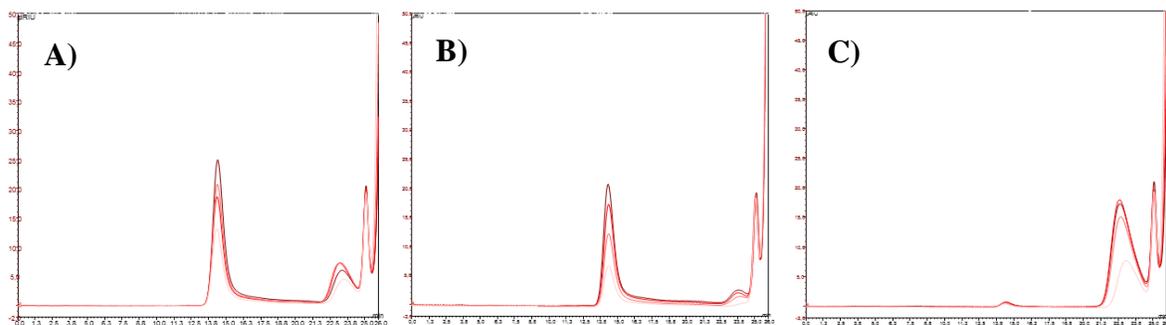


Fig. 13 Evolución en el perfil de levanas sintetizadas por 0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.1 U/mL) de SacB con 100 g/L de sacarosa a 37°C (B) y con la adición de Albúmina (A) y E342A (C) hasta 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína total.

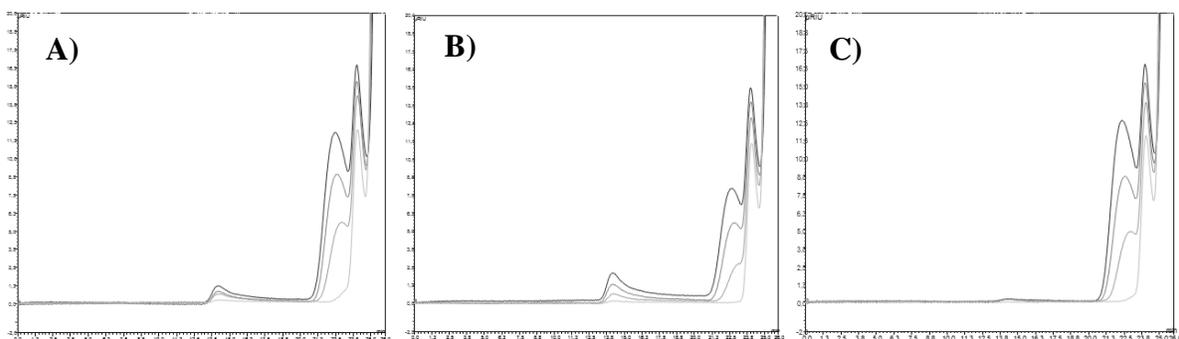


Fig. 14 Evolución en el perfil de levanas sintetizadas por 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1 U/mL) de SacB con 100 g/L de sacarosa a 37°C (B) y con la adición de Albúmina (A) y E342A (C) hasta 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína total.

5.1.3 El incremento de la concentración de sustrato y la elongación no procesiva de LevanB

En lo que respecta a la concentración de sustrato, su efecto se estudió empleando una cantidad de sacarosa 4 veces mayor que la condición estándar, esto es 400 g/L. El aumento en la concentración de sustrato no significó un cambio sustancial en los perfiles del polímero generado, de forma que nuevamente la síntesis de LevanA, LevanB o ambas estuvo definida por cada una de las concentraciones enzimáticas empleadas (Fig. 15).

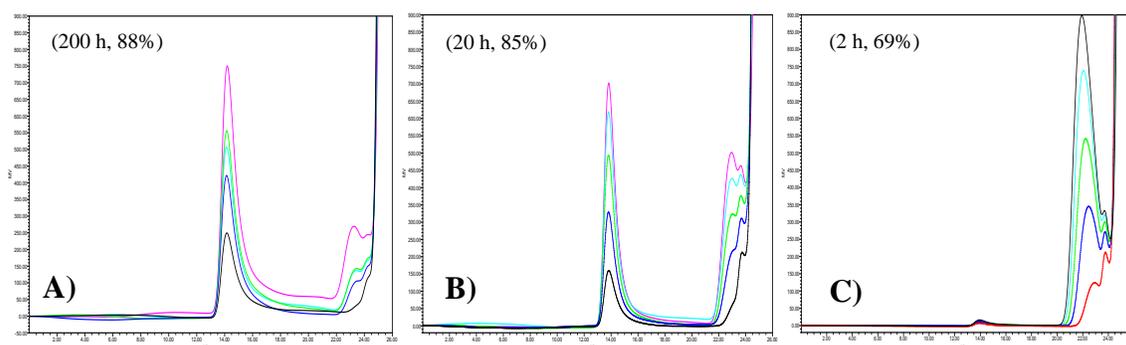


Fig. 15 Evolución en el perfil de levana sintetizada por SacB con 400 g/L de sacarosa, 37°C.

A) 0.1 U/mL, B) 1 U/mL, C) 10 U/mL.

Una diferencia evidente en los perfiles de polímeros a 400 g/L, contra los desarrollados con 100 g/L de sacarosa, es observable en la reacción con 0.1 U/mL de SacB (Fig. 15-A), en esta condición nuevamente predomina la síntesis de LevanA, sin embargo se observa la incipiente formación de LevanB, acercándose a la bimodalidad presente en la reacción con 1 U/mL (Fig. 15-B). Estas dos condiciones (0.1 y 1 U/mL) presentan un perfil de síntesis de LevanA muy similar, incluso en los niveles de producción alcanzado, esta síntesis ocurre desde tiempos tempranos llegando a alcanzar proporciones superiores a las generadas con 100 g/L de sustrato. El incremento de sustrato aumenta los niveles de producción de LevanA y permite la disponibilidad de una mayor cantidad de moléculas aceptoras que sean dirigidas hacia la síntesis de LevanB, dicha síntesis se ve favorecida por una aparente saturación de LevanA en la concentración enzimática de 0.1 U/mL; en el caso de 1 U/mL existen suficientes núcleos formadores de cadenas que llevan la producción de LevanB a niveles superiores. Caso aparte lo constituye la condición de 10 U/mL, donde no

existe competencia alguna y la síntesis de LevanB ocurre de forma exclusiva a grandes niveles debido al incremento del sustrato.

Los perfiles de oligosacáridos generados al incrementar la concentración de sustrato muestran la formación y acumulación de múltiples compuestos durante la reacción con las tres cantidades enzimáticas ensayadas (Fig. 16). Como ya se había indicado, en las tres condiciones se observa la síntesis de LevanB pero en distinta proporción, de tal forma que las condiciones de 0.1 y 1 U/mL (Fig. 16-A y Fig. 16-B) generan compuestos con DP de hasta 45 que pueden representar las cadenas en proceso de elongación hacia la síntesis de LevanB. Por otro lado el perfil de la reacción ocurrida con 10 U/mL (Fig. 10-C) muestra claramente el aumento en el tamaño de las cadenas intermedias hasta tamaños superiores (aproximadamente DP de 75), similares a los observados en el apartado 5.1.2 y que corresponden a LevanB. Es así que se concluye que la síntesis de LevanB está asociada a la formación de una serie completa de oligosacáridos de PM intermedio necesarios para la elongación hasta el PM final de dicha levana. Esto aunado a que fue posible observar el incremento del PM de dicho polímero en el seguimiento de la reacción por GPC permite concluir que la elongación de LevanB se desarrolla vía un mecanismo no procesivo.

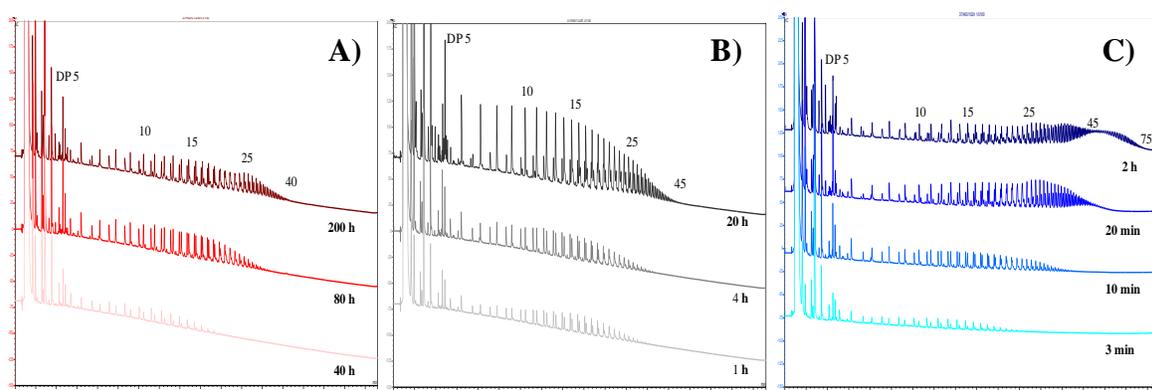


Fig. 16 Evolución en el perfil de oligosacáridos producidos por SacB con 400 g/L de sacarosa, 37°C.
A) 0.1 U/mL, B) 1 U/mL, C) 10 U/mL

5.1.4 La disminución de la temperatura y su efecto sobre la relación H/T

Como se señaló en un principio la disminución de la temperatura generó un incremento en la relación H/T conforme a reportes anteriores (Tanaka y col., 1979). Para

resolver el cuestionamiento sobre si los cambios en los niveles de transferencia tienen efectos en los perfiles de productos sintetizados por SacB, se realizaron experimentos empleando como temperatura de reacción 25°C. A esta temperatura la actividad enzimática disminuye al 45% de la mostrada a 37°C, por lo que para alcanzar los mismos niveles de conversión se requiere de aproximadamente el doble de los tiempos de reacción, sin embargo, en las condiciones con concentración enzimática 0.1 U/mL las conversiones alcanzadas fueron de alrededor de 24%, por lo que las comparaciones que se realicen se harán en niveles de conversión cercanos.

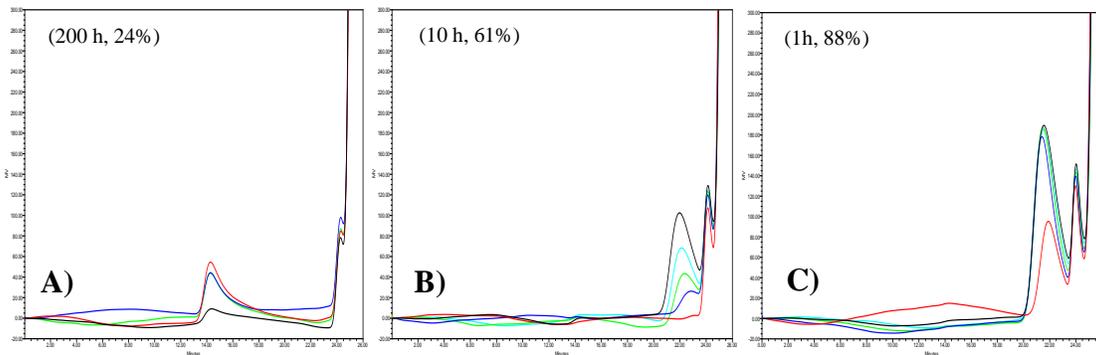


Fig. 17 Evolución en el perfil de levana sintetizada por SacB con 100 g/L de sacarosa, 25°C. A) 0.1 U/mL, B) 1U/mL, C) 10 U/mL.

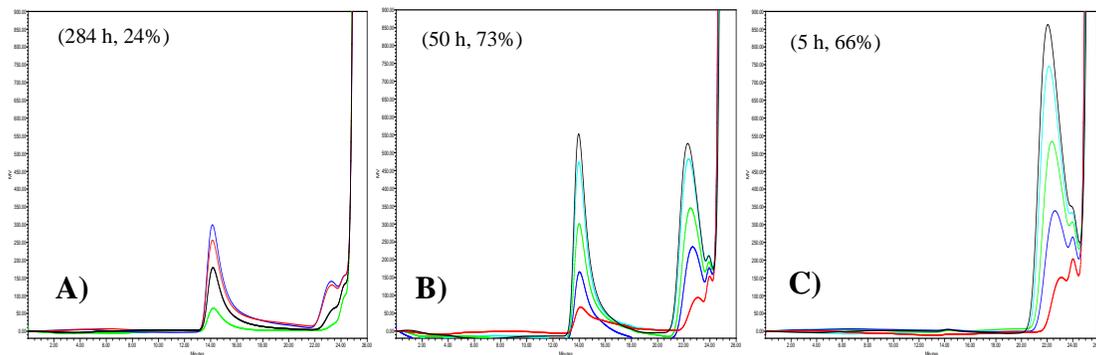


Fig. 18 Evolución en el perfil de levana sintetizada por SacB a 400 g/L de sacarosa, 25°C. A) 0.1 U/mL, B) 1U/mL, C) 10 U/mL.

En general, la disminución de la temperatura no significó un cambio en el perfil de las levanas sintetizadas por SacB en las distintas condiciones estudiadas (Fig. 17 y Fig. 18), con una clara excepción: la reacción desarrollada con 1 U/mL y 100 g/L de sacarosa (Fig.

17-B). En dicha condición se produce únicamente LevanB, contraria a la distribución bimodal obtenida en su reacción homóloga a 37°C, este fenómeno es difícil de explicar debido a que al incrementar la concentración de sacarosa a 400 g/L se observa nuevamente la síntesis de los dos tipos de levana.

En lo concerniente a la formación de oligosacáridos, la Fig. 19 muestra la generación de las mismas series de oligosacáridos observadas a 37°C que fueron asociadas a la síntesis de LevanB, de igual forma, en la condición de 0.1 U/mL y 100 g/L de sacarosa donde exclusivamente se sintetiza LevanA dichas series de oligosacáridos están ausentes y en cambio se detectan débilmente compuestos con GP de hasta 18.

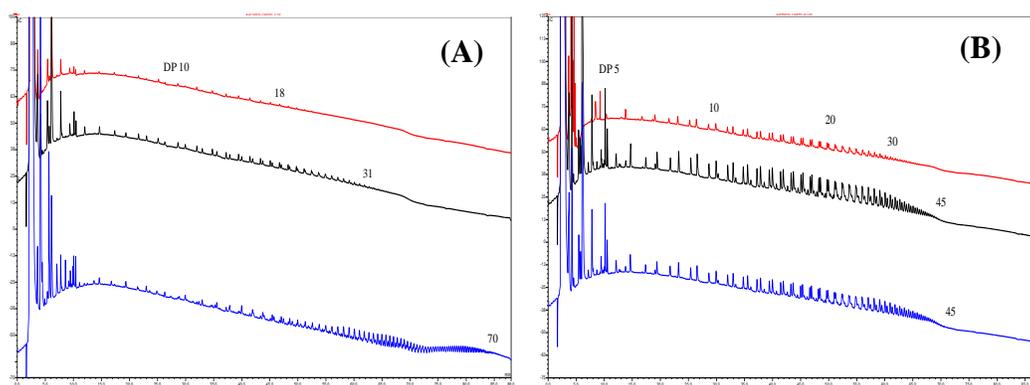


Fig. 19 Perfil de oligosacáridos producidos por SacB a 25°C (conversiones entre 24-39%). Sacarosa 100 g/L (A) y 400 g/L (B). 10 U/mL (azul), 1 U/mL (negro), 0.1 U/mL (rojo).

En términos generales la disminución de la temperatura no generó un cambio en los perfiles de productos en comparación con los obtenidos a 37°C y si bien la reacción de transferencia se favorece en términos de la relación H/T, no es posible establecer una relación directa entre la relación H/T y el perfil de productos desarrollado por SacB.

5.1.5 ¿SacB forma conglomerados enzimáticos?

De las condiciones estudiadas la concentración de enzima resultó ser el factor determinante en el perfil de levanas sintetizadas por SacB, más aun, en el apartado 5.1.2.1 se determinó que esta modificación no obedece a factores cinéticos, por lo que elementos estructurales, tales como interacciones enzima-enzima, podrían estar involucrados. Por

ejemplo, se ha reportado que la levansacarasa de *Z. mobilis* existe en dos formas activas dependientes del pH y fuerza iónica, y cada forma enzimática presenta diferente especificidad en sus productos (Goldman y col., 2008). Lo anterior permite suponer la existencia de un fenómeno similar en SacB, en el que el incremento de la concentración de enzima en el medio de reacción puede determinar la formación de aglomerados enzimáticos que por impedimentos estéricos inhiben la síntesis de productos de alto peso molecular (LevanA), orientando la producción hacia las levanas de menor tamaño (LevanB).

Para corroborar la posible aglomeración de SacB se realizaron análisis encaminados a elucidar su conformación empleando las técnicas de Dispersión de luz y Resonancia magnética nuclear.

5.1.5.1 Ensayos de dispersión de luz

La dispersión de luz dinámica (DLS) constituye un método relativamente rápido para la determinación del tamaño de biomoléculas en solución. Esta técnica es exacta, no invasiva y simple de llevar a cabo, además de que la muestra puede ser recuperada (Nobmann y col., 2007). Los ensayos con DLS pueden emplearse para distinguir entre muestras homogéneas monodispersas o agregados, por ejemplo, este método permite diferenciar claramente la insulina en su forma dimerica inactiva en comparación con el hexámero activo el cual aumenta significativamente de tamaño (Xu y col., 2012).

En los ensayos se emplearon concentraciones de SacB de 5.5 y 55 $\mu\text{L}/\text{mL}$ así como una preparación altamente concentrada de 12 mg/mL , para concentraciones menores de 5.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ no fue posible realizar apropiadas mediciones por la poca intensidad de señal de la muestra. El análisis de SacB a 5.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Fig. 20-A) por DSL arrojó la presencia de partículas con diámetro hidrodinámico promedio de $5.65 \text{ nm} \pm 2.28$, cifras similares se obtuvieron para 55 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Fig. 20-B) que resultaron de $5.18 \text{ nm} \pm 0.65$. Como se mencionó anteriormente, estas concentraciones enzimáticas corresponden respectivamente a 1 y 10 U/mL de SacB, y a pesar de que en ambas condiciones se produce un perfil de levanas distintos no pudo observarse una modificación en el estado conformacional de la enzima, por lo menos en lo que respecta a la posible aglomeración de la misma.

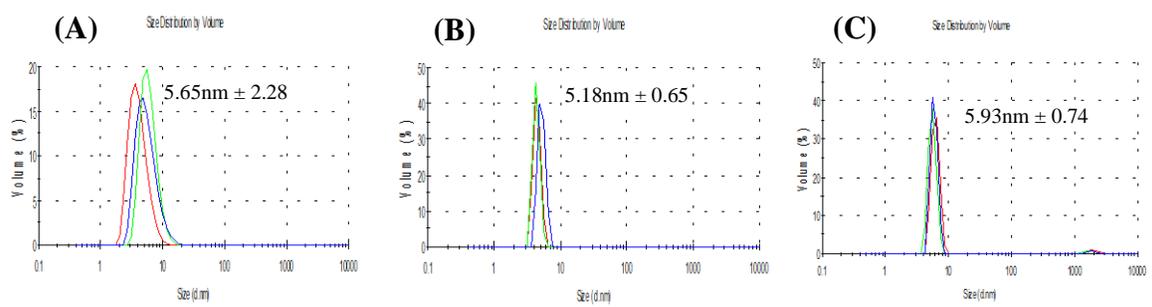


Fig. 20 Distribuciones de tamaño por volumen registradas en DSL para muestras de SacB de (A) 5.5 µg/mL, (B) 55 µg/mL (C) 12 mg/mL.

Si se generaran conglomerados de SacB debido al incremento de la concentración enzimática la condición de excesiva concentración permitiría la observación de los mismos, sin embargo, el análisis de la preparación superconcentrada de SacB (12 mg/mL) arrojó como resultado la presencia de una población de partículas del mismo orden de magnitud observado anteriormente, con diámetro hidrodinámico promedio de $5.93 \text{ nm} \pm 0.74$ (Fig. 20-C). A partir de la estructura cristalográfica de SacB se obtuvo el diámetro promedio del monómero que resultó ser de $6.32 \text{ nm} \pm 0.93$. Este valor sugeriría que los tamaños de partícula determinados por DSL que se observan en la Fig. 20 corresponden a monómeros de SacB, pero es de hacer notar que el tipo de ensayos desarrollados no permiten discernir entre especies monoméricas o diméricas, más aun considerando los altos valores de polidispersión obtenidos (>0.95). Sin embargo es posible descartar la formación de grandes conglomerados o estructuras proteicas tales como las reportados para la LS de *Z. mobilis*, cuyas fibrillas presentaban longitudes de algunos micrómetros con diámetros entre 12-13 nm (Goldman y col., 2008).

5.1.5.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Como información adicional se obtuvo el espectro de resonancia de SacB a partir de un marcaje isotópico empleando ^{15}N . El espectro HSQC de la Fig. 21 muestra múltiples picos con buena dispersión, cada uno de los picos representa un residuo dentro de la estructura de la enzima y el hecho de que no estén aglutinados es benéfico puesto que facilita su posterior asignación. Si bien hay un faltante de señales, considerando que SacB está compuesta por alrededor de 470 residuos, dicho espectro permite una buena observación para

el marcaje simple llevado a cabo. Más aun, la conformación de los picos observados no corresponde con la conformación de una posible estructura proteica aglomerada. Una estructura mayor a 100 kDa no hubiera sido posible observarla puesto que entre más grande es la partícula menor es la señal generada. Esta constituye una evidencia más que desecha la hipótesis de aglomeración de SacB a altas concentraciones (las mediciones de RMN se llevaron a cabo sobre una muestra de 2.22 mg/mL)

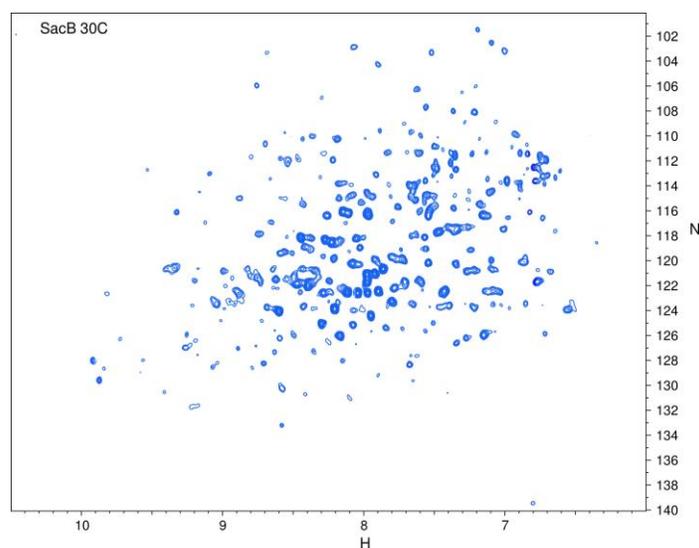


Fig. 21 Espectro HSQC adquirido de una muestra 0.04 mM de SacB (54 kDa) marcada con ^{15}N .

Cabe señalar que en las aplicaciones de rutina de RMN el límite de tamaño de las biomoléculas a estudiar se encuentra en el orden de 30-40 kDa, sin embargo el marcaje con deuterio puede favorecer la calidad espectral e incrementar el rango a 60-80 kDa (Holdgate y col., 2010). Considerando esto, el espectro obtenido confirma a la NMR como una potencial herramienta para examinar la estructura-función de SacB que debe considerarse para estudios posteriores.

5.2 Síntesis de *LevanA* y *LevanB* por *SacB*: dos procesos separados.

La peculiaridad de SacB radica en su capacidad para sintetizar dos tipos de polímeros; para explicar la presencia en el medio de reacción de dos poblaciones de levanas que son tan distintas en sus características pueden considerarse dos hipótesis. Por un lado la formación de *LevanA* puede estar limitada a la síntesis en primera instancia de la *LevanB*, de modo que

la elongación de esta última generaría el polímero de mayor tamaño. Sin embargo, los experimentos desarrollados por Tanaka y col. (1980) con LevanB marcada y añadida al medio de reacción demostraron que si bien actúa como molécula aceptora y se elonga en cierta medida, no es incorporada en la estructura de LevanA. En contraparte, la síntesis de ambas familias de levanas puede deberse a procesos independientes y posiblemente esquemas distintos. Esta segunda hipótesis es consistente con las evidencias observadas en este trabajo; la síntesis de LevanA puede ocurrir sin la generación en primera instancia de LevanB (condiciones de 0.1 U/mL) y viceversa (condiciones de 10 U/mL) o bien, en las condiciones en que ocurre la bimodalidad (1 U/mL) el aumento del sustrato, la disminución de la temperatura o la incorporación de moléculas ajenas tales como albúmina, son capaces de favorecer la síntesis de LevanB o inhibir la producción de LevanA, lo que indica una competencia entre procesos.

Los análisis desarrollados en este trabajo permitieron asociar la síntesis de LevanB con la formación de una serie completa de oligosacáridos de PM intermedio que son elongados hasta el PM final determinado para LevanB (7.2 kDa). En base a esto se postula que la elongación de LevanB se desarrolla vía un mecanismo no procesivo. Por otra parte, las evidencias en la síntesis de LevanA no permiten aun relacionarla con certeza con un mecanismo procesivo o no procesivo.

5.2.1 Búsqueda de intermediarios en la síntesis de LevanA

Normalmente la dificultad al intentar establecer la procesividad de un mecanismo radica en la poca sensibilidad de las técnicas analíticas empleadas, en nuestro caso, la cromatografía de permeación en gel no revela compuestos de PM intermedio entre las levanas que sintetiza SacB, sin embargo Euzenat y col. (1997) para la LS de *B. subtilis* C4 y Moulis y col. (2006) para el caso una dextransacarasa productora de polímero, han indicado la presencia en pequeñas cantidades de cadenas de polímero de tamaños intermedios dentro de los productos de sus respectivas FTFs. Por lo anterior, se hace necesario un análisis a mayor profundidad de los productos de reacción con el fin de identificar los posibles compuestos que pudieron hallarse en concentraciones mínimas y que están siendo desestimados en los perfiles de polímero mostrados.

Un intento por encontrar dichos intermediarios consistió en realizar una precipitación fraccionada de los polímeros sintetizados por SacB. La Fig. 22-A muestra que la separación de LevanA y LevanB es posible mediante una precipitación simple con etanol absoluto, un solo volumen de etanol equivalente al volumen del crudo de reacción es suficiente para arrastrar toda LevanA presente. Para la precipitación de las posibles moléculas intermedias entre LevanA y LevanB se realizó una precipitación fraccionada con cinco volúmenes equivalentes de etanol. Cada fracción precipitada se disolvió en agua y fue analizada por GPC. La Fig. 22-B muestra que nuevamente se obtiene la separación completa de LevanA con la primera precipitación, sin embargo, en el siguiente paso, LevanB es precipitada en su mayoría sin la detección de moléculas mayores a ella, las precipitaciones posteriores únicamente arrastraron remanentes en el sobrenadante de LevanB cuyo PM promedio fue decreciendo en cada paso.

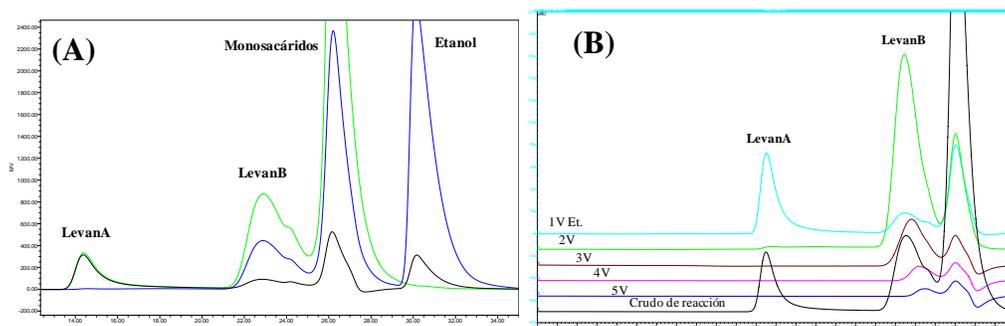


Fig. 22 GPC de las fracciones obtenidas por precipitación con etanol de las levanas sintetizadas por SacB. (A) Precipitación con un volumen de etanol: crudo de reacción (verde), precipitado (negro), sobrenadante (azul). (B) Precipitación fraccionada con 5 volúmenes de etanol.

El segundo intento en la búsqueda de dichos intermediarios consistió en la síntesis exclusiva de LevanA (empleando 0.1 U/mL de SacB) en mayores volúmenes de reacción (50 mL), de modo que su posterior concentración revelara la presencia de posibles intermediarios presentes en concentraciones anteriormente no detectables. El polímero sintetizado fue precipitado con etanol y disuelto en el menor volumen de agua que su viscosidad permitió (10 mL). Cabe señalar que la viscosidad de LevanA en solución es muy alta, de modo que su concentración queda limitada por la necesidad de generar muestras lo suficientemente solubles para su análisis mediante GPC. Como se puede observar en la Fig. 23, el polímero

concentrado tiene exactamente el mismo perfil que mostró anterior a su precipitación y concentración. Es así que queda de manifiesto la imposibilidad de detección por GPC de posibles intermediarios sobre una muestra de LevanA entera. Debe considerarse que la precipitación con etanol siempre mostró el mismo perfil de GPC y la precipitación siempre arrastró todo remanente de LevanA, por lo que podría pensarse que dicha levana es un complejo estructurado de múltiples cadenas fuertemente asociadas.

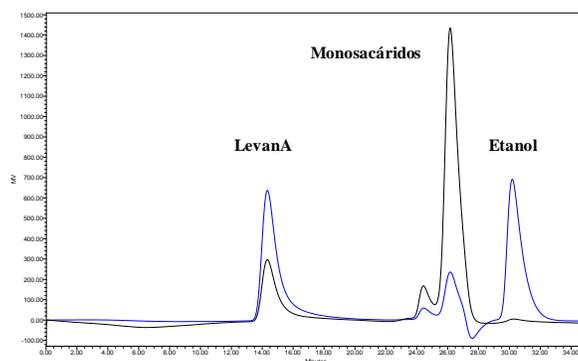


Fig. 23 Perfiles de GPC de la síntesis de LevanA (negro) y su posterior concentración (azul).

Por último, la posible detección de los intermediarios mediante HPAEC-PAD, tal como se había logrado con LevanB, quedó descartada al modificar el programa de elusión y llevar el sistema cromatográfico a su límite de resolución con el resultado mostrado en la Fig. 24, en donde una muestra de LevanB purificada es eluida completamente, sin embargo, no hay señal alguna de la correspondiente LevanA purificada, aun cuando el gradiente empleado es el indicado para la completa elusión de compuestos incorporados a la columna.

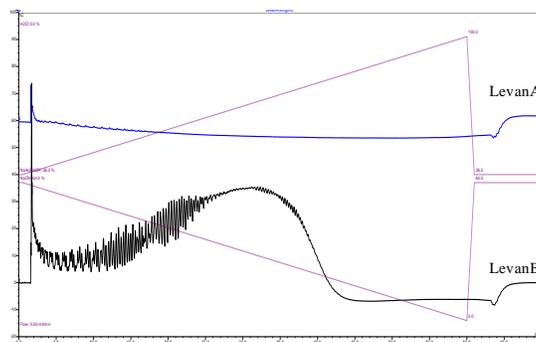


Fig. 24 Perfil de HPAEC-PAD de LevanA y LevanB empleando un gradiente de elusión tipo rampa de 175 mM a 500 mM de Acetato de sodio en NaOH 150 mM.

5.3 Moléculas aceptoras inherentes a la reacción de SacB y su papel en el mecanismo de elongación

La segunda fase dentro de los objetivos planteados comprende el estudio del mecanismo de elongación de SacB desde la perspectiva de cada una de las moléculas aceptoras involucradas en el transcurso de la reacción y cuyo alargamiento da lugar a la formación de los polímeros LevanA y LevanB. Considerando que ambas levanas se proceden por procesos independientes, centrémonos en primer lugar en la síntesis de LevanB. Hemos encontrado que dicha síntesis ocurre vía un mecanismo no procesivo en el cual se observa la formación de moléculas intermedias cuya acumulación se ve impedida debido a su utilización como moléculas aceptoras dentro del mecanismo de transfructosilación, lo que posteriormente da lugar a la formación y acumulación de LevanB. Es así que las diferencias entre las moléculas aceptoras pueden deberse a distintas afinidades que SacB tiene por cada una de ellas.

Por otra parte, si bien el mecanismo involucrado en la síntesis de LevanA es menos claro, la formación desde tiempos tempranos de reacción de un producto de tal magnitud de PM debe involucrar forzosamente intermediarios que son rápidamente elongados, sobre los cuales la enzima muestre una mayor afinidad.

El estudio de afinidades entre una enzima y su ligando es posible mediante experimentos calorimétricos, sin embargo, si se desea realizar una comparación entre cada uno de los ligandos es necesaria la producción y purificación de cada uno de ellos. A continuación se presentan los ensayos encaminados hacia la obtención de dichas moléculas aceptoras inherentes a la reacción.

5.3.1 Producción de posibles moléculas aceptoras: FOS, hidrolizado de levana.

Recientemente en nuestro grupo de trabajo se ha desarrollado un proceso enzimático que permite la obtención en grandes cantidades de FOS a partir de levanas bacterianas mediante el uso de endolevanasas (Porrás-Domínguez, 2012). Este proceso involucra básicamente dos pasos: el primero de ellos es la síntesis de levanas por precisamente SacB de *B. subtilis*, para el segundo paso se realiza la hidrólisis de dicho polímero empleando la

endolevanasa de *B. licheniformis*, lo que finalmente resulta en la producción de FOS con GP de hasta 8, con un rendimiento reportado del 95%. Es así que dichos FOS que provienen directamente de la hidrólisis del producto de nuestro objeto de estudio, SacB, representan posibles moléculas aceptoras que pueden ser incorporadas en el mecanismo de elongación.

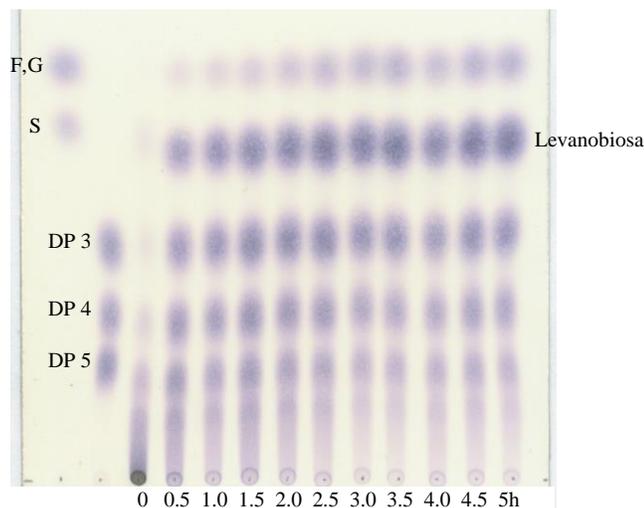


Fig. 25 Análisis en TLC de la evolución en la hidrólisis de LevanB catalizada por LevB de *B. licheniformis*. Estándares: fructosa (F), glucosa (G), sacarosa (S), 1-kestosa (DP3), nistosa (DP4) y f-nistosa (DP5).

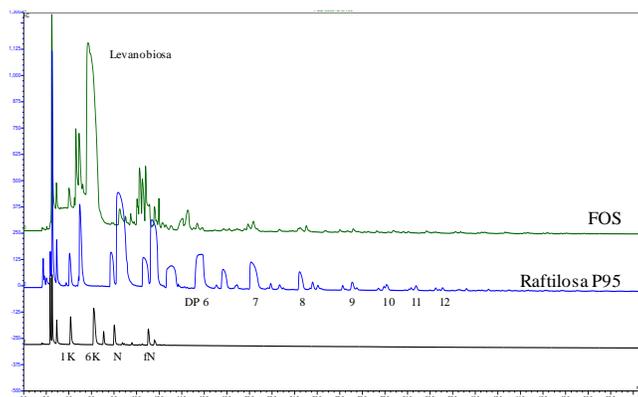


Fig. 26 Perfil cromatográfico de los FOS producto de la hidrólisis de LevanB y su comparación con estándares. Fructosa (F), glucosa (G), sacarosa (S), 1- y 6-kestosa (DP3), nistosa (DP4) y f-nistosa (DP5).

En la Fig. 25 se observa la evolución de la hidrólisis de LevanB catalizada por la endolevanasa de *B. licheniformis*, en ella se determinó que después de 3 h de reacción, bajo las condiciones indicadas en la sección 4.6.2, se completa la hidrólisis de la levana obteniéndose FOS de distinto GP, cuyo producto mayoritario lo constituye un compuesto

con factor de retención (R_f) entre la sacarosa y la 1-kestosa, que muy posiblemente se trate de levanobiosa (β -D-Fru-(2-6)- α -D-Fru). El perfil de HPAEC-PAD mostrado en la Fig. 26 muestra los distintos FOS presentes en el hidrolizado de LevanB: la levanobiosa constituye el producto mayoritario, después de ella predominan los FOS de DP 3,4 y 5 y en menor proporción DP 6,7 y 8.

Debe tenerse en cuenta que la endolevanasa realiza cortes hidrolíticos en enlaces internos de la cadena de levana, por lo que la gran mayoría de sus productos serán cadenas de fructosa y en menor proporción FOS con glucosa terminal. El análisis en HPLC de la hidrólisis total de los FOS indicó que la mezcla está conformada por 91% de FOS y 9% de fructosa libre, además de registrarse una relación fructosa/glucosa de 41 (por cada glucosa existen 41 moléculas de fructosa en los FOS sintetizados).

5.3.2 Incorporación de FOS en el medio de reacción

Para comenzar a evaluar el efecto de la incorporación de los FOS en el medio de reacción como moléculas aceptoras, se desarrolló una serie de experimentos en condiciones de reacción estándar (1U/mL de SacB, 100 g/L de sacarosa y 37°C) en los que se varió la cantidad inicial de FOS (5, 10 y 20 mg/mL). Como control se incubó cada concentración de FOS ensayada con SacB sin la adición de sacarosa durante el mismo tiempo de reacción de los experimentos (5 h), en todos los controles no hubo reacción alguna.

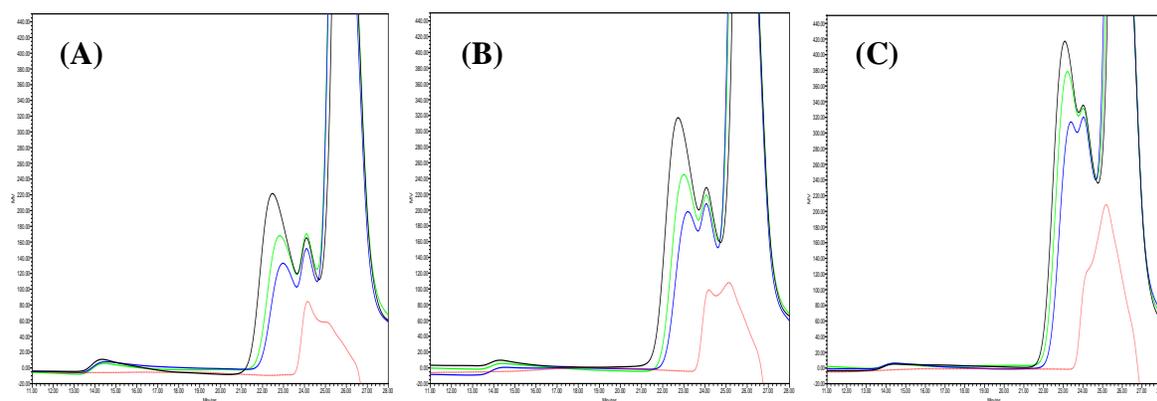


Fig. 27 Evolución del perfil de levanas sintetizadas en la reacción de SacB con 100 g/L de sacarosa y 5(A), 10(B) y 20 mg/mL de FOS(C). La línea punteada corresponde al perfil del control a las 5h de cada condición.

Las tres concentraciones de FOS ensayadas favorecieron la síntesis de LevanB en detrimento de LevanA (Fig. 27), además se observa que entre mayor fue la concentración de FOS mayor fue el nivel de LevanB alcanzado. La comparación de los perfiles alcanzados a las 5 h de reacción (Fig. 28) muestra el incremento sustancial de LevanB comparada con su nivel en ausencia de FOS, además es observable la eliminación de la síntesis de LevanA cuando se añadieron los FOS al medio de reacción. Nuevamente estamos ante un fenómeno que favorece la síntesis exclusiva un tipo de levana, lo que refuerza la idea del desarrollo de dos procesos separados para la elongación de los dos tipos de levana sintetizada por SacB.

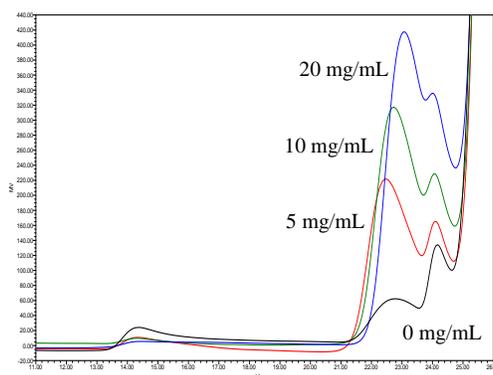


Fig. 28 Comparación de los perfiles de levanas sintetizados a tiempos finales de reacción (5 h) para cada concentración de FOS inicial.

Como se puede observar en la Tabla 2, hubo un aumento en el porcentaje de conversión alcanzado por las reacciones con FOS, este aumento fue el mismo para las tres concentraciones de FOS ensayadas. Además, también se incrementó el porcentaje de transferencia, aparentemente el mismo aumento para las tres concentraciones de FOS.

Tabla 2. Porcentajes de conversión, hidrólisis y transferencia a tiempos finales de reacción (5 h)

[FOS]	%Conversión	%Hidrólisis	%Transferencia
0	68.56%	55.46%	44.54%
5 mg/mL	81.71%	39.55%	60.45%
10 mg/mL	84.93%	28.32%	71.68%
20 mg/mL	83.48%	33.53%	66.47%

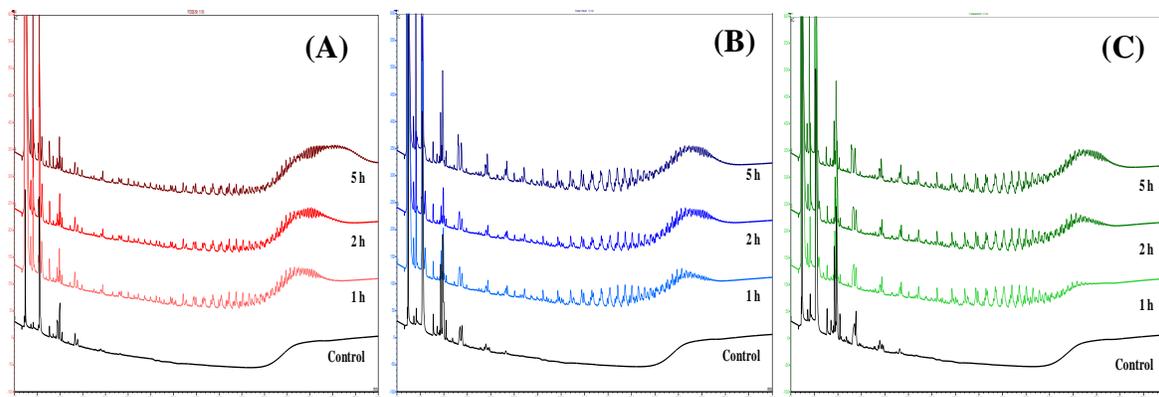


Fig. 29 Evolución del perfil de oligosacáridos sintetizados en la reacción de SacB con 100 g/L de sacarosa y 5(A), 10(B) y 20 mg/mL de FOS(C).

Los perfiles de oligosacáridos generados durante las reacciones indican que los FOS añadidos al medio de reacción no están siendo utilizados por SacB. Como ya se había mencionado los controles no mostraron reacción alguna, de modo que el perfil de los FOS permanece intacto después de las 5 h de incubación con SacB y ese mismo perfil no cambia durante las reacciones en presencia de sacarosa.

Resulta evidente que la adición de FOS al medio de reacción de SacB genera un efecto que favorece la no procesividad que desemboca en la producción de LevanB, sin embargo este efecto no es debido a que los FOS actúen como moléculas aceptoras, puesto que como se vio, ellos no se ven modificados durante la reacción. Este fenómeno complementa lo observado al añadir albúmina al medio de reacción de SacB, de modo que en términos generales la adición de agentes externos en una reacción catalizada por SacB es capaz de inhibir en cierta medida la maquinaria de elongación que da lugar a LevanA, esto probablemente mediante interacciones no covalentes proteína-proteína y/o proteína-carbohidrato.

Por último, el hecho de que los FOS producto de la hidrólisis de LevanB no constituyan propiamente moléculas aceptoras inherentes a la reacción de SacB puede deberse a que la mezcla contiene mayoritariamente cadenas de fructosa sin glucosa terminal, y por tanto sin extremo no reductor. Se ha reportado para la β -fructosidasa SacC de *B. subtilis*, la

cual es específica para la hidrólisis de levana, un módulo de unión a carbohidrato no catalítico que une los extremos no reductores de las levanas que hidroliza, lo que le confiere a SacC una alta especificidad hacia sus sustratos (Cuskin y col., 2012). Lo anterior en el caso de SacB denotaría que la glucosa terminal de las cadenas de levana juega un papel importante en la afinidad de la enzima por las moléculas aceptoras e incluso un papel importante en el mecanismo de elongación.

CONCLUSIONES

Las condiciones de reacción pueden dar lugar a una diferente especificidad de SacB. De las condiciones de reacción estudiadas la concentración de enzima es la que muestra un efecto determinante en el perfil de productos. Una concentración enzimática intermedia sintetiza simultáneamente LevanA y LevanB. Por el contrario altas y bajas concentraciones de enzima modifican la bimodalidad y producen un solo tipo de levana cuyo PM se relaciona inversamente con la concentración enzimática. Se demostró además, que este efecto no se debe a elementos cinéticos, ni a elementos estructurales asociados a una posible agregación de la enzima. En cambio, interacciones no covalentes y no específicas pueden ser las responsables de la modificación en la especificidad de SacB.

Por su parte, la concentración de sustrato no afecta la distribución de PM de las levanas sintetizadas por SacB. Sin embargo, esta condición adquiere mayor importancia debido a que el aumento de sustrato disponible y su concomitante incremento de los tiempos de reacción permitieron observar el sucesivo alargamiento de LevanB a lo largo de la reacción.

Con respecto a la tercera condición de reacción estudiada, la temperatura, su mayor efecto radica en la disminución de la relación H/T (aumento de la transferencia) cuando la reacción se desarrolla a bajas temperaturas, sin generar un cambio mayor en los perfiles de productos de SacB.

Las evidencias reunidas indican que la formación de LevanB y LevanA se lleva a cabo por procesos separados y posiblemente mecanismo diferentes, y que las condiciones de reacción pueden favorecer uno u otro proceso. Más aún, la cinética de alargamiento observada en la síntesis de LevanB y los múltiples compuestos de distinto PM observados por HPAE-PAD que derivan en ella, evidencian un mecanismo de elongación no procesivo o multicadena. Mientras que para LevanA aún no es posible establecer con certeza un mecanismo específico.

Con respecto a la incorporación de FOS derivados de la hidrólisis de LevanB en la reacción de SacB, se concluye que estos no constituyen propiamente moléculas aceptoras inherentes a la reacción, sin embargo interaccionan de alguna forma con la enzima de forma que alteran su especificidad. Se hace necesario entonces la búsqueda de otros compuestos que funcionen verdaderamente como moléculas aceptoras.

PERSPECTIVAS

- Producción y evaluación de FOS obtenidos de otras fuentes que puedan actuar como moléculasceptoras inherentes a la reacción.
- Purificación de moléculasceptoras inherentes a la reacción con las cuales pueden plantearse estudios de afinidad que brinden información sobre la estructura de la enzima a nivel de subsitios de unión a sustrato así como del tipo de interacción enzima-molécula aceptora.
- Quedó de manifiesto que el estudio del mecanismo de elongación de LevanA debe llevarse a cabo mediante un enfoque estructural a través de otras metodologías que permitan la elucidación de su naturaleza procesiva o no procesiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Fattah A.M., Gamal-Eldeen A.M., Helmy W.A., Esawy M.A. (2012) Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. *Carbohydrate Polymers*, 89:314– 322.
- Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. (2009) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycomics. *Nucleic Acids Res.* 37: D233–D238.
- Castillo E. y López-Munguía A. (2004) Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. *Journal of Biotechnology*. 114: 209–217.
- Chambert R. y Petit-Glatron M. (1989) Study of the effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hidrolisis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Carbohydrate Research*, 191: 117-123.
- Chambert R., Treboul G., Dedonder R. (1974) Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem.* 41:285-300.
- Chuankhayan P., Hsieh C.Y., Huang Y.C., Hsieh Y.Y., Guan H.H., Hsie Y.C., Tien Y.C., Chen C.D., Chiang C.M., and Chen C.J. (2010) Crystal Structures of *Aspergillus japonicus* Fructosyltransferase Complex with Donor/Acceptor Substrates Reveal Complete Subsites in the Active Site for Catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*. 285:30, pp. 23251-23264.
- Cuskin F., Flint J. E., Gloster T.M., Morland C., Baslé A., Henrissat B., Coutinho P.M., Strazzulli A., Solovyova A.S., Davies G.J., Gilbert H.J. (2012) How nature can exploit nonspecific catalytic and carbohydrate binding modules to create enzymatic specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 18;109(51):20889-94.
- Davies G.L., Wilson K.S. and Henrissat B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 321, 557-559.
- Doelle H.W., Kirk L., Crittenden R., Toh H., Doelle M.B. (1993) *Zymomonas mobilis*. Science and industrial application. *Crit Rev Biotechnol* 13:57-98.
- Euzenat O., Guibert A. & Combes D. (1997) Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochem.* 32, 237–243.
- Fair, Justin D. y Kormos, Chad M. (2008) Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data. *Journal of Chromatography A.*, 1211: 49–54.
- Goldman D., Lavid N., Schwartz A., Shoham G., Danino D., and Shoham Y. (2008) Two Active Forms of *Zymomonas mobilis* Levansucrase. *The journal of biological chemistry*. 283:47, pp. 32209–32217.

- Hernandez L., Arrieta J., Menendez C., Vazquez R., Coego A., Suarez V., Selman G., Petit-Glatron M.F., Chambert R. (1995) Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem. J.* 309, 113-118.
- Holdgate G.A., Anderson M., Edfeldt F., Geschwindner S. (2010) Affinity-based, biophysical methods to detect and analyze ligand binding to recombinant proteins: Matching high information content with high throughput. *Journal of Structural Biology*, 172:142–157.
- Homann A., Biedendieck R., Gotze S., Jahn D., Seibel J. (2007) Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: muta-genesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J* 407:189-198.
- Kilian S., Kritzinger S., Rycroft C., Gibson G., du Preez J. (2002) The effects of the novel bifidogenic trisaccharide, neokestose, on the human colonic microbiota. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 637–644. Korakli M., Pavlovic M., Ganzle M.G., Vogel R.F. (2003) Exopoly-saccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl Environ Microbiol* 69:2073-2079.
- Kim, K.H., Chung, C.B., Kim, Y.H., Kim, K.S., Han, C.S. and Kim, C.H. (2005). Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *J. Cosmetic Sci.* 56, 395–406.
- Kelly G. (2008) Inulin-Type Prebiotics – A Review: Part 1. *Alternative Medicine Review*. Volume 13, Number 4.
- Kralj S., Buchholz K., Dijkhuizen L. & Seibel, J. (2008) Fructansucrase enzymes and sucrose analogues: A new approach for the synthesis of unique fructo-oligosaccharides. *Biocatalysis and Biotransformation*. 26(1-2): 32-41.
- Kulminskayaa, Anna A.; Arandb, Michael; Eneyskayaa, Elena V.; Ivanena, Dina R.; Shabalina, Konstantin A.; Shishlyannikova, Sergei M.; Saveliev, Andrew N.; Korneevad, Olga S.; Neustroeva, Kirill N. (2003) Biochemical characterization of *Aspergillus awamori* exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1650:22– 29
- Marley J., Lu M. y Bracken C. (2001) A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *Journal of Biomolecular NMR*, 20: 71–75.
- Martinez-Fleites C., Ortiz-Lombardia M., Pons T., Tarbouriech N., Taylor E.J., Arrieta J.G., Hernandez L. and Davies G.J. (2005) Crystal structure of levansucrose from Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem. J.* 390, 19-27.
- Meng G. & Fütterer K. (2003) Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Natural Structural Biology*. 10:11, 935-941.

- Meng G. & Fütterer K. (2008). Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct. Biol.* 8, 16–27.
- Moulis, C., Joucla, G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., & Remaud-Simeon, M. (2006). Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *The Journal of biological chemistry*, 281(42), 31254–67.
- Nakapong S., Pichyangkura R., Ito K., Iizuka M. y Pongsawasdi P. (2013) High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 54: 30–36.
- Nobbmann U., Connah M., Brendan P., Varley P., Gee C., Mulot S., Chen J., Zhou L., Lu Y., Sheng F., Yi Y., Harding S. (2007) Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. Vol. 24: 117-128.
- Ortiz-Soto M.E. (2008) Obtención de biocatalizadores a partir de variantes de la levansacarsa de *Bacillus subtilis* con nuevas propiedades de transfructosilación. *Tesis de doctorado*. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Ortiz-Soto M.E., Rivera M., Rudiño-Piñera E., Olvera C. y López-Munguía A. (2008) Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering, Design & Selection* vol. 21 no. 10 pp. 589–595.
- Ozimek L.K., Kralj S., van der Maarel M.J., Dijkhuizen L (2006) The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglyco-sylation reactions. *Microbiology* 152:1187-1196.
- Pijning T., Anwar M.A., Böger M., Dobruchowska J.M, Leemhuis H., Kralj S., Dijkhuizen L. and Dijkstra B.W. (2011) Crystal Structure of Inulosucrase from *Lactobacillus*: Insights into the Substrate Specificity and Product Specificity of GH68 Fructansucrases. *J. Mol. Biol.* 412:1, pp 80-93.
- Porras-Domínguez J. (2012) Obtención de Fructo-oligosacáridos a partir de levanas bacterianas mediante el uso de endolevanasas. *Tesis de maestría*. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Praznik W., Loeppert R., Zangger K. y Huber A. (2012) Separation and Identification of Fructooligomers: Combination of Preparative SEC and rpHPLC followed by GC/FID Analysis. 37th International Fructan Symposium, 2-6 July 2012, St Jean-le-Thomas, France. Presentación oral de : Werner Praznik
- Ritsema T. & Smeekens S. (2003) Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biolog.* Volume 6, Issue 3. Pags. 223-230.

- Roberfroid M. B. (2007) Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr.*, 137(11 Suppl):2493S-2502S.
- Sangiliyandi G. y Gunasekaran P. (2001) Polymerase and hydrolase activities of *Zymomonas mobilis* levansucrase separately modulated by in vitro mutagenesis and elevated temperature. *Process Biochemistry*. 36: 543–548.
- Seibel J., Moraru R. & Götze S. (2005) Biocatalytic and chemical investigations in the synthesis of sucrose analogues. *Tetrahedron*, 61:7081–7086.
- Soon Ah Kang, Ki-Hyo Jang, Jeong-Woo Seo, Ki Ho Kim, Young Heui Kim, Dina Rairakhwada, Mi Young Seo, Jae Ok Lee, Sang Do Ha, Chul-Ho Kim y Sang-Ki (2009) Levan: Applications and Perspectives. En Bernad, H.A.R. (ed.). *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors*, Caister Academic Press.
- Stevens Jr, William C. y Hill, Daniel C. (2009) General methods for flash chromatography using disposable columns. *Mol Divers*, 13:247–252.
- Strube C.P., Homann A., Gamer M., Jahn D., Seibel J. y Heinz D.W. (2011) Polysaccharide Synthesis of the Levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* Is Controlled by Distinct Surface Motifs. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 286, No. 20, pp. 17593–17600.
- Tanaka T., Oi S., Iizuka M., Yamamoto, T. (1978) Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42 (2), pp. 323-326.
- Tanaka T., Oi S., Yamamoto T. (1979) Synthesis of levan by levansucrase. Some factors affecting the rate of synthesis and degree of polymerization of levan. *Journal of Biochemistry*. 85(1):287-293.
- Tanaka T, Oi S, Yamamoto T. (1980) Molecular-structure of low and high molecular-weight levans synthesized by levansucrase. *Journal of Biochemistry*, 87(1):297-303.
- Ulloa JA, Espinosa-Andrews H, Cruz-Rodríguez GK, Rosas-Ulloa P, Ulloa-Rangel BE, Ramírez-Ramírez JC (2010) Los fructanos y su papel en la promoción de la salud. *Revista Fuente Año 2*, No. 5.
- Van de Wiele T., Boon N., Possemiers S., Jacobs H. y Verstraete W. (2007) Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 452–460.
- Xu Y., Yan Y., Seeman D., Sun L. y Dubin P.L. (2012) Multimerization and Aggregation of Native-State Insulin: Effect of Zinc. *Langmuir* 10; 28(1):579-86.
- Yuan S, Le Roy K, Venken T, Lammens W, Van den Ende W, et al. (2012) pKa Modulation of the Acid/Base Catalyst within GH32 and GH68: A Role in Substrate/Inhibitor Specificity? *PLoS ONE* 7(5): e37453. doi:10.1371/journal.pone.0037453.

Żary-Sikorska E. y Juśkiewicz J. (2008) Effect of fructanas with different degrees of polymerization on bacterial enzymes activity, lipid profile and antioxidant status in rats. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* Vol. 58, No. 2, pp. 269-272.