



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Bases moleculares del mecanismo de elongación
de levanas de SacB de *Bacillus subtilis*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
I.Q. ENRIQUE RAGA CARBAJAL

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. CLARITA OLVERA CARRANZA
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. LILIANA PARDO LÓPEZ
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)
DR. CARLOS AMERO TELLO
[Centro de Investigaciones Químicas, UAEM](#)

Cuernavaca, Mor. Febrero, 2019



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Enzimas (Lab. 3) y en el Laboratorio de Investigación en Programas Institucionales 3 (LinPi-3), ambos pertenecientes al Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Clarita Olvera Carranza.

La realización de este proyecto estuvo financiada por la UNAM en el marco del proyecto PAPIIT No. IN213616 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) dentro de los proyectos CONACYT No. 219728, CONACyT-BMBF No. 267620 y la beca doctoral No. 420196/261902 (CVU/Becario).

Dedicatoria

A mi madre, mi mayor ejemplo de dedicación y perseverancia. Por todo el amor y con todo mi amor, gracias mamá.

A mi padre, por todo el apoyo y enseñanzas que me ha compartido. Gracias papá.

A la memoria de mis abuelitos Ángel, Enrique y Margarita; y a mi abuelita Socorro, que siempre quiso que llegara a ser doctor, aunque no precisamente uno en Ciencias.

Agradecimientos

A la Dra. Clarita Olvera por recibirme y guiarme en este largo trayecto, por todo el apoyo y toda la confianza, y por todas las enseñanzas profesionales y humanas que me ha brindado.

Al Dr. Agustín López-Munguía por sus valiosas aportaciones a mi trabajo y a mi formación, por las enriquecedoras discusiones de trabajo, un honor haber estado y aportado en su grupo.

A la Dra. Marcela Ayala por recibirnos y permitirnos construir junto con ella un gran grupo de investigación.

A los miembros del comité tutorial: Dra Liliana Pardo y Dr. Carlos Amero, por su valiosa guía en la realización de este trabajo.

A los integrantes del jurado: Dra. Romina Rodríguez, Dra. Claudia Martínez, Dr. Enrique Rudiño, Dr. Iván Martínez-Duncker y Dr. Gerardo Corzo, por sus comentarios y observaciones que enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Mercedes López, Dra. Erika Mellado y M.C. María de Jesús Alvarado por recibirme en el CINVESTAV-Irapuato y guiarme en la realización de los estudios de permetilación y GC-MS.

A la Dra. Laura Álvarez y M.C. Silvia Marquina del CIQ-UAEM por su colaboración en el estudio de los FOS a través de RMN.

Al Dr. Enrique Rudiño, Dra. Adelaida Díaz y Biol. Sonia Rojas por su colaboración en la obtención del complejo cristalográfico SacB-oligosacáridos.

A Fernando González por su apoyo y enseñanzas en la utilización de los equipos de HPLC y a la Biol. Rosa Román por su ayuda técnica.

A la T.L. Aurelia Ocampo y Judith Uribe en el Lab. 3, así como a la T.L. Olegaria Benitez y Dagoberto Romero en el LinPi3, por su importante labor dentro de los laboratorios.

Al Lic. Antonio Bolaños y Gloria Villa de la Unidad de Docencia por su muy amable atención en múltiples trámites administrativos y al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por los apoyos concedidos para la asistencia a congresos.

A los miembros de los grupos ALM (Lab3) y COC (LinPi3) por todas las ideas, frustraciones y logros compartidos en el laboratorio y todos los gratos momentos fuera de él.

Y un agradecimiento especial a doña Au y a don Mario por su valioso apoyo humano y excelente sazón, gracias infinitas.

Índice

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Índice.....	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tablas.....	ix
Abreviaturas.....	x
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1. Generalidades	4
1.1. Fructanas.....	4
1.1.1 Propiedades y Aplicaciones.....	6
1.2 Fructosiltransferasas.....	8
1.2.1 Estructura.....	9
1.2.2 Mecanismo de reacción.....	11
1.2.3 Mecanismos de elongación de productos.....	11
1.3 Levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i>	13
1.3.1 Elongación de levanas por SacB.....	14
1.3.2 Estudios de estructura función.....	15
1.4 Modelos de elongación de carbohidratos.....	16
Planteamiento del problema.....	19
Justificación.....	19
Hipótesis.....	20
Objetivos.....	20
Estrategia Experimental.....	21
CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos	22
2.1. Mutagénesis sitiodirigida.....	22
2.2. Producción de enzimas recombinantes.....	23
2.2.1. Expresión heteróloga.....	23
2.2.2. Purificación.....	24
2.3. Análisis de proteínas.....	24
2.3.1. Cuantificación de Proteína.....	24
2.3.2. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).....	25
2.4. Ensayo enzimático estándar.....	25
2.5. Producción y purificación de fructooligosacáridos.....	26
2.5.1. Método Secuencial.....	26
2.5.2. Método Simultáneo.....	27
2.5.3. Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC).....	27
2.5.4. Cromatografía de Fase Reversa (rpHPLC).....	27
2.6. Análisis estructural de productos purificados.....	28
2.6.1. Derivatización de FOS a acetatos de alditol parcialmente metilados.....	28
2.6.2. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (GC-MS).....	28

2.6.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	29
2.7. Análisis del perfil de productos de las reacciones enzimáticas	29
2.7.1. Azúcares simples.....	29
2.7.2. Oligosacáridos.....	30
2.7.3. Polímeros.....	30
2.8. Co-cristalización y determinación de la estructura cristalina	31
CAPÍTULO 3. Purificación e Identificación de FOS tipo levana	34
3.1. Síntesis bi-enzimática de FOS tipo levana	34
3.2. FOS del método secuencial	35
3.3. FOS del método simultáneo	41
3.4. Efecto del sinergismo SacB/LevB en la síntesis de FOS tipo levana.....	46
3.5 CONCLUSIONES	47
CAPÍTULO 4. Estudio de aceptores inherentes al Mecanismo No Procesivo: Síntesis de LevanB.....	48
4.1 La síntesis de LevanB involucra distintas moléculas iniciadoras.....	49
4.1.1 Intermediarios Primarios: síntesis de levanas a partir de 1-kestosa y 6-kestosa	52
4.1.2 Intermediarios Secundarios: síntesis de levanas a partir de levánobiosa y blastosa	55
4.1.3 Neo-serie de levanas	60
4.2 Evaluación de aceptores de distinto grado de polimerización.....	63
4.3 CONCLUSIONES.....	68
CAPÍTULO 5. Estudio de aceptores inherentes al Mecanismo Procesivo: Síntesis de Levana.....	70
5.1 Mutante H243L, enzima específica para la síntesis de Levana.....	71
5.1.1 Efecto de la concentración de enzima y concentración de sustrato sobre la especificidad de producto	71
5.1.2 Generación no procesiva de oligosacáridos asociada a la síntesis de Levana.....	73
5.1.3 Información estructural	76
5.2 Evaluación de moléculasceptoras	77
5.3 CONCLUSIONES.....	80
CAPÍTULO 6. Identificación de sitios de interacción enzima-aceptor	82
6.1 Selección de residuos superficiales con posible participación en la unión con aceptores.....	82
6.2 Efecto de las mutaciones superficiales en la especificidad de productos	84
6.2.1 Propiedades de las interacciones enzima-aceptor con los residuos N242, K363 y Y237	88
6.3 Estructura cristalográfica del complejo SacB-oligosacáridos	91
6.3.1 Identificación de residuos involucrados en el sitio OB1	92
6.3.2 Identificación de residuos involucrados en el sitio OB2.....	96
6.4 Implicación de los subsitios de unión de la cavidad catalítica (sitio OB1) en el mecanismo de elongación de levanas.....	97
6.5 CONCLUSIONES	100
OBSERVACIONES FINALES	102
PROSPECTIVAS	104
ANEXOS	105
A. Secuenciación de DNA.....	105
B. GC-MS de FOS tipo levana.....	105

C. Espectros de RMN.....	105
D. Multi-alineamiento de secuencias de Levansacarosas.....	105
REFERENCIAS	134
PUBLICACIONES	141

Índice de Figuras

CAPÍTULO 1. Generalidades

Fig. 1.1 Estructura de la sacarosa y diferentes tipos de Fructanas.....	6
Fig. 1.2 Reacciones desarrolladas por las FTFs bacterianas.....	9
Fig. 1.3 Vistas ortogonales del plegamiento β -propela.....	10
Fig. 1.4 Representación del mecanismo de reacción	11
Fig. 1.5 Esquemas de los mecanismos de elongación Procesivo y No Procesivo propuestos para las FTFs	12
Fig. 1.6 Interacciones en los complejos SacB-sacarosa y SacB-rafinosa	16

CAPÍTULO 3. Purificación e Identificación de FOS tipo levana

Fig. 3.1 Comparación de los perfiles en HPAEC-PAD de los FOS obtenidos por los dos métodos del sistema bi-enzimático SacB/LevB1	35
Fig. 3.2 Separación mediante SEC de FOS obtenidos en el método bi-enzimático secuencial.....	36
Fig. 3.3 Separación en rpHPLC de los FOS del método bi-enzimático secuencial. Las fracciones Se2-Se7 corresponden a las recolectadas tras la separación en SEC.....	37
Fig. 3.4 Estructuras propuestas para los FOS derivatizados a PMAA y analizados por GC-MS	40
Fig. 3.5 Separación mediante SEC de FOS obtenidos en el método bi-enzimático simultáneo	41
Fig. 3.6 Comparación de los perfiles en HPAEC-PAD de las fracciones obtenidas durante la separación por SEC de los FOS del método bi-enzimático secuencial y simultáneo	42
Fig. 3.7 Perfil de elución en rpHPLC de las fracciones obtenidas en SEC para los FOS del método simultáneo.....	43
Fig. 3.8 Análisis en GC-MS del producto Si2-C (Ercosa).....	44
Fig. 3.9 Análisis en HPAEC-PAD y GC-MS de FOS exclusivos del método simultáneo	45

CAPÍTULO 4. Estudio de aceptores inherentes al Mecanismo No Procesivo: Síntesis de LevanB

Fig. 4.1 Síntesis no procesiva de LevanB monitoreada por GPC y HPAEC-PAD.....	48
Fig. 4.2 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante la síntesis no procesiva de levanas desarrollada por SacB	49
Fig. 4.3 Cinética de formación de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos durante la síntesis de LevanB.....	50
Fig. 4.4 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante las reacciones de aceptor de 1-kestosa y 6-kestosa.....	53
Fig. 4.5 Espectros HSQC de 1,6-nistosa y 6,6-nistosa.....	54
Fig. 4.6 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante las reacciones de aceptor de blastosa y levanobiosa.....	56
Fig. 4.7 Espectros HSQC de blastotriosa y levanobiosa.....	57
Fig. 4.8 Espectro HSQC de Ercosa.....	58
Fig. 4.9 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante la reacción de aceptor de neo-kestosa y reacción control.....	60
Fig. 4.10 Espectro HSQC de 6-neo-nistosa.....	61
Fig. 4.11 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante la reacción de aceptor de 6-neo-nistosa y reacción control de 6-neo-nistosa como sustrato único	62
Fig. 4.12 Comparación de los perfiles iniciales y finales de la incubación de FOS con SacB (HPAEC-PAD)	64
Fig. 4.13 Evolución en el perfil de oligosacáridos en la reacción de aceptor de los FOS DP2	64

Fig. 4.14 Evolución en el perfil de oligosacáridos en las reacciones de aceptor de FOS de distinto DP	65
Fig. 4.15 Relación H/T y GPC de reacciones de aceptor.....	66
Fig. 4.16 Efecto del DP de los aceptores en las velocidades iniciales de reacción desarrolladas por SacB.....	67
Fig. 4.17 Diagrama de los iniciadores e intermediarios involucrados en la síntesis no procesiva de LevanB desarrollada por la levansacarasa de <i>Bacillus subtilis</i>	68
CAPÍTULO 5. Estudio de aceptores inherentes al Mecanismo Procesivo: Síntesis de LevanA	
Fig. 5.1 Síntesis procesiva de LevanA monitoreada por GPC y HPAEC-PAD.....	70
Fig. 5.2 Relación H/T y evolución del perfil de levanas en reacciones de H243L con 100 g/L de sacarosa empleando dos diferentes concentraciones de enzima	72
Fig. 5.3 Relación H/T y evolución del perfil de levanas en reacciones de H243L con 400 g/L de sacarosa empleando dos diferentes concentraciones de enzima.	72
Fig. 5.4 Perfil de oligosacáridos en HPAEC-PAD generados durante la síntesis exclusiva de LevanA desarrollada por SacB y H243L.....	74
Fig. 5.5 Oligosacáridos formados durante la síntesis exclusiva de LevanA desarrollada por SacB.	74
Fig. 5.6 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante la formación de LevanBB desarrollada por H243L	75
Fig. 5.7 Localización de los residuos H243 y F231 en la estructura cristalográfica de SacB (PDB: 3BYN).....	76
Fig. 5.8 Comparación del perfil en GPC obtenido en la reacción de H243L adicionada con distintos aceptores.....	77
CAPÍTULO 6. Identificación de sitios de interacción enzima-aceptor	
Fig. 6.1 Regiones superficiales con posible participación en la unión de ligandos	83
Fig. 6.2 Ubicación superficial de los residuos seleccionados con posible participación en la unión a aceptores.....	84
Fig. 6.3 Actividad específica relativa de las mutantes de SacB. Actividad global medida a través de la liberación de azúcares reductores.....	85
Fig. 6.4 Perfil de polímeros sintetizados por las variantes de SacB en la Condición de reacción No. 1: 0.1 μ M de enzima, 100 g/L de sacarosa, 37 °C, pH6.....	85
Fig. 6.5 Perfil de polímeros sintetizados por las variantes de SacB en la Condición de reacción No. 2: 1 μ M de enzima, 100 g/L de sacarosa, 37 °C, pH6.....	86
Fig. 6.6 Perfil de oligosacáridos sintetizados por las variantes de SacB	87
Fig. 6.7 Perfiles de levanas generados a niveles de conversión arriba del 95% por las mutantes superficiales de SacB, con y sin adición de moléculasceptoras de DP16.	89
Fig. 6.8 Perfiles de oligosacáridos generados por las mutantes superficiales de SacB, con y sin adición de moléculasceptoras de DP16 (LevanBB).....	89
Fig. 6.9 Estructura cristalográfica del complejo SacB-oligosacáridos (PDB: 6N3M).....	92
Fig. 6.10 Vista estéreo de las interacciones entre SacB y levanohexaosa.....	93
Fig. 6.11 Esquema de las interacciones enzima-ligando presentes en el sitio OB1 del complejo SacB-oligosacárido	93
Fig. 6.12 Superposición de los residuos y ligandos localizados en los subsitios -1, +1 , +2 , +3 y +4 del sitio activo en los complejos SacB-sacarosa, SacB-rafinosa, SacB-levanohexaosa y SacB forma Apo	94
Fig. 6.13 Alineamiento de ligandos encontrados en el sitio activo de distintas fructosiltransferasas.....	96
Fig. 6.14 Residuos involucrados en el sitio OB2.....	97
Fig. 6.15 Ubicación superficial de los residuos involucrados en los subsitios de unión de sustrato +2, +3 y +4	98
Fig. 6.16 Secciones del multialineamiento de secuencias de levansacarasa	99
Fig. 6.17 Comparación de la superficie de distintas levansacarasa	100

Índice de Tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis sitio-dirigida	22
Tabla 2. Datos de recolección, procesamiento y resolución de la estructura cristalográfica	32
Tabla 3. Porcentaje (%) y número (n) por molécula de residuos β -D-fructosa y α -D-glucosa de los FOS del método secuencial.....	38
Tabla 4. PMAAs identificados en la derivatización del compuesto Si2-C (Ercosa)	44
Tabla 5. PMAA identificados en la derivatización de las fracciones de Se3-B, Si3-B, Si4-B y blastosa.....	45
Tabla 6. Velocidades iniciales de las reacciones (global, transferencia e hidrólisis) de SacB y sus variantes con y sin adición de las moléculasceptoras DP16.	90

Abreviaturas

FOS	Fructooligosacáridos
DP	Grado de Polimerización
PM	Peso Molecular
FTF	Fructosiltransferasa
LS	Levansacarasa
IS	Inulosacarasa
LevanA	Levana de alto peso molecular (2300 kDa)
LevanB	Levana de bajo peso molecular (7.2 kDa)
LevanBB	Levana de bajo peso molecular (3.3 kDa)
PMAA	Acetatos de alditol parcialmente metilados
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio aniónico con detección de pulso amperométrico
TLC	Cromatografía en capa fina
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
rpHPLC	Cromatografía de fase reversa
GPC	Cromatografía de permeación en gel
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas
TIC	Cromatograma de corriente iónica total
RMN	Resonancia magnética nuclear

Resumen

La levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis* es una enzima que sintetiza polímeros de fructosa con enlaces β 2-6, denominados levanas, a partir de sacarosa. Se ha propuesto que SacB genera levanas de alto (>2000 kDa) y bajo peso molecular (7.2 kDa) a través de dos procesos distintos que involucran mecanismos de elongación procesivo y no procesivo, respectivamente. Con el fin de contribuir a un mejor entendimiento de estos procesos biosintéticos, este trabajo se centró en la identificación y caracterización de los diferentes productos intermediarios, así como de los elementos estructurales partícipes en la elongación de levanas. Para ello, se estableció un sistema cromatográfico preparativo 2D (SEC + rpHPLC) que permitió la generación de un catálogo de FOS tipo levana puros obtenidos a partir de un proceso bi-enzimático levansacarasa/endolevanasa. Dentro de este catálogo, se identificaron productos con grados de polimerización entre 2 y 7 que además de poseer fructosas con enlaces β 2-6 incluyen glucosa inicial, enlaces β 2-1 y/o ramificaciones. Posteriormente, FOS de distinto tamaño y estructura fueron evaluados como moléculas aceptoras dentro de la elongación procesiva y no procesiva de levanas. Una minuciosa inspección de los perfiles de productos a través de HPAEC-PAD, así como el aislamiento y análisis en RMN de algunos productos relevantes, permitieron la identificación de series de levanas que tienen como iniciadores a la 1-kestosa, 6-kestosa, neo-kestosa, blastosa y levanobiosa. A partir de esto, se estableció la red de reacciones de transferencia e intermediarios involucrados en la elongación no procesiva de levanas. Finalmente, se obtuvo la estructura cristalográfica de SacB en complejo con oligosacáridos tipo levana, revelando dos sitios de unión, uno al interior de la cavidad catalítica central (sitio OB1) y otro en una región superficial cercana (sitio OB2). Dentro del sitio OB1 se identificaron 5 subsitios de unión a aceptores con la participación de seis residuos en los subsitios superiores +2, +3 y +4. La mutagénesis sitio-dirigida de algunos de estos residuos condujo a la obtención de variantes de SacB productoras de oligosacáridos de tamaño limitado pero capaces aun de generar un polímero de alto peso molecular. Esto señala la importancia de las interacciones del sitio OB1 para la síntesis no procesiva de levanas y supone la existencia de una vía diferente para la elongación procesiva. Los resultados, además de ayudar a entender las interacciones que ocurren entre SacB y los productos intermediarios durante la formación de levanas, permitieron la generación de “levanas a la medida” (de distintos tamaños), que podrían tener propiedades distintas y ser empleadas en las industrias alimenticia, farmacéutica o cosmética a conveniencia.

Introducción

Las fructosiltransferasas (FTFs) catalizan la transferencia de grupos fructosilo a partir de la sacarosa, lo que les permite sintetizar fructanas, productos constituidos por una molécula de glucosa y varias unidades de fructosa. Las fructanas han atraído el interés de distintos grupos de trabajo debido a sus múltiples propiedades y aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Kang, Jang, Seo, & Kim, 2009; Roberfroid, 2007). Existen fructanas con características distintas debido a las diferentes especificidades que existen entre las FTFs que las sintetizan, una de esas características es el tipo de enlace glicosídico que las conforman, el cual puede ser β -2,1 (para las fructana tipo inulina) o β -2,6 (para las de tipo levana). Por otra parte, el grado de polimerización (DP) es variado, encontrándose FTFs cuyos productos tienen DP menor a 10, denominados fructooligosacáridos (FOS), y otras que generan polímeros con DP de hasta miles. Esta característica es importante puesto que puede definir en gran medida las propiedades y aplicaciones del producto.

La elongación que lleva a cabo una enzima sobre sus productos poliméricos puede desarrollarse mediante un mecanismo procesivo, cuando la transferencia de unidades monoméricas ocurre sucesivamente sobre una misma molécula que permanece asociada a la enzima; o mediante un mecanismo no procesivo, cuando la enzima libera a la molécula después de alargarla en una unidad, de modo que la elongación procede mediante múltiples ciclos de captación y liberación al medio de reacción de las moléculasceptoras (Ozimek, Kralj, van der Maarel, & Dijkhuizen, 2006). Diversos estudios en las FTFs han puesto de manifiesto la posibilidad de modificar el DP de sus productos mediante la selección de las condiciones de reacción o la mutación de residuos en los subsitios de unión a aceptores (Kralj, Buchholz, Dijkhuizen, & Seibel, 2008; Tanaka, Oi, & Yamamoto, 1979); sin embargo, el efecto de estas modificaciones sobre el mecanismo de elongación como tal y, en general, la base molecular que define dicho mecanismo permanecen esencialmente desconocidos.

Particularmente, en nuestro grupo de trabajo se ha estudiado la levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis*, que sintetiza dos distribuciones de levanas de distinto peso molecular (PM): una distribución de bajo PM (LevanB) con un promedio de 7.2 kDa y una distribución de alto PM (LevanA) de aproximadamente 2300 kDa. Recientemente el estudio del efecto de las condiciones de reacción en el mecanismo de reacción de esta levansacarasa ha mostrado

importantes evidencias con las cuales se ha propuesto que la síntesis de LevanA y LevanB ocurre por procesos separados y esquemas de elongación diferentes (Raga-Carbajal et al., 2016). Se observó que la síntesis de LevanB ocurre mediante un mecanismo no procesivo mientras que para la elongación de LevanA se propone el desarrollo de uno procesivo. Dichos estudios abrieron la puerta para la obtención de información mecanística sobre la síntesis de levanas desarrollada por SacB, aunque aún quedan múltiples interrogantes concernientes a la dinámica de elongación y los elementos estructurales involucrados.

El presente trabajo pretende explorar con un enfoque estructural el mecanismo de elongación de levanas de SacB de *B. subtilis* a través del estudio de las interacciones entre la enzima y sus moléculas aceptoras. De modo que la información reunida contribuya a la elucidación de las bases moleculares del accionar de SacB y en general de los procesos biosintéticos de las FTFs.

Capítulo 1

Generalidades

1.1. Fructanas

Las fructanas son oligo- y poli- sacáridos de fructosa derivados de la sacarosa sintetizados por un amplio espectro de bacterias Gram positivas y Gram negativas (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Zymomonas*, *Azetobacter*, *Arthrobacter*, *Rothiadento*, *Xanthomonas*, etc.), por varios hongos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pestaloptiosis*, *Myrotecium*) y por aproximadamente el 15% de especies de plantas de floración pertenecientes a las familias mono- y dicotiledóneas (Banguela & Hernandez, 2006). Estos homopolímeros cumplen funciones estructurales, de señalización, transporte y almacenamiento en plantas, mientras que en microorganismos se les han atribuido funciones biológicas tales como mejorar la asimilación de nutrientes y la resistencia contra estrés biótico y abiótico, permitir la formación de biofilms y facilitar la patogénesis (Peshev et al., 2013; Velázquez-Hernández et al., 2009).

Las fructanas tienen diferentes longitudes de cadena, que comprenden desde 3 hasta miles de unidades de fructosa. Los hongos sintetizan principalmente Fructooligosacáridos (FOS), esto es, fructanas con grados de polimerización (DP) entre 3 y 10, mientras que las plantas acumulan fructanas con DPs de 30 a 50, pudiendo ocasionalmente exceder los 200. En contraste, las fructanas en bacterias son consideradas las de mayor peso molecular (PM) en la naturaleza al poseer miles de unidades de fructosa (Banguela & Hernandez, 2006). Adicionalmente, las fructanas presentan una variedad estructural en términos del tipo de enlace que las componen. Particularmente, las fructanas de plantas pueden presentar estructuras intrincadas a diferencia de las fructanas bacterianas que poseen estructuras más uniformes. En este sentido, las fructanas pueden agruparse en inulinas, levanas, fructanas mixtas, y neo-series de fructanas (Vijn & Smeekens, 1999):

- Las inulinas consisten en cadenas lineales de fructosas unidas por enlaces $\beta(2-1)$ que contienen una glucosa inicial. El fructooligosacárido tipo inulina más pequeño es la 1-kestosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)-D-Glup], un trisacárido que contiene una fructosa unida al C1 del grupo fructosilo de la sacarosa.

- Las levanas, también referidas como *fleínas* en plantas, consisten principalmente en moléculas de fructosas unidas por enlaces $\beta(2-6)$. La molécula más pequeña de este tipo de fructanas es la 6-kestosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)-D-Glup], un trisacárido derivado de la adición de una molécula de fructosa sobre la posición C6 del residuo fructosilo de la sacarosa.
- Las fructanas mixtas, llamadas *graminanos* en plantas, contienen enlaces $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$ y por ello pueden contener muchos puntos de ramificación. La fructana ramificada de menor tamaño es la bifurcosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)-(β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-) β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)-D-Glup], un tetrasacárido que contiene una fructosa enlazada en sus carbonos C1, C2 y C6.
- Las neo-series de fructanas se caracterizan por tener una glucosa interna enlazadas en sus carbonos C1 y C6 sobre los que crecen cadenas que contienen enlaces $\beta(2-1)$ y/o $\beta(2-6)$, generándose neo-series de inulina o levana, también denominadas neo-inulinas o neo-levanas. La molécula más pequeña de esta serie es la neo-kestosa [β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)-(β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-)D-Glup].

Las inulinas lineales se encuentran normalmente en plantas dicotiledóneas de la familia Asteraceae, tales como la chicoria (*Chicorium intybus*) y la alcachofa (*Helianthus tuberosus*). En microorganismos, los FOS de tipo inulina son sintetizados comúnmente por hongos del género *Aspergillus*, mientras que inulinas de alto PM ($>10^6$ Da) se han reportado únicamente en bacterias de especies Gram positivas tales como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus reuteri* y *Leuconostoc citreum* (Banguela & Hernandez, 2006). Las levanas lineales se encuentran comúnmente en algunos pastos de la familia Poaceae (e.g. *Dactylis glomerata*), mientras que distintas levanas bacterianas también se han reportado como de alto PM con grados de ramificación entre el 5 y el 20% (Lindberg, Lönnngren, & Thompson, 1973; Tanaka, Oi, & Yamamoto, 1980). Las fructanas mixtas o graminanos se hallan en monocotiledóneas como el trigo (*Triticum aestivum*) y la cebada (*Hordeum vulgare*), las neo-series de inulinas se generan en plantas de las familias Alliaceae y Asparagaceae, como la cebolla (*Allium cepa*) y el espárrago (*Asparagus officinalis*), y las neo-levanas se han reportado en avena (Vijn & Smeekens, 1999). Estructuras complejas de fructanas que incluyen mezclas de graminanos y neo-fructanas ramificadas se han encontrado en plantas de los géneros Agave y Dasyliirion (e.g. *Agave tequilana*, *A. angustifolia*, *A. potarum*, *Dasyliirion spp*) lo que ha llevado a recategorizarlas como Agavinas debido a su alta diversidad estructural (Mancilla-Margalli & Lopez, 2006).

Adicionalmente, aunque muchas de las moléculas de fructanas consisten principalmente en residuos de fructosa unidos a una molécula de sacarosa como iniciadora (fructanas del

tipo GFn), existen fructanas de bajo DP que contienen únicamente moléculas de fructosa (fructanas del tipo Fn) con enlaces $\beta(2-1)$ ó $\beta(2-6)$ que se han aislado de plantas o se han sintetizado mediante la hidrólisis enzimática de fructanas de mayor tamaño (Ernst, Chatterton, & Harrison, 1996; Singh, Singh, & Kennedy, 2016; Timmermans et al., 2001). Dependiendo del tipo de enlace, este grupo de fructanas se denominan inulo-oligosacáridos u oligolevanas, siendo la inulobiosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)-D-Fruf] y la levanobiosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-D-Fruf], los disacáridos iniciales en cada una de estas series (Lewis, 1993b).

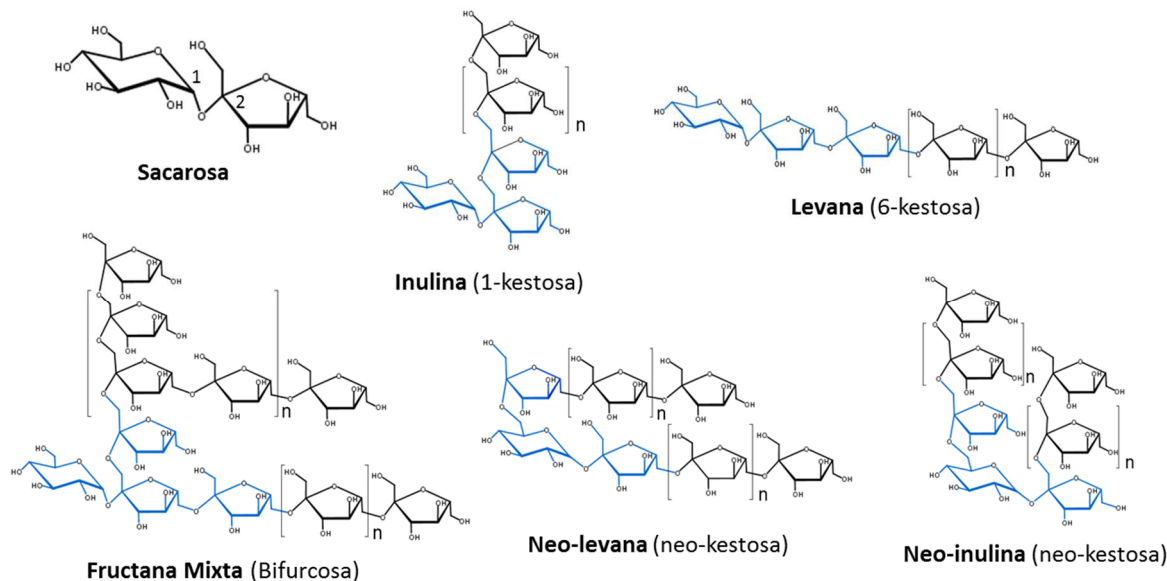


Fig. 1.1 Estructura de la sacarosa y diferentes tipos de Fructanas. Dentro de cada estructura se resalta en azul el fructooligosacárido precursor de cada serie, cuyo nombre se indica entre paréntesis.

1.1.1 Propiedades y Aplicaciones

Las fructanas poseen importantes propiedades que las han hecho objeto de estudio de diversos grupos de investigación. Debido a la configuración β del carbono anomérico C2 en sus monómeros de fructosa, las fructanas no son hidrolizables por las enzimas digestivas humanas y son capaces de llegar casi intactas al colon. Debido a esto, las fructanas son consideradas fibra dietética, con la capacidad de mejorar las funciones intestinales, particularmente la formación de heces y la motilidad intestinal. Además, son consideradas prebióticos dado que una vez en el colon, pueden ser selectivamente fermentadas por algunas bacterias intestinales, causando cambios significativos en la microbiota mediante el incremento del número de bacterias benéficas (bifidobacterias y lactobacilos) (Roberfroid, 2007). Adicionalmente, se considera que la ingesta de fructanas es benéfico para la salud debido a que tienen efectos hipoglucémico e hipocolesterolémico, mejoran la absorción de

minerales como el calcio y magnesio, reducen el riesgo de cáncer de colón, estimulan el sistema inmune e inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos (Di Bartolomeo & Van den Ende, 2015).

Se ha sugerido que las fructanas ejercen sus efectos benéficos vía mecanismos indirectos o directos. Los mecanismos indirectos involucran la estimulación del crecimiento selectivo de bacterias lácticas que fermentan las fructanas a ácidos grasos de cadena corta, siendo estos productos los que generen efectos inmuno-moduladores locales o sistémicos (Di Bartolomeo & Van den Ende, 2015; Reis et al., 2014). Por otro lado, dentro de los mecanismos directos se ha propuesto que las fructanas pueden ser reconocidas por las células dendríticas del intestino a través de receptores de tipo Toll (TL2, TL4), receptores de tipo NOD, de lectinas tipo C o galectinas, induciendo eventualmente citosinas pro- y anti-inflamatorias (Capitán-Cañadas et al., 2014; Vogt et al., 2015).

Además de las notables propiedades nutracéuticas, las fructanas pueden emplearse en alimentos funcionales como sustitutos de grasas o azúcares debido a su solubilidad y a que son edulcorantes no cariogénicos (Kelly, 2009). Dentro de las aplicaciones farmacéuticas, las fructanas pueden emplearse como estabilizador de proteínas durante el secado por aspersión o liofilización, como coadyuvante de vacunas o como sistema de liberación de fármacos debido a su capacidad de formar nanopartículas (Kim et al., 2015; Mensink et al., 2015; Tabernero et al. 2017). Por otro lado, se ha demostrado que las fructanas del tipo levana pueden ejercer excelentes efectos en la humectación de piel y alivio de piel irritada si son incorporadas como componentes en cosméticos (K. H. Kim et al., 2005).

El tamaño y estructura de las fructanas les brinda diferentes comportamientos fisicoquímicos y por tanto dicta su funcionalidad para diferentes aplicaciones. En este sentido, los FOS son preferidos como sustitutos de azúcar puesto que son más solubles y tienen entre 30-50% del poder edulcorante de la sacarosa (Kelly, 2009). Además, los FOS suelen tener una mejor actividad prebiótica e inmunomoduladora, sin embargo, las fructanas de mayor DP tienen mayor efecto antioxidante y pueden promover cambios benéficos en la microbiota más prolongados debido a su mayor estabilidad (Ito et al., 2011; Van De Wiele et al., 2007; Żary-Sikorska & Juśkiewicz, 2008). Las fructanas de alto PM ($>10^6$ Da) son preferiblemente empleadas como sustitutos de grasas debido a su menor solubilidad y a la ausencia de dulzor; y tienen aplicación como material de recubrimiento en formulaciones para liberación de fármacos y como surfactante de uso doméstico debido a sus excelentes propiedades tensoactivas (Kang et al., 2009). Adicionalmente, una estructuración más compleja, como lo es un alto grado de ramificación, también puede influir en las capacidades

prebióticas y antitumoral de las fructanas (Mueller et al., 2016; Yoon, Yoo, Cha, & Gyu Lee, 2004)

En la actualidad, solo algunas plantas tales como la chicoria (*Cichorium intybus*), alcachofa (*Helianthus tuberosus*), y más recientemente el agave (*Agave tequilana*), se emplean en la producción industrial de fructanas. Debido a esto los estudios científicos han estado enfocados principalmente en fructanas lineales del tipo inulina y no tanto en otros tipos de fructanas (Mueller et al., 2016). En particular, hay un creciente interés en las levanas bacterianas debido a su fácil generación, versatilidad y excelente biocompatibilidad, lo que las convierte en biopolímeros con gran potencial en las industrias de alimento, farmacéutica y cosmética; sin embargo, la falta de medios eficientes para su preparación son factores importantes que impiden su uso práctico (Öner, Hernández, & Combie, 2016).

1.2 Fructosiltransferasas

Las fructosiltransferasas (FTFs) son las enzimas responsables de la biosíntesis de fructanas y para ello catalizan la transferencia de un grupo fructosilo perteneciente a una molécula donadora (comúnmente la sacarosa) a otra molécula denominada aceptora, tal y como se indica en la siguiente ecuación:



En plantas, las fructanas son sintetizadas por la acción de dos o más diferentes FTFs y muestran una diversidad estructural mayor (Pollock and Cairns, 1991). En contraste, las bacterias requieren de únicamente una FTF, también denominada fructansacarasa, para la conversión de sacarosa en fructanas de alto grado de polimerización (Banguela and Hernández, 2006; Franken et al, 2013). Con base en el tipo de producto, se distinguen dos tipos de fructansacarasas bacterianas: inulosacarasas (ISs, sacarosa:2,1- β -D-fructan-1- β -D-fructosiltransferasa, EC 2.4.1.9) y levansacarasas (LSs, sacarosa:2,6- β -D-fructan-6- β -D-fructosiltransferasa, EC 2.4.1.10), capaces de sintetizar polímeros del tipo inulina y levana, respectivamente.

En presencia de únicamente sacarosa, las FTFs bacterianas son capaces de realizar dos reacciones: la transfructosilación, en la que se sintetizan las fructanas por transferencia del grupo fructosilo de la sacarosa hacia las cadenas en crecimiento; o bien, la hidrólisis de la sacarosa, en la que una molécula de agua actúa como aceptor y se genera fructosa libre (Fig. 1.2). Por otra parte, cuando se agrega una molécula aceptora ajena al medio de reacción (tales como algunos alcoholes primarios, monosacáridos o disacáridos), la enzima puede

transferirle el grupo fructosilo, dando lugar a un fructósido, en lo que se conoce como reacción de aceptor (Hestrin, Feingold, & Avigad, 1956; Seibel et al., 2006).

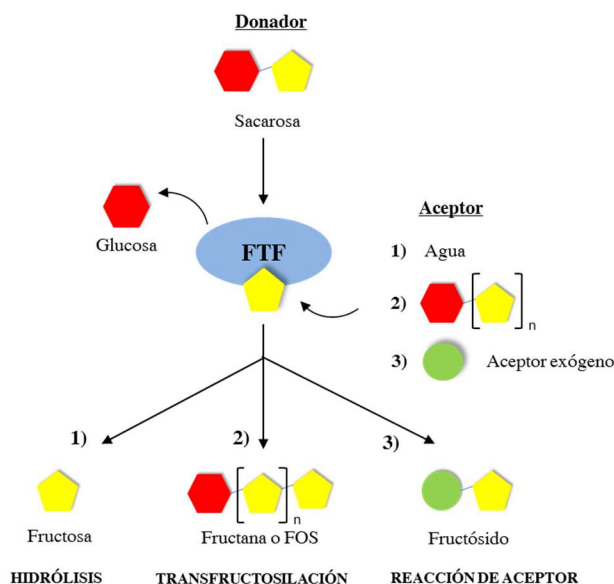


Fig. 1.2 Reacciones desarrolladas por las FTFs bacterianas.

1.2.1 Estructura

En el sistema de clasificación de enzimas activas sobre carbohidratos de la base de datos CAZY, las enzimas glucósido-hidrolasas (GH) se han dividido en 100 diferentes familias basadas en sus secuencias de aminoácidos (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). Derivado de similitudes en sus secuencias, las FTFs de plantas y hongos se han incluido dentro de la familia GH32, mientras que FTFs bacterianas (inulo- y levansacarasas) se incluyen en la familia GH 68. En esta misma clasificación, las familias relacionadas evolutiva, estructural y mecanísticamente se agrupan en clanes. De esta forma, las familias GH32 y GH68 comprenden el clan GH-J. Los miembros de este clan poseen un plegamiento tipo β -propela y emplean tres residuos catalíticos idénticos referidos como *triada catalítica* (dos residuos Asp y un Glu) dentro de un mecanismo de reacción con retención de configuración (Hijum, Kralj & Ozimek, 2006).

Actualmente se encuentra disponible la estructura cristalográfica de cuatro LSs de *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, y *Erwinia amylovora* y de la IS de *Lactobacillus johnsonii* NCC533. Las estructuras de estas proteínas muestran el 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. 1.3). Las 5 hojas beta, adoptan una topología clásica “W” de 4 hebras β anti-paralelas (Martínez-Fleites et al., 2005; Meng & Fütterer, 2003; Pijning et al., 2011; Strube et al., 2011; Wuerges et al., 2015).

De acuerdo a Davies, Wilson, & Henrissat (1997) la cavidad catalítica puede ser dividida para su análisis en subsitios de unión a sustrato con base en la ruptura del enlace glicosídico de la sacarosa, de 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 los subsitios de unión a sustrato -1, +1, +2 se ha logrado gracias a las estructuras 3D de la LS de *B. subtilis* en complejo con sacarosa y con rafinosa (Meng & Fütterer, 2003, 2008). 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). El subsitio -1 es altamente específico para la unión de unidades de fructosa, mientras que el +1 es más flexible, permitiendo la unión tanto de sustratos donadores (sacarosa y rafinosa) como de distintos aceptores monosacáridos (manosa, galactosa, fucosa y xilosa) y disacáridos (maltosa, lactosa y melobiosa) (Seibel, Moraru, & Götze, 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 & Fütterer, 2008).

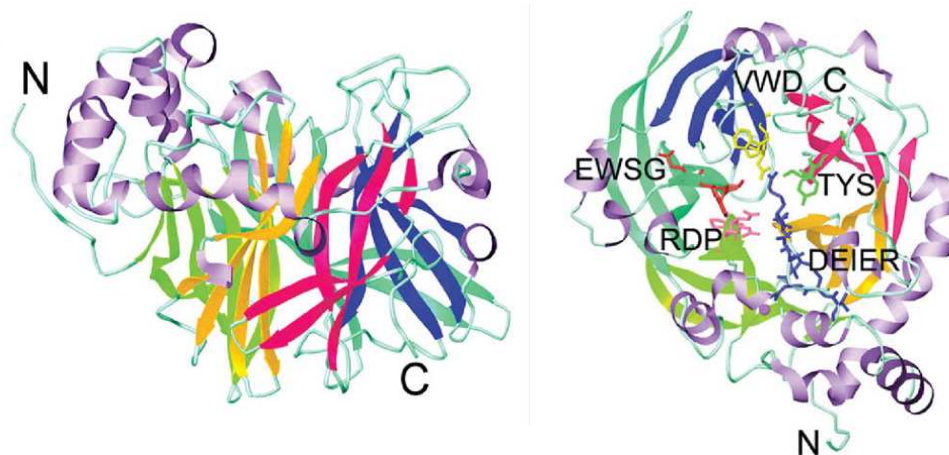


Fig. 1.3 Vistas ortogonales del plegamiento β -propela. En distinto color se muestra cada una de las 5 hojas constitutivas y en la figura de la derecha se indica la localización de motivos conservados de las FTFs (Meng y Fütterer, 2003).

1.2.2 Mecanismo de reacción

Se ha determinado que el mecanismo de reacción de las FTFs se ajusta a un modelo de dos pasos tipo ping-pong Bi-Bi que involucra la formación de un intermediario covalente fructosil-enzima (Chambert, Treboul, & Dedonder, 1974). En el primer paso (*glicosilación*), el grupo β -carboxilato de un residuo aspártico (motivo VWD) realiza un ataque nucleofílico sobre el carbon anomérico (C2) del residuo fructosilo de la sacarosa. Al mismo tiempo, se ha propuesto que la entrada del sustrato provoca la protonación de un residuo glutámico (segundo dentro del motivo DEIER) asistida por la arginina del motivo RDP conservada entre las FTFs (Yuan et al., 2012). Esto permite que el residuo glutámico sea capaz de catalizar la reacción actuando como ácido general mediante la donación de un protón al grupo glicosil saliente (glucosa), generándose el intermediario fructosil-enzima. Este intermediario covalente, es estabilizado por otro residuo aspártico (motivo RDP), que coordina enlaces de hidrógeno con el grupo fructosilo en las posiciones 3-OH y 4-OH (Meng & Fütterer, 2003). En el segundo paso (*desglicosilación*), el glutámico catalizador actúa ahora como una base general, removiendo un protón del grupo fructosil perteneciente a la molécula aceptora entrante, dando lugar a un anión altamente reactivo que realiza un segundo ataque nucleofílico sobre el C2 del grupo fructosilo del complejo enzima-fructosa, deshaciéndose el intermediario y formándose el enlace fructosil-aceptor (Fig. 1.4).

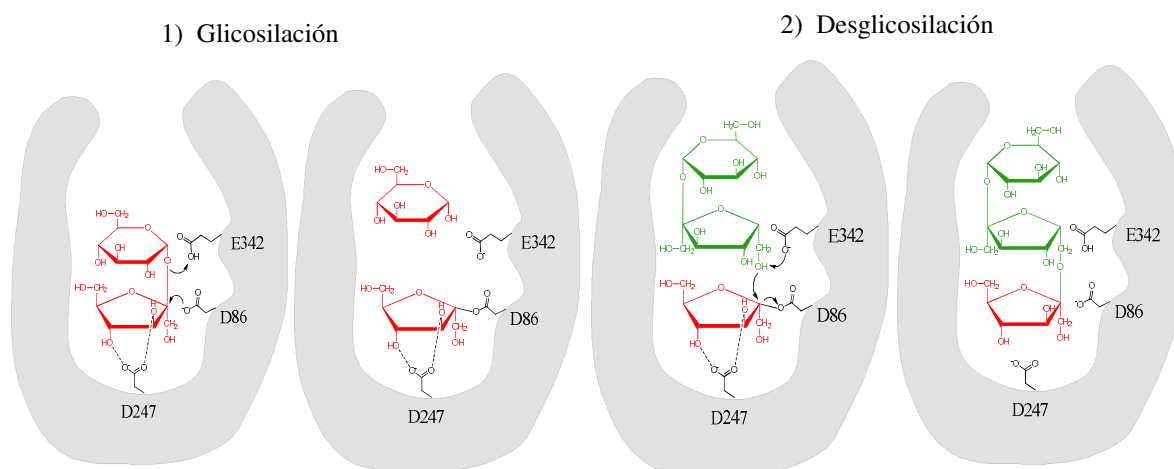


Fig. 1.4 Representación del mecanismo de reacción. Nucleófilo (D86), estabilizador del estado de transición (D247) y catalizador ácido/base (E342), numeración de SacB (adaptado de Chuankhayan et al., 2010).

1.2.3 Mecanismos de elongación de productos

Las fructanas, así como todos los polisacáridos, son sintetizados por reacciones enzimáticas de polimerización en las cuales los monómeros son añadidos sucesivamente al extremo creciente de un aceptor y en las que la longitud que alcanzan los productos está

estrechamente relacionada con el mecanismo de elongación que se desarrolla. El alargamiento de los productos puede ocurrir ya sea por un mecanismo no procesivo o por uno procesivo (Fig. 1.5). En un mecanismo no procesivo la molécula aceptora elongada es liberada al medio de reacción después de cada adición catalítica de la unidad monomérica. En este tipo de elongación, las longitudes de los productos ocurren estadísticamente en una distribución Poisson (May, Splain, Brotschi, & Kiessling, 2009). Dentro de las FTFs, se ha sugerido que las levansacarosas (LSs) de *G. diazotrophicus*, *Zymomonas mobilis*, y *Lactobacillus sanfranciscensis*, así como la inulosacarasa (IS) de *Lactobacillus reuteri* 121, las cuales sintetizan principalmente FOS con DP de hasta 3 ó 4, involucran un mecanismo de elongación no procesivo (Kralj et al., 2008).

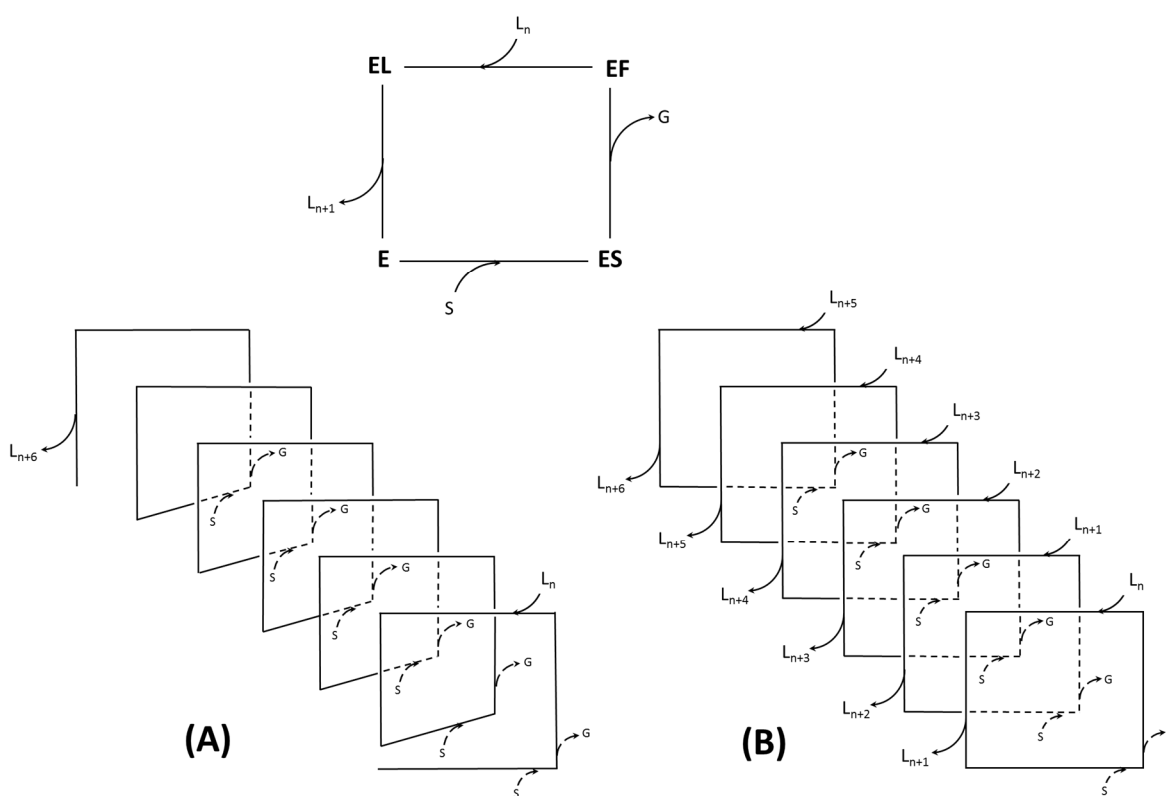


Fig. 1.5 Esquemas de los mecanismos de elongación Procesivo (A) y No Procesivo (B) propuestos para las FTFs. El cuadro superior representa el ciclo catalítico básico (Raga-Carbajal et al., 2016).

Por otra parte, en un mecanismo procesivo la enzima transfiere sucesivamente múltiples unidades monoméricas a la molécula aceptora antes de su disociación, esto se logra mediante una fuerte interacción entre la enzima y el polímero durante su crecimiento. Se propone que este tipo de mecanismo es desarrollado por aquellas FTFs que sintetizan polímeros sin la liberación de moléculas de peso molecular intermedio al medio de reacción, tales como las LSs de *L. reuteri* 121 y *B. megaterium* (Homann, Biedendieck, Götze, Jahn, & Seibel, 2007;

Ozimek, Kralj, van der Maarel, et al., 2006). En este esquema de elongación, el tamaño de los productos está determinado por cuándo la enzima libera al polímero elongado. Este mecanismo en particular requiere de ciertos elementos estructurales para el control de la longitud del producto, muchos de los cuales aún son desconocidos (May et al., 2009).

1.3 Levansacarasa de *Bacillus subtilis*

Muchos estudios en la biosíntesis de fructanas bacterianas se han realizado empleando la LS SacB de *B. subtilis*. El gen *sacB* de *B. subtilis* codifica para una enzima de 473 aminoácidos (52.9 kDa) capaz de sintetizar levanas a partir de sacarosa. En condiciones estándar de reacción (sacarosa 0.29 M, 1 U/mL, fosfatos 50 mM pH 6 y 37°C) SacB, a pesar de tener una actividad hidrolítica considerable, es capaz de sintetizar polímero de levana con una distribución bimodal de PMs, esto es, produce una levana de alto PM (LevanA) de alrededor de 2300 kDa (DP ~14200) y otra de bajo PM (LevanB) de aproximadamente 7.2 kDa y DP ~44 (Raga-Carbajal et al., 2016). En 1980, Tanaka, Oi y Yamamoto determinaron a partir de análisis de metilación que la levana de bajo PM consiste en promedio de 2 fracciones lineales o ramas, cada una compuesta por 22 residuos fructosilos; mientras que para la levana de alto PM estimaron que la longitud de la unidad repetida lineal consiste en promedio de 11 residuos fructosilos.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la selección de las condiciones de reacción puede afectar la especificidad de reacción (hidrólisis y transferencia) e incluso modificar el perfil de productos de esta levansacarasa. Por ejemplo, se ha demostrado el incremento de la actividad polimerasa de SacB en medios no acuosos, en particular, en soluciones concentradas de dimetil-sulfóxido y 2-metil-2-butanol, 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 (Castillo & López-Munguía, 2004; Régis Chambert & Petit-Glatron, 1989). Otras modificaciones de las condiciones de reacción que favorecen la reacción de transfructosilación frente a la hidrólisis, son la disminución de la temperatura y el incremento de la concentración de sustrato (Euzenat, Guilbert, & Combes, 1997; Porrás-Domínguez, Ávila-Fernández, Miranda-Molina, Rodríguez-Alegría, & López Munguía, 2015; Tanaka et al., 1979), sin embargo, este favorecimiento no se traduce en una modificación del perfil bimodal de las levanas sintetizadas por SacB (Raga-Carbajal et al., 2016).

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 en condiciones de alta fuerza iónica (0.4-0.8 M de

amortiguador de fosfato) esta enzima sintetiza únicamente LevanB. Este efecto fue también observado para la LS de *Bacillus 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, Pichyangkura, Ito, Iizuka, & Pongsawasdi, 2013). Además, se ha reportado que en presencia de alcoholes, tales como etanol o polietilenglicol, SacB puede modificar su perfil de productos sintetizando únicamente LevanA (Tanaka et al., 1979).

1.3.1 *Elongación de levanas por SacB*¹

Recientemente en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado un efecto determinante de la concentración enzimática sobre el perfil de PM de la levana producida por SacB. Reacciones en las que se emplea una concentración equivalente a 1 U/mL (0.1 μ M) y 100 g/L de sacarosa dan lugar a una distribución bimodal de levanas, al sintetizarse tanto LevanA como LevanB. En contraste, cuando se empleó una concentración de enzima 10 veces más altas o 10 veces más baja, equivalentes a 0.1 y 10 U/mL (0.01 y 1 μ M respectivamente), se eliminó el perfil bimodal dando lugar a un solo tipo de distribución de levana (Fig. 1.6). En estos casos, el tamaño de los productos se relaciona inversamente con la concentración enzimática, es decir, con 0.1 U/mL se sintetiza LevanA, mientras que cuando se emplea 10 U/mL se genera exclusivamente LevanB (Raga-Carbajal et al., 2016).

La peculiaridad de SacB de sintetizar dos tipos de polímeros de muy distinto PM: LevanA y LevanB se explica considerando que para cada producto se desarrolla un mecanismo de elongación distinto. En este sentido, la síntesis de LevanB ocurre a través de un mecanismo no procesivo, mediante la generación de múltiples oligómeros intermediarios en el rango de DP de 2-70. Por otra parte, la síntesis de LevanA ocurre sin la detección de las mismas moléculas intermediarias observadas para LevanB, ni de moléculas mayores, a través de un mecanismo de elongación del tipo procesivo. Lo que da lugar a la divergencia entre estos dos procesos y productos aún se desconoce, sin embargo, se ha propuesto que interacciones no covalentes enzima-sacáridos pueden estar involucradas (Raga-Carbajal et al., 2016).

¹ La información de este apartado corresponde al trabajo desarrollado en el periodo pre-doctoral y completado al inicio del programa de doctorado que fue incluido en el artículo: Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* Levansucrase (2016) **Raga-Carbajal E.**, Carrillo-Nava E., Costas M., Porrás-Domínguez J., López-Munguía A., Olvera C. *Glycobiology*, 26, 377-385.

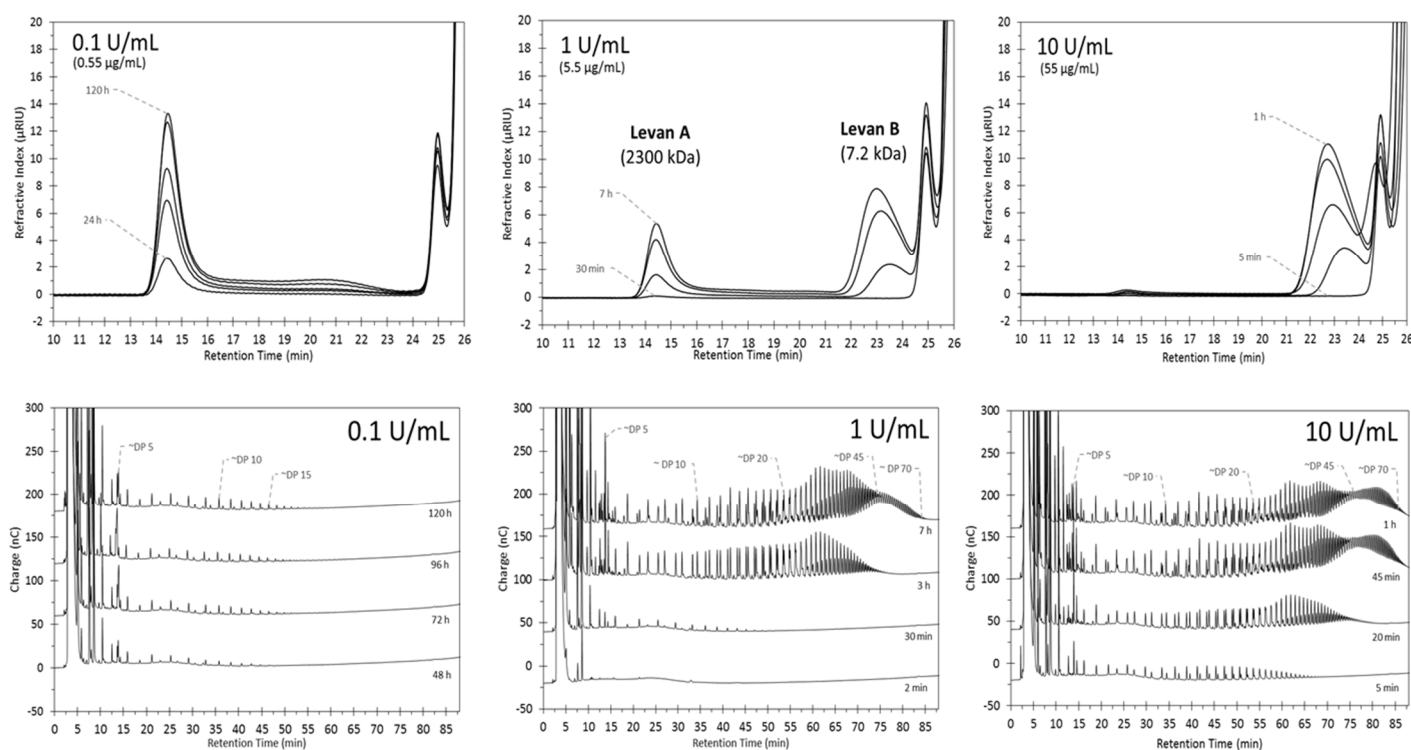


Fig. 1.6 Evolución en los perfiles de formación de polímeros (GPC, arriba) y oligosacáridos (HPAEC-PAD, abajo) en reacciones catalizadas por SacB empleando diferentes concentraciones de enzima y 100 g/L de sacarosa (Raga-Carbajal et al., 2016).

1.3.2 Estudios de estructura función

Existen varios reportes que advierten sobre la posibilidad de modular la especificidad de reacción (hidrólisis/transferencia) y de productos a través de mutaciones puntuales en SacB y otras FTFs. La mutación de diversos aminoácidos conservados y semiconservados cercanos a los subsitios -1, +1 y +2 ha modificado la especificidad de producto de diversas FTFs (Hijum, Kralj, & Ozimek, 2006; Homann et al., 2007; Ortiz-Soto, Rivera, Rudiño-Piñera, Olvera, & López-Munguía, 2008). Particularmente, algunas de las variantes de SacB desarrolladas por Ortiz-Soto y col. (2008) mostraron una especificidad de producto modificada con respecto a la forma silvestre: H243L sintetiza únicamente LevanA, S164A produce exclusivamente LevanB y algunas otras (G361F y R360K) son capaces de sintetizar únicamente FOS.

Por otra parte, de especial interés resultan las variantes de la LS de *B. megaterium* reportadas por Strube et al. (2011), que sintetizan mezclas de oligosacáridos con longitudes de cadena claramente distinguibles. Las mutantes N252A, K373A y Y247A (residuos ubicados en la periferia de la cavidad catalítica) perdieron la capacidad de síntesis de polímero, reteniendo la capacidad de producir oligosacáridos de hasta tres, cinco y nueve unidades de fructosa, respectivamente. Las estructuras cristalográficas de estas variantes

muestran el sitio activo intacto y una cierta correlación entre el tamaño de las cadenas sintetizadas y la localización en la superficie de los residuos mutados (Strube et al., 2011). Estos resultados junto con la comparación estructural de la LS de *B. megaterium* con otros miembros del clan GH-J, permiten suponer que la modulación de la síntesis de polisacáridos en esta y otras enzimas estructuralmente relacionadas está determinada por residuos que propician interacciones con las moléculas de fructanas no solamente en los subsitios +1 y +2 sino también en subsitios adicionales (+3, +4... etc.) más alejados del sitio catalítico.

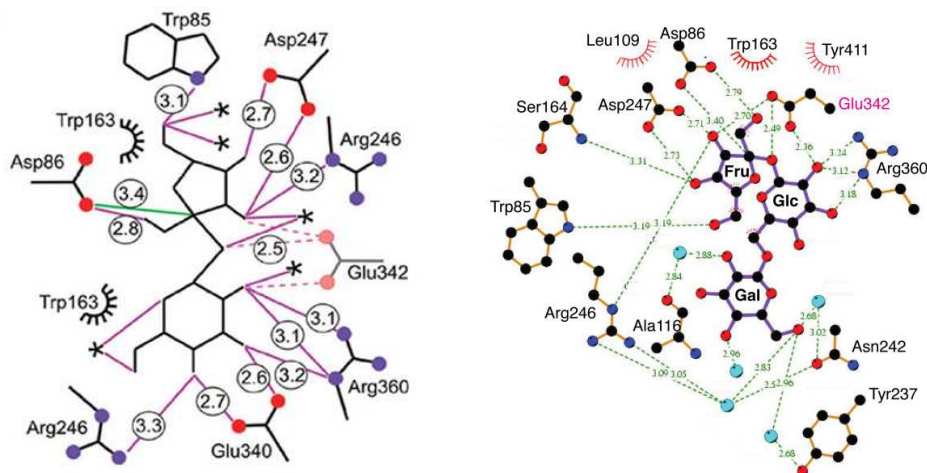


Fig. 1.6 Interacciones en los complejos SacB-sacarosa (izquierda) y SacB-rafinosa (derecha), que incluyen muchos de los residuos mutagenizados en estudios de estructura función de FTFs (Meng & Fütterer, 2003, 2008).

1.4 Modelos de elongación de carbohidratos

Las polimerasas de carbohidratos son abundantes en la naturaleza y aunque sus roles fisiológicos son vitales, los mecanismos moleculares que usan para controlar el ensamblaje de los polímeros, en muchos casos aún son desconocidos. Diversos análisis han revelado que un número de glicosiltransferasas desarrollan mecanismos procesivos, tales como las responsables de la producción de peptidoglicano, dextranas o N-glicanos, así como las poliasiltransferasas de *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis* (Barrett et al., 2007; Freiburger et al., 2007; Robyt, Yoon, & Mukerjea, 2008; Troutman & Imperiali, 2010; Vionnet & Vann, 2007). En contraparte, un pequeño número de estudios han proporcionado evidencia de ciertas glicosiltransferasas que emplean mecanismos no procesivos, como ejemplo se puede mencionar a la hialuronan sintasa de *Pasteurella multocida* o la condroitin polimerasa K4CP de *Escherichia coli* (Jing & DeAngelis, 2003; Sobhany, Kakuta, Sugiura, Kimata, & Negishi, 2008), ambas enzimas utilizan dos sitios activos para transferir alternadamente los residuos constituyentes de sus productos poliméricos. Sin embargo, estos

estudios, y en general la clasificación de mecanismos como procesivos o no procesivos, deja muchas cuestiones sin explorar, tales como qué factores moleculares o celulares gobiernan el modo de catálisis y qué mecanismos específicos contribuyen en el control del tamaño del producto.

Son pocos los estudios que se han desarrollado con el fin de brindar un modelo mecanístico de elongación para dicho tipo de polimerasas. Entre ellos se puede mencionar el modelo de anclaje (*tethering*) propuesto para la galactofuranosiltransferasa GlfT2 de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta enzima lleva a cabo una polimerización procesiva para sintetizar galactana, un polisacárido lineal de D-galactofuranosa con DP de 20-40, y para ello se ha hipotetizado que emplea una región de anclaje distante al sitio catalítico que incrementa la fuerza de interacción con el aceptor y favorece la procesividad (May et al., 2009). De forma similar, se ha determinado que la sintasa tipo 3 que cataliza la formación de uno de los polisacáridos capsulares de *Streptococcus pneumoniae* [-3)- β -D-Glc-UA-(1,4)- β -D-Glc-(1-)]_n posee un sitio de unión a carbohidrato adicional a la cavidad catalítica, el cual requiere una longitud crítica de DP 8 en la cadena en crecimiento para reconocerlo, después de lo cual, la reacción de polimerización entra en una fase de alta procesividad que conduce a la producción de polímero de alto peso molecular (Forsee, Cartee, & Yother, 2006).

Por otro lado, se han reportado sitios no catalíticos de interacción en enzimas que reconocen carbohidratos, particularmente en la familia de las glicosil hidrolasas (Boraston, Bolam, Gilbert, & Davies, 2004). Muchos de estos sitios pertenecen a dominios separados de la unidad estructural catalítica, referidos como módulos de unión a carbohidratos (CBMs), ligados a través de regiones flexibles (Guillén, Sánchez, & Rodríguez-Sanoja, 2010). En algunos otros casos, en los que la enzima consiste de solamente un dominio, se ha revelado también la presencia de regiones de unión a sustrato, llamados sitios de unión secundarios (SBS), situados en la superficie de la unidad estructural a cierta distancia del sitio activo. Tanto a los CBMs como a los SBSs se les atribuye una amplia variedad de funciones entre las que se incluyen: servir para el anclaje en la pared celular del microorganismo parental, direccionar el sustrato hacia el sitio activo, generar una disrupción del sustrato, participar en la regulación alostérica o mejorar la procesividad durante la catálisis (Cuyvers, Dornez, Delcour, & Courtin, 2012). Un ejemplo de la activa participación de este tipo de sitios de interacción en la síntesis de carbohidratos, lo constituye la elongación que lleva a cabo la amilosacarasa de *Neisseria polysaccharea* sobre el glicógeno, el cual es el mejor aceptor y más eficiente activador conocido para esta enzima (Albenne et al., 2004). En la estructura de la amilosacarasa se han identificado tres sitios de unión adicionales que generan un fuerte anclaje del glicógeno en la superficie de la enzima y proveen una guía efectiva del extremo

no reductor de las ramas del aceptor hacia el sitio activo. Más aun, se ha propuesto un mecanismo *semiprocesivo* en el cual una rama del glicógeno permanece capturada en uno de los sitios superficiales de la enzima mientras otra rama es elongada en el sitio catalítico a través de movimientos de entrada y salida. Después de cada reacción de transglucosilación, la rama aceptora debe salirse del sitio activo para permitir a una nueva molécula de sacarosa alcanzar el sitio activo (Albenne, Skov, & Tran, 2007).

De esta forma, regiones alejadas al sitio activo pueden jugar un rol importante durante la biosíntesis de una variedad de polisacáridos, funcionando como sitios de anclaje de los sustratos con el fin de activar la procesividad y asistir la elongación de las moléculas aceptoras durante la reacción.

Planteamiento del problema

La base molecular que da lugar a las diferentes especificidades de producto en SacB y en general de las FTFs aún es pobremente entendida. Particularmente para SacB, se ha propuesto que la distribución bimodal de levanas sintetizadas se realiza por procesos distintos con mecanismos de elongación diferentes. Diversos estudios han demostrado que mediante la selección de las condiciones de reacción o modificaciones estructurales es posible delimitar el mecanismo de elongación y por tanto dar lugar a una distinta especificidad de producto. Sin embargo, aún se desconoce qué elementos estructurales son los que participan en la dinámica de elongación de levanas y cuáles de ellos dan lugar a la divergencia en los procesos desarrollados por SacB.

Justificación

Descifrar el mecanismo de elongación de polisacáridos que lleva a cabo la levansacarasa SacB de *B. subtilis* tiene implicaciones básicas y aplicadas. Por un lado, permitirá comprender las estrategias estructurales que les permiten a este tipo de enzimas sintetizar productos de muy variados tamaños, incluidos pesos moleculares muy elevados. Por otro lado, la amplia diversidad de aplicaciones para las fructanas en función de su tamaño abre un espectro de oportunidades para el posible diseño de enzimas con capacidades de síntesis específicas, en términos del tamaño de las fructanas que sintetizan.

Hipótesis

El mecanismo de elongación de levanas de SacB involucra interacciones en la superficie de la enzima con las moléculasceptoras (productos intermediarios), que guían la síntesis de levanas y pueden delimitar el grado de polimerización del producto final.

Objetivos

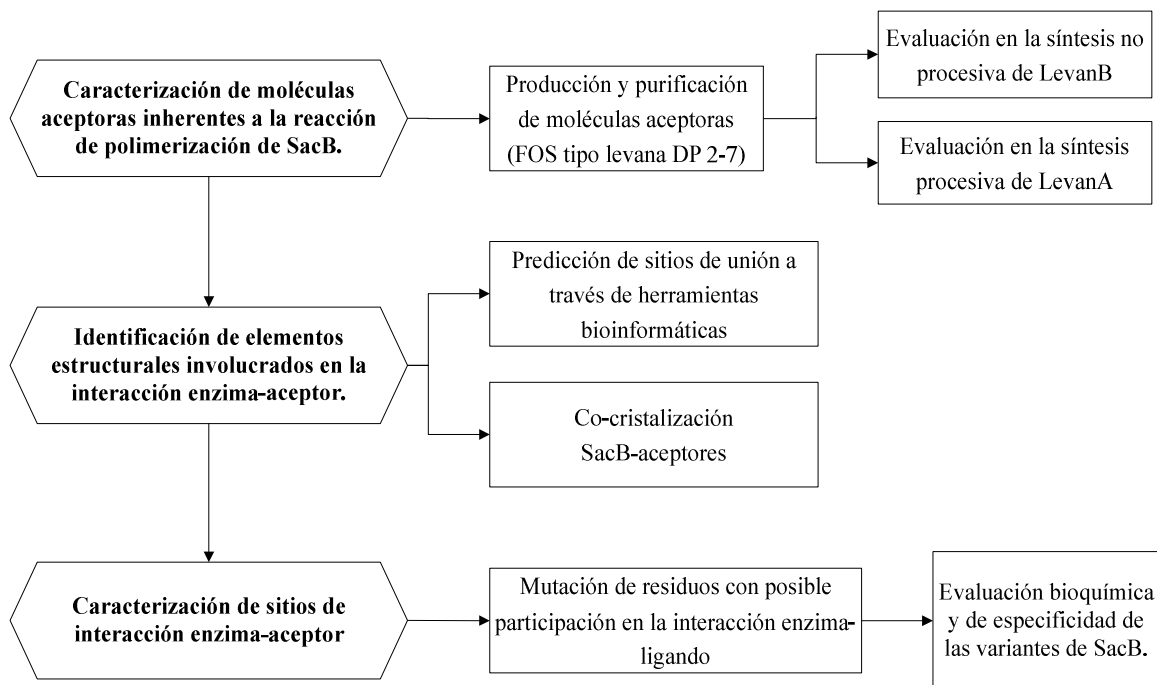
Objetivo General:

Estudiar las interacciones entre la enzima y las moléculasceptoras involucradas en la síntesis de levanas desarrollada por SacB de *B. subtilis*.

Objetivos Particulares:

- Producción y purificación de posibles moléculasceptoras para la síntesis de levanas.
- Evaluación y caracterización de moléculasceptoras inherentes a la síntesis de levanas desarrollada por SacB.
- Identificación de elementos estructurales involucrados en la interacción enzima-aceptor.
- Evaluación de los sitios de interacción enzima-aceptor y su posible participación en el mecanismo de elongación de levanas de SacB.

Estrategia Experimental



Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1. Mutagénesis sitiodirigida

Las mutaciones seleccionadas (Tabla 1) se introdujeron en el gen de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* cepa 168 (SacB) clonado en el vector pET22b, empleando el kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. El gen de la LS, sin contar con el péptido señal nativo (primeros 30 aminoácidos de su secuencia), está insertado entre los sitios de restricción NdeI y BamHI del vector pET22b, de modo que no contiene el péptido señal pelB del mismo vector y en cambio contiene un tag de 6 histidinas en el extremo C terminal. Las secuencias de los oligonucleótidos usados en la obtención de las mutantes se muestran en la Tabla 1. La doble mutante inactiva, empleada en experimentos de calorimetría y cristalización, se obtuvo teniendo como templado el gen de la mutante SacB E342A desarrollado previamente (Ma. Elena Ortiz Soto, datos no publicados). Las construcciones obtenidas se verificaron en un secuenciador automático de DNA modelo 3130xl (Applied Biosystems) en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología (UNAM). Las secuencias de DNA de los genes de SacB y sus mutantes se incluyen en el Anexo A. Secuenciación de ADN La construcción de la mutante H243L fue retomada del trabajo de Ortiz-Soto et al. (2008) y verificada de igual manera por secuenciación. Por último, las mutantes Y187A, K389A y la triple mutante Y37A/Y41A/Y271A fueron adquiridas de la empresa Mutagenex (USA).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis sitio-dirigida

Oligonucleótido	Secuencia de ADN (5' a 3')
Y237A Fw	C GAT GAA GGC AAC <u>GCG</u> AGC TCAGGC GAC AAC CAT ACG
Y237A Rv	CGT ATG GTT GTC GCC TGA GCT <u>CGC</u> GTT GCC TTC ATC G
N242A Fw	C TAC AGC TCA GGC GAC <u>GCG</u> CAT ACG CTG AGA GAT CC
N242A Rv	GG ATC TCT CAG CGT ATG <u>CGC</u> GTC GCC TGA GCT GTA G
K363A Fw	CT GAC TCC CGC GGA TCA <u>GCG</u> ATG ACG ATT GAC GGC
K363A Rv	GCC GTC AAT CGT CAT <u>CGC</u> TGA TCC GCG GGA GTC AG

D247A/E342A Fw	GGC CTG GAC GTT TGG <u>GCG</u> AGC TGG CCA TTA CAA AAC GC
D247A/E342A Rv	GC GTT TTG TAA TGG CCA GCT <u>CGC</u> CCA AAC GTC CAG GCC
Y187A ¹	GGT AAA CAT <u>GCG</u> GGC AAA CAA
K389A ¹	GGC CCA TAC <u>GCG</u> CCG CTG AAC
	CAA AAG CCA <u>GCG</u> AAG GAA ACA
Y37A/Y41A/Y271A ¹	AAG GAA ACA <u>GCG</u> GGC ATT TCC
	GAA GAT GGC <u>GCG</u> CAA GGC GAA

¹Diseño de mutaciones solicitadas a la empresa Mutagenex.

2.2. Producción de enzimas recombinantes

2.2.1. Expresión heteróloga

La producción de SacB y sus variantes se realizó a partir de la transformación de células electrocompetentes de *E. coli* cepa BL21 (DE3) con el plásmido correspondiente en un aparato de electroporación MicroPulser (BioRad) y el cultivo en medio LB sólido en agar adicionado con ampicilina 200 µg/mL. Cinco colonias de células recién transformadas se inocularon en 50 mL de medio LB con ampicilina 200 µg/mL dentro de un matraz de 250 mL y se incubó 14-16 h 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 IPTG 0.2 mM 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 acetatos 0.1 M pH 6. La lisis celular se desarrolló empleando lisozima 1 mg/mL en buffer de acetatos de sodio 100 mM pH6 y congelando-descongelando tres veces, posteriormente se sometió a sonicación con 4 pulsos de 10 s (10 s ON, 30 s OFF, amplitud 70%) y por último se centrifugó a 9000 rpm durante 40 min. El sobrenadante fue recuperado y diluido con amortiguador de acetatos 0.1 M pH 6.0 hasta completar 50 mL para su posterior purificación.

La producción de la endolevanasa de *Bacillus licheniformis* cepa ATCC 14580 (LevB1), se realizó a partir de la electroporación de células de *E. coli* cepa Rosseta 2 con la construcción pET22b-LevB1. El gen LevB1 está clonado entre los sitios de restricción Nco I y Xho I y posee una cola de 6 histidinas en el extremo C terminal (Porrás-Domínguez et al., 2014). El proceso de cultivo, inducción, cosecha y lisis fue el mismo al expuesto en el párrafo anterior con la salvedad que la lisis se realizó en un buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 6 adicionado con 0.01 M de imidazol y 0.5 M de NaCl (buffer de unión).

2.2.2. Purificación

SacB y sus mutantes generadas heterológamente se purificaron mediante cromatografía de intercambio catiónico empleando una columna de 5 mL HiTrap CM-sepharose Fast Flow (GE Healthcare). La columna se equilibró con 5 volúmenes de buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 6 empleando una bomba peristáltica y posteriormente el extracto enzimático se hizo recircular durante 20 min a un flujo de 5 mL/min. El lavado y elución se realizaron en un equipo AKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech), para ello la columna se lavó con buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 6 durante 5 min a un flujo de 5 mL/min y posteriormente se realizó la elución de la enzima empleando buffer de acetatos 1 M pH 6 a un flujo de 1 mL/min por 40 min. El proceso de carga y elución se repitió hasta dos veces más. Las fracciones en las que se registró elución de proteína fueron recolectadas, concentradas y el buffer intercambiado por el *buffer de trabajo* (amortiguador de acetatos 50 mM pH 6 adicionado con CaCl₂ 1 mM) usando filtros para centrífuga Amicon Ultra-4 (Merck Millipore) con corte molecular de 10 ó 30 kDa.

La endolevanasa LevB1 heteróloga se purificó a través de cromatografía de afinidad por Níquel empleando una columna de 5 mL HiTrap Chelating HP (GE Healthcare). La columna, previamente tratada con NiSO₄ 100 mM, se equilibró con 5 volúmenes de buffer de unión (imidazol 0.01 M en buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 6 adicionado con 0.5 M de NaCl) y posteriormente se le recirculó el extracto enzimático por 20 min a 5 mL/min empleando una bomba peristáltica. El lavado se realizó con 5 volúmenes de buffer de unión y la elución de la endolevanasa se desarrolló con 5 volúmenes de imidazol 0.5 M en buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 6 adicionado con 0.5 M de NaCl. El volumen eluido fue recolectado, concentrado y sujeto a intercambio de buffer a buffer de trabajo con filtros Amicon Ultra-4 (Merck Millipore) con corte de 30 kDa.

2.3. Análisis de proteínas

2.3.1. Cuantificación de Proteína

La proteína total del producto enzimático fue cuantificada mediante el método de Bradford utilizando el reactivo Protein Assay (Bio-Rad), para ello se empleó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) como estándar medida a 595 nm. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

2.3.2. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

La pureza de las enzimas se verificó por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 10%. Aproximadamente 20 μg de cada proteína pura se cargó por carril en el gel de acrilamida, para lo cual se mezcló previamente 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). La electroforesis se desarrolló a 20 mA durante aproximadamente 1.5 h en una unidad Mighty Small II SE 250 (Amershan Bioscience). Finalmente, el gel fue teñido con solución de azul de Coomassie 0.125% y desteñido en agua durante una noche.

2.4. Ensayo enzimático estándar

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo empleando concentraciones de SacB o sus variantes de 0.01 μM , 0.1 μM , 0.5 μM ó 1 μM , esta última concentración molar corresponde a 10 U/mL de SacB nativa y aproximadamente 55 $\mu\text{g/mL}$ de proteína. Las reacciones se realizaron en volúmenes de 600 μL adicionando sacarosa (Sigma Aldrich) a una concentración final de 100 g/L (292 mM), empleando amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 6 adicionado con CaCl_2 1 mM (buffer de trabajo). Las denominadas *reacciones de acceptor* se realizaron adicionando además el sustrato acceptor en concentraciones de 5 ó 20 mM. Las temperaturas de trabajo fueron y 25°C y 37°C bajo agitación constante a 350 rpm. Las reacciones fueron monitoreadas a distintos tiempos retirando una alícuota de 50-80 μL del medio de reacción que fue congelada 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 fueron congeladas hasta su análisis. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

La actividad enzimática de SacB de *B. subtilis* y sus variantes, así como de la endolevanasa LevB1 de *B. licheniformis* fueron determinadas midiendo la velocidad inicial de liberación de azúcares reductores mediante la técnica de DNS (Miller, 1959). Para ello, alícuotas de 50 μL fueron retiradas de una reacción enzimática estándar cada 2.5 min por 10 min, adicionadas con 50 μL de reactivo DNS y calentadas en agua hirviendo durante 5 minutos. Después de enfriar las muestras en hielo por 5 min se midió la absorbancia a 540 nm. La cuantificación de azúcares reductores se realizó a partir de una curva de calibración formada con una solución equimolar de glucosa y fructosa como referencia. Una unidad de *actividad levansacarasa* fue definida como la cantidad de enzima requerida para obtener un μmol de azúcar reductor equivalente a fructosa por minuto a partir de una solución de sacarosa de 100

g/L a 37°C y un pH de 6. Tal actividad engloba las dos actividades de la enzima: hidrólisis y transfructosilación. Una unidad de *actividad endolevanasa* fue definida como la cantidad de enzima requerida para obtener un μmol de azúcar reductor equivalente a fructosa por minuto a partir de una solución de LevanB de 10 g/L a 37°C y un pH de 6. Ambas actividades enzimáticas, en forma de actividad volumétrica (U/mL), fueron empleadas para la dosificación de las enzimas.

Adicionalmente, en algunos casos se determinó la actividad global de SacB y sus variantes, medida como la liberación de glucosa al medio. Así mismo, las actividades individuales de hidrólisis de sacarosa y transferencia en presencia de sacarosa, y sustratos aceptores, se determinaron midiendo la velocidad inicial de liberación de fructosa (F) y la velocidad inicial de transferencia de fructosa a través de la diferencia entre fructosa y glucosa libres ($F_{\text{transferida}} = G_{\text{libre}} - F_{\text{libre}}$). Los ensayos cinéticos se realizaron tomando alícuotas de 50 μL cada 2.5 min por 10 min. Las muestras fueron inmediatamente congeladas y hervidas y el contenido de fructosa y glucosa fue determinado a través de HPLC como se detalla en el apartado 2.7.1. Las unidades de *actividad global*, de *actividad hidrolítica* (sobre sacarosa) y de *actividad transferasa* fueron definidas como la cantidad de enzima necesaria para: liberar un μmol de glucosa por minuto, liberar un μmol de fructosa por minuto y transferir un μmol de fructosa por minuto, respectivamente, partiendo de 100 g/L de sacarosa como sustrato donador a 25°C y pH de 6.

2.5. Producción y purificación de fructooligosacáridos

La producción de FOS de tipo levana con DP entre 2-7 se realizó mediante el sistema bi-enzimático desarrollado por Porras-Domínguez (2012; 2018) en dos conformaciones:

2.5.1. Método Secuencial

Producción y purificación de levana. Se sintetizó LevanB en un volumen de 500 mL, empleando 5 U/mL de la levansacarasa SacB y 400 g/L de sacarosa en buffer trabajo, durante 24 h a 25°C y 200 rpm. La levana producida fue precipitada mediante la adición de 4.5 volúmenes de 500 mL de etanol comercial al crudo de reacción y separada del sobrenadante por centrifugación y decantación. El precipitado se resuspendió en agua y se dializó contra agua destilada por 48 h en una membrana de diálisis de celulosa Spectra/Por 2 (SpectrumLabs) con poro de exclusión molecular de 12-14 kDa, realizando cambios del disolvente cada día. Por último, la levana fue liofilizada.

Hidrólisis de levana. La hidrólisis enzimática de LevanB se realizó en un volumen de 50 mL, teniendo 200 g/L de sustrato en buffer de trabajo y 1 U/mL de endolevanasa LevB1. La

hidrólisis se desarrolló por 3 h a 37°C, pH 6 y 350 rpm. El crudo de reacción fue filtrado y congelado hasta su purificación.

2.5.2. Método Simultáneo

La reacción de síntesis se desarrolló dentro de un reactor enchaquetado (50 mL), conectado a un baño de recirculación a 37°C, en el que se hicieron reaccionar por 7 h, 10 U/mL de SacB y 0.1 U/mL de LevB con sacarosa 600 g/L en buffer de trabajo. El crudo de reacción fue calentado en agua en ebullición por 10 min para inactivar las enzimas y posteriormente filtrado.

2.5.3. Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC)

La separación por grado de polimerización de los FOS producidos se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular preparativa en una columna (2.5 x 100 cm) empacada con 160 g de gel de poliacrilamida Bio-Gel P2 extrafino (Bio-Rad). La carga, elución y recolección (80 tubos de 2 mL) se realizó en un equipo AKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech) empleando agua destilada como eluyente a un flujo de 0.2 mL/min. La detección de los productos eluidos se realizó ensayando en microplaca la presencia de azúcares reductores en una alícuota hidrolizada de cada una de las fracciones recolectadas. Para ello, en una microplaca de 96 pozos se adicionaron 10 µL de cada tubo recolectado y 10 µL de una dilución 1/50 de la preparación enzimática Fructozyme L (Novozyme), dejándose reaccionar por 30 minutos a 70°C. Posteriormente se adicionaron 20 µL de reactivo DNS incubándose nuevamente por 30 minutos a 70°C. Después de enfriar la microplaca por 5 minutos, se adicionaron 200 µL de agua destilada y se realizó la lectura de absorbancia a 540 nm en lector de microplacas VersaMax (Molecular Devices). Tras múltiples cargas, las fracciones seleccionadas se concentraron en rotavapor hasta volúmenes de 1-5 mL. La correcta separación se verificó por TLC. El DP de las fracciones recolectadas se determinó tomando como referencia la separación de Oligofructosa P95 (Beneo, Alemania), una mezcla comercial de FOS tipo inulina con DP entre 2 y 7. La estimación de la proporción relativa de cada una de las fracciones con DP distinto se realizó determinando el contenido de monosacáridos por HPLC y mediante la integración numérica del perfil de elución en SEC por el método de la secante en Excel.

2.5.4. Cromatografía de Fase Reversa (rpHPLC)

La separación de los isómeros incluidos en las fracciones de distinto DP obtenidas en SEC se realizó por HPLC de fase reversa en un sistema Waters (Waters Corp.) equipado con un inyector automático Waters 717, una bomba binaria Waters 2414 y un detector de índice de refracción (IR) Waters 2414. Para la separación se empleó una columna Spherisorb S5 ODS2

Semi-Prep (20 x 250 mm, Waters) y agua como eluyente a un flujo de 7 mL/min. La recolección manual de los picos se realizó a partir de la señal de IR registrada. Tras múltiples inyecciones, los picos recolectados fueron concentrados en rotavapor hasta volúmenes de 3-5 mL y posteriormente liofilizados. La pureza de los productos obtenidos se verificó mediante HPAEC-PAD.

2.6. Análisis estructural de productos purificados

2.6.1. Derivatización de FOS a acetatos de alditol parcialmente metilados

La derivatización de los productos puros a acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA) se realizó de acuerdo al método de Ciucanu & Kerek (1984) con algunas modificaciones (Mellado-Mojica & López, 2012).

Metilación. 10 mg de cada fructooligosacárido purificado fue disuelto en 500 μ L de Me_2SO y metilado mediante adiciones subsecuentes de NaOH pulverizado y CH_3I . El NaOH se empleó en al menos un exceso de 3 mmol of NaOH por mmol de H intercambiable (Ciucanu & Caprita, 2007). Por su parte, el CH_3I se adicionó en una cantidad molar equivalente al NaOH considerando la densidad de este agente metilante (2.275 mg/ μ L). Los reactivos se adicionaron en intervalos de 3 h manteniendo la agitación constante y condiciones anhidras. Los productos metilados fueron recuperados mediante extracción líquido-líquido empleando CH_2Cl_2 como fase orgánica y secados con N_2 .

Hidrólisis y Reducción. Las muestras permetiladas fueron hidrolizadas por 1 h a 90°C adicionando 900 μ L de TFA 0.5 M y posteriormente secadas con N_2 con la adición de tolueno. La reducción se realizó añadiendo 5 mg de NaHB_4 disueltos en 500 μ L de NH_4OH 1 N, manteniendo la reacción a 60°C por 1 h. El secado posterior con N_2 se realizó con la adición de solución metanólica de ácido acético al 15%.

Acetilación. Los alditoles generados se acetilaron añadiendo 500 μ L de anhídrido acético y 250 μ L de piridina como catalizador. La reacción se realizó durante 2 h a 90°C. Los productos fueron recuperados mediante extracción líquido-líquido empleando CH_2Cl_2 como fase orgánica y secados por último con N_2 .

2.6.2. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (GC-MS)

Los productos derivatizados se disolvieron en 2 mL de CH_2Cl_2 y 2 μ L de una dilución 1/10 de la muestra fueron inyectados en un cromatógrafo de gases 7890B GC System (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de masas 5977A MDS (Agilent Technologies), localizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales

(CINVESTAV-Irapuato). La separación de los derivados se realizó en una columna capilar de fenilmetilsilicón al 5% (HP-5, 30 m × 0.25 mm d.i. × 0.25 μm de grosor, Agilent Technologies) utilizando helio (He) como gas acarreador a una velocidad de flujo de 2 mL/min, sosteniendo una presión de 5 psi. La temperatura inicial del horno fue de 60°C sostenida por 3 min, seguida de una rampa de temperatura de 4°C/min hasta 160°C por un min, 0.5°C/min hasta 180°C por 1 min. La temperatura del inyector y del detector fue de 300°C. En el detector de masas, las muestras vaporizadas se ionizaron en alto vacío por bombardeo electrónico con una energía de ionización de 70 eV. La identificación de los derivados se hizo de acuerdo con su tiempo de retención y patrón de masas siguiendo el criterio establecido por Mancilla-Margalli & Lopez (2006) y Mellado-Mojica & López, (2012). Como estándares se emplearon la agavina comercial “Ingredian” e isomaltotriosa.

2.6.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los productos sujetos a análisis de RMN fueron purificados de reacciones de SacB o sus variantes a través de SEC y rpHPLC (Secciones 2.5.3 y 2.5.4). Los espectros de RMN fueron adquiridos en un espectrómetro Varian VNMRs operado a 700 MHz y 125 MHz para núcleos de ^1H y ^{13}C , respectivamente, en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (CIQ-UAEM). Para ello entre 5 y 10 mg de cada producto fueron disueltos en agua deuterada y sometidos a análisis unidimensionales y bidimensionales del tipo 1H–1H gCOSY, gHSQC, gHMBC, 1H–1H TOCSY y NOESY. El análisis y edición de los espectros se realizó empleando el programa MestReNova. Los desplazamientos químicos se enlistan en partes por millón (ppm) referenciados a D_2O ($\delta=4.8$ ppm).

2.7. Análisis del perfil de productos de las reacciones enzimáticas

2.7.1. Azúcares simples

La cuantificación de azúcares simples (fructosa, glucosa, sacarosa) se realizó por HPLC en un sistema Waters (Waters Corp.) que incluye un cargador de muestras automático Waters 717, una bomba binaria Waters 2414 y un detector de índice de refracción Waters 2414. La cromatografía se desarrolló en una columna Prevail Carbohydrate ES (4.6 x 250 mm, GRACE) mantenida a 30° y empleando acetonitrilo/agua (75:25) como fase móvil a un flujo de 1 mL/min. La relación hidrólisis/transferencia (H/T) se obtuvo a partir de los valores de fructosa (F) y glucosa (G) libres obtenidos de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

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

2.7.2. Oligosacáridos

El análisis de fructooligosacáridos se realizó en primera instancia por cromatografía en capa fina (TLC) empleando placas de sílica gel ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel). La cromatografía se desarrolló 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 hizo por dispersión con α -naftol y calentamiento.

Adicionalmente, el análisis de oligosacáridos se realizó mediante HPAEC-PAD, previa centrifugación y dilución de las muestras, en un sistema Dionex DX-500 IC equipado con una bomba GP50, detector de pulso amperométrico ED50, inyector automático U3000 y una serie de guarda-columna y columna CarboPac PA-200 (3 x 250 mm, Dionex). La columna fue equilibrada a 30°C con 150 mM de NaOH y 5 mM de acetato de sodio a un flujo de 0.5 mL/min y los productos fueron eluidos empleando dos gradientes lineales de acetato de sodio (5-100 mM de acetato de sodio por 25 minutos, 100-400 mM de acetato de sodio por 60 min y 10 min de reequilibración a condiciones iniciales, 5 mM de acetato de sodio, Programa Lev60). Para el análisis de muestras que incluyeran solamente FOS, se empleó únicamente el primer gradiente lineal de acetato de sodio (5-100 mM de acetato de sodio por 25 minutos y 10 min de reequilibrado a 5 mM, Programa FOS25). Para contrarrestar la pérdida de resolución de la columna, después de algunos meses de uso, las eluciones se realizaron con los mismos gradientes de acetato de sodio, pero empleando 100 mM de NaOH.

Como estándares se emplearon glucosa, fructosa, sacarosa (Sigma-Aldrich, Estados Unidos); 6-kestosa y neo-kestosa (donación del Dr. M. Iiusuka); 1-kestosa, nistosa y fructofuranosil-nistosa (Wako Pure Chemical Industries, Japón) y fructooligosacáridos tipo inulina OligoTech® GFn DP3-10 (Elicityl, Francia); además de la preparación comercial Oligofructose Orafti®P95 (Beneo, Alemania), que contiene FOS e inulo-oligosacáridos, GFn y Fn, con DP entre 2 y 7.

La cuantificación en HPAEC-PAD de levanobiosa, blastosa, 1-kestosa, 6-kestosa y neo-kestosa se realizó tras la purificación de estos productos de reacciones de SacB o sus mutantes a escala de 50 mL, con lo cual se construyeron las respectivas curvas de calibración. La integración de las señales se realizó empleando el software Chromeleon.

2.7.3. Polímeros

La distribución de PM de las levanas sintetizadas fue analizada por cromatografía de permeación en gel (GPC) en un sistema UltiMate 3000 RS (DIONEX) empleando dos columnas Ultrahydrogel SEC (Waters) en serie, 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,

acopladas a un detector de índice de refracción Shodex RI-101(Showa Denko). La cromatografía se desarrolló empleando una elución isocrática con nitrato de sodio 0.1 M como fase móvil a un flujo de 0.8 mL/min y 30°C. El PM de los productos se determinó a partir de una curva de calibración construida empleando dextranas comerciales de distintos tamaños.

2.8. Co-cristalización y determinación de la estructura cristalina

Se obtuvieron cristales de la enzima inactiva SacB D86A/E342A co-cristalizada con el octasacárido (1&6,6,6,6,6-kestooctaosa) usando el método de microbatch a 18°C (Chayen & Saridakis, 2008). Las concentraciones de la enzima y el ligando fueron de 32.5 y 12 mg/mL, respectivamente (relación molar ligando/proteína de 15). Las gotas se prepararon manualmente en placas de 72 pozos (Greiner, Hampton Research), añadiendo 1 µl de la mezcla enzima-octasacárido (en buffer MES 100 mM, pH 6.0) a 1.0 µl de la solución de cristalización 25 del kit Wizard 4 de Jena Bioscience (PEG 2000 MME 30% w/v y bromuro de potasio 150 mM). Las gotas se cubrieron con 10 µL de aceite de parafina. Cristales adecuados para difracción aparecieron en un mes y crecieron por un mes más. Los cristales seleccionados para la adquisición de datos fueron congelados por inmersión en nitrógeno líquido empleando aceite de parafina como crioprotector.

Los datos de difracción de rayos X fueron colectados con un cristal en un difractor de ánodo rotatorio de cobre (Rigaku RU200H) acoplado a un detector Pilatus 200K, en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (Instituto de Química, UNAM). La colecta de datos se realizó a 100 K con ayuda de un criostato (Oxford Cryosystems 600 series). Los datos de difracción fueron indexados, integrados y escalados con el programa HKL 3000 (Minor, Cymborowski, Otwinowski, & Chruszcz, 2006). El cristal pertenece al grupo espacial P2₁ con dimensiones de celda $a = 69.3$, $b = 78.6$, $c = 78.7$ Å and $\beta = 93.9^\circ$ (Tabla 2). Se determinó la estructura por remplazo molecular usando las coordenadas de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* (PDB: 1OYG) como modelo inicial (Meng & Fütterer, 2003). La búsqueda se realizó con el programa Phaser (McCoy et al., 2007) y los modelos se mejoraron a través de refinamiento de cuerpo rígido y restricciones geométricas con REFMAC (Murshudov, Vagin, Dodson, & IUCr, 1997). Posteriormente, el refinamiento se desarrolló mediante ciclos automáticos y manuales empleando PHENIX (Adams et al., 2010) y COOT (Emsley, Lohkamp, Scott, & Cowtan, 2010), respectivamente.

La estructura cristalográfica tiene un R_{cryst} de 17.3% (R_{free} de 23.6%, calculado con 5% de datos seleccionados aleatoriamente) a 2.05 Å de resolución (Tabla 2). El model final presenta

una buena estereoquímica analizada con PROCHECK (Winn et al., 2011). Las figuras de la estructura se elaboraron con el programa PyMOL (Molecular Graphics, Version 1.8 Schrödinger, LLC).

Las coordenadas atómicas y los factores de estructura se depositaron en el Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) con el código de acceso 6N3M.

Tabla 2. Datos de recolección, procesamiento y resolución de la estructura cristalográfica

Data collection	
Space group	P2 ₁
<i>Cell dimensions</i>	
<i>a</i> (Å)	69.3
<i>b</i> (Å)	78.6
<i>c</i> (Å)	78.7
β (deg)	93.9
Resolution (Å)	25.0 - 2.05 (2.09 - 2.05)
Unique reflections	53 175
<i>I</i> / σ <i>I</i>	23.9 (3.5)
<i>R</i> _{merge} (%) ^a	4.8 (52.6)
Completeness (%)	99.9 (100.0)
Multiplicity	2.7 (2.5)
Mosaicity (deg)	0.65
Refinement	
Resolution (Å)	25.0 - 2.05
<i>R</i> _{cryst} (%) ^b	17.3
<i>R</i> _{free} (%) ^c	23.6
<i>Number of atoms</i>	
Protein	7107
Calcium	2
Bromide	9
Fructose	223
Water	450
<i>B-factors</i> (Å ²)	
Protein	27.4
Calcium	15.9
Bromide	38.3
Fructose	47.3
Water	31.0
All atoms	28.0
Wilson Plot	25.1
<i>RMSD</i> ^d	
Bond lengths (Å)	0.011
Bond angles (deg)	1.16

Values in parentheses are for the highest resolution shell

^a $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, where $I_i(hkl)$ is the intensity of an observation and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean value for its unique reflection.

^b $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_h |F_o(h) - F_c(h)|}{\sum_h |F_o(h)|}$, where F_o and F_c are the observed and calculated structure-factor amplitudes, respectively.

^c R_{free} was calculated with 5% of the data excluded from the refinement.

^dRoot-mean square-deviation from ideal values.

Resultados y Discusión

El apartado de Resultados y Discusión se dividió en este trabajo en cuatro capítulos cada uno encaminado hacia los objetivos particulares planteados en el proyecto.

El **Capítulo 3** versa sobre la trascendental tarea de obtener FOS con alto grado de pureza que pudieran posteriormente ser empleados como moléculas aceptores en los diferentes experimentos realizados a lo largo de este trabajo. El establecimiento de un sistema cromatográfico preparativo 2D (SEC + rpHPLC) complementado con los respectivos análisis estructurales (GC-MS y RMN) permitió establecer un catálogo de estándares de FOS tipo levana a través de la purificación de los productos derivados no solo del sistema bi-enzimática detallado en este capítulo sino también de reacciones desarrolladas con SacB y las variantes generadas en otros capítulos.

Los **Capítulos 4 y 5** se centran en la exhaustiva evaluación de diferentes moléculas aceptoras, FOS tipo levana de distinto tamaño y estructura, dentro de la elongación no procesiva y procesiva de levanas desarrollada por SacB. Datos cinéticos contribuyeron a la caracterización del efecto del tamaño de los aceptores en la dinámica de elongación de levanas. En estos capítulos se aprovecha el gran poder de resolución de carbohidratos y alta sensibilidad que brinda la cromatografía de intercambio aniónico acoplada a detección amperométrica (HPAEC-PAD), de forma que la minuciosa inspección de los perfiles de oligosacáridos permitió la identificación de intermediarios inherentes a cada proceso biosintético y en particular favoreció un mejor entendimiento de la red de reacciones de transferencia involucrada en las primeras instancias del proceso de polimerización de levanas.

Por último, el **Capítulo 6** abarca el estudio estructural de la interacción de SacB y sus moléculas aceptoras, involucrando herramientas bioinformáticas, mutagénesis sitiodirigida y la obtención por primera vez de un complejo cristalográfico enzima-oligosacárido. En conjunto, estos estudios permitieron clarificar el modo de unión de SacB con una auténtica molécula aceptora e identificar sitios de unión de oligosacáridos en zonas alejadas del sitio activo partícipes en la dinámica de elongación de levanas.

Capítulo 3

Purificación e Identificación de FOS tipo levana

Una parte importante en el estudio y empleo de las fructanas es el conocimiento de su composición, estructura y dimensión molecular, lo cual permite un mejor entendimiento de su funcionalidad fisiológica y una adecuada utilización dentro de alimentos y productos farmacéuticos. Particularmente, los FOS poseen una alta demanda como ingredientes funcionales, y se pueden encontrar comercialmente productos y estándares de FOS tipo inulina, que incluyen principalmente compuestos con estructuras lineales con DP de hasta 10. En contraste, no hay disponibilidad comercial de FOS tipo levana, esto derivado de la baja eficiencia en los procesos existentes para su producción. En este tenor, dada la reciente generación de un método de producción enzimática de FOS tipo levana con alto rendimiento, se abre la oportunidad para la generación de estándares de este tipo.

En particular, dentro del marco de este proyecto de investigación se ha planteado obtener productos de alta pureza y en cantidades suficientes, de forma que puedan ser ensayados como moléculas aceptoras en la reacción de transfructosilación desarrollada por SacB. Es así como en este primer capítulo se describe la producción FOS tipo levana mediante el empleo de un proceso bi-enzimático, la purificación de los productos a través de dos técnicas cromatográficas preparativas y el análisis estructural de los productos puros.

3.1. Síntesis bi-enzimática de FOS tipo levana

El proceso de obtención de FOS tipo levana desarrollado por Porras-Domínguez et al. (2014) involucra la participación de actividades levansacarasa y endolevanasa que pueden emplearse en dos conformaciones para generar mezclas de FOS con distinta proporción de glucosa terminal incorporada. Entre dichas variantes, el método secuencial involucra como primera etapa la producción de levana a partir de sacarosa empleando la levansacarasa de *Bacillus subtilis* (SacB) y posteriormente, previa recuperación del polímero por precipitación y diálisis, se realiza la hidrólisis de este producto empleando la endolevanasa de *Bacillus*

licheniformis (LevB1). Este sistema genera una mezcla de FOS con relación fructosa/glucosa (F/G) alrededor de 30 (por cada gramo de glucosa hay 30 g fructosa), relacionado con una posible prevalencia de FOS de la serie Fn. Por otra parte, el método simultáneo emplea ambas actividades enzimáticas al mismo tiempo en una reacción que tiene como sustrato la sacarosa. Con este sistema combinado se obtiene una mezcla de FOS con relación F/G=3, lo que podría indicar un incremento de la cantidad de FOS de la serie GFn sintetizados.

En la Fig. 3.1 se muestra la comparación de los perfiles de FOS sintetizados por las dos variantes del método bi-enzimático. En el perfil cromatográfico de los productos del método secuencial pueden observarse compuestos con DP de hasta 6-7, entre los cuales se ha identificado a la levanobiosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf] como el producto mayoritario (Porrás-Domínguez et al., 2014), lo cual evidencia la actividad endo-hidrolítica de LevB1. En lo que respecta al perfil de productos del método simultáneo, además de la levanobiosa como producto principal puede observarse la presencia de otro producto que puede tratarse de blastosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- α / β -D-Glup] dado su comportamiento cromatográfico en HPAEC-PAD similar al reportado por Homann et al. (2007). Más aún, dentro de este perfil se detecta la presencia de una serie de compuestos (señalados con asteriscos en la Fig. 3.1) no observados en el perfil anterior. No es posible la identificación de los productos dada la no disponibilidad de estándares, por lo cual se investigó la estructura de los FOS sintetizados por ambos métodos a través de su purificación y su posterior derivatización química.

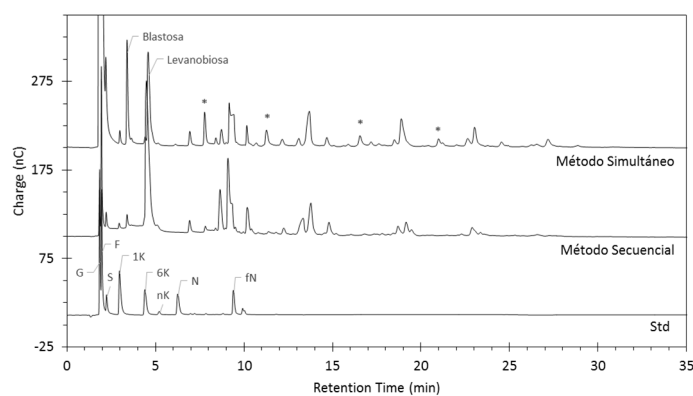


Fig. 3.1 Comparación de los perfiles en HPAEC-PAD de los FOS obtenidos por los dos métodos del sistema bi-enzimático SacB/LevB1. Estándares (Std): glucosa (G), fructosa (F), sacarosa (S), 1-kestosa (1K), 6-kestosa (6K), neo-kestosa (nK), nistosa (N) y fructofuranosil-nistosa (fN).

3.2. FOS del método secuencial

La síntesis de FOS se realiza propiamente en la segunda etapa de este método, en el cual, la levana purificada es sometida a la acción de la endolevanasa LevB1. Para dicha

reacción hidrolítica se empleó 1 U/mL de LevB1 y 200 g/L de levana. A diferencia de lo reportado por Porrás-Domínguez et al. (2014), quienes emplearon una mezcla de LevanB y LevanA, en este trabajo se empleó únicamente LevanB obtenida bajo condiciones de reacción óptimas para su síntesis preferencial dada la especificidad de SacB, estas son 400 g/L de sacarosa, 5 U/mL de enzima, 25°C. Después de 3 h a 37°C, la reacción hidrolítica dio como rendimiento alrededor de 90% de FOS y 10% de fructosa libre. Los productos de reacción se purificaron en primera instancia mediante cromatografía de exclusión molecular preparativa (SEC), lo cual permitió obtener fracciones de FOS con distinto DP (Fig. 3.2). Tomando como referencia la elución de FOS tipo inulina comerciales con DP entre 2 y 7, se determinó que las fracciones Se2, Se3, Se4, Se5, Se6 y Se7 corresponden a compuestos con DP de 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente. La correcta separación de las fracciones se corroboró por TLC (Fig. 3.2-B). La determinación del DP se realizó por TLC teniendo como base FOS del tipo inulina. Asimismo, se determinó que la fracción Se2 constituye casi la mitad de los productos obtenidos y corresponde al disacárido levanososa; mientras que para compuestos de mayor tamaño el rendimiento disminuyó desde un 25% para la fracción de DP3 hasta menos del 1.3% para compuestos de DP6 y DP7 (Fig. 3.2-C).

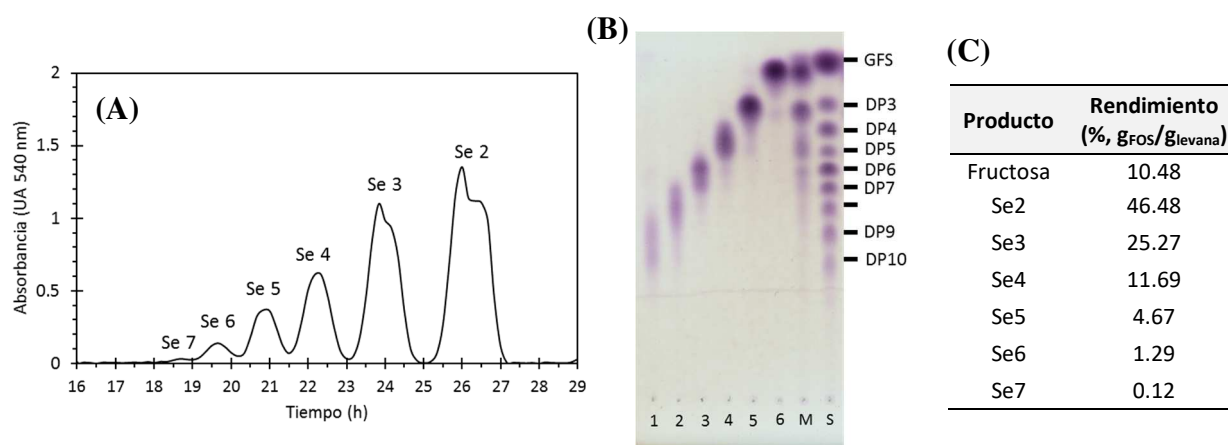


Fig. 3.2 Separación mediante SEC de FOS obtenidos en el método bi-enzimático secuencial. (A) Perfil de elución en SEC. (B) TLC de las fracciones separadas. Carril S: Estándar de inulinas DP3-DP10, M: Mezcla de FOS sintetizados, 1: Fr. Se7 / 2: Fr. Se6 / 3: Fr. Se5 / 4: Fr. Se4 / 5: Fr. Se3 / 6: Fr. Se2. (C) Tabla de rendimientos.

Como segunda etapa de purificación se desarrolló HPLC preparativa de fase reversa (rpHPLC) de las fracciones Se2-Se7. La Fig. 3.3 muestra una variedad de componentes constituyentes de cada fracción, lo cual pone en evidencia la obtención de isómeros que pueden tener distinta composición (compuestos con o sin glucosa) o distinto tipo de enlace (β 2-6 ó β 2-1). La comparación con estándares mediante HPAEC-PAD permitió identificar únicamente al compuesto Se3-A como el trisacárido 6-kestosa [β -D-Fruf-(2→6)- β -D-Fruf-(2→1)- α -D-Glup]. El resto de los compuestos purificados, aquellos que se obtuvieron en

cantidades por arriba de 5 mg, fueron derivatizados a acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA) y analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

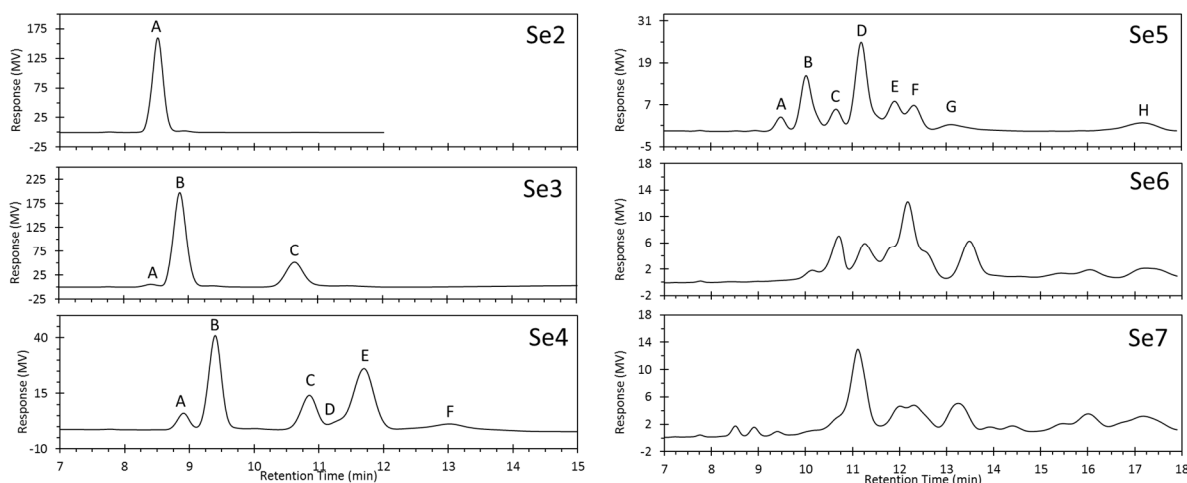


Fig. 3.3 Separación en rHPLC de los FOS del método bi-enzimático secuencial. Las fracciones Se2-Se7 corresponden a las recolectadas tras la separación en SEC.

La Tabla 3, resume la cantidad de cada tipo de residuos β -D-fructosa y α -D-glucosa, presentes en los compuestos purificados, derivatizados a PMAA y analizados en GC-MS. Los valores se presentan como porcentajes a partir de las áreas de las señales obtenidas por GC-MS. Los cromatogramas de corriente iónica total (TIC) de todos los compuestos analizados en GC-MS se incluyen como evidencia en el Anexo B. GC-MS de FOS tipo levana. Entre los productos, el único disacárido detectado (Se2-A) está constituido por dos unidades de fructosa enlazada por un enlace $\beta(2-6)$, corroborándose su identidad como β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-D-Fruf (levanobiosa). Es de hacer notar que la derivatización de la fructosa del extremo reductor (enlazada en C6) de la levanobiosa da un PMAA similar al generado por una fructosa interna enlazada en C2 y C6. Dentro de los trisacáridos, los compuestos Se3-B y Se3-C están constituidos por únicamente unidades de fructosa y fueron identificadas como los trisacáridos levanotriosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-D-Fruf] y un oligofructósido mixto que contiene un enlace $\beta(2-6)$ y uno $\beta(2-1)$, respectivamente. En un ensayo complementario, se observó que el compuesto Se3-C, a diferencia de Se3-B, no es susceptible a la actividad exo-levanasa de SacB (Méndez-Lorenzo et al., 2015). Dado que SacB no es capaz de hidrolizar enlaces $\beta(2-1)$, la resistencia del oligosacárido a la hidrólisis por SacB puede ser indicativo de la ubicación del enlace $\beta(2-1)$ en el extremo no-reductor, y por ello, el compuesto Se3-C fue identificado como β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-D-Fruf (6,1-fructotriosa). El nombre propuesto para Se3-C indicado entre paréntesis y los

asignados más adelante a oligofructósidos mixtos y ramificados se proponen con base en la nomenclatura de Chatterton & Waterhouse para FOS con glucosa inicial (Lewis, 1993a), considerando para ello a la fructosa del extremo reductor como iniciador de la numeración.

Tabla 3 Porcentaje (%) y número (n) por molécula de residuos β -D-fructosa y α -D-glucosa de los FOS del método secuencial.

		Se2-A		Se3-B		Se3-C		Se4-A		Se4-B		Se4-C		Se4-D	
		%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
β -D-Fru	2-Linked	56	1.0	34	1.0	43	1.0	28	1.0	29	1.3	25	1.0	34	1.0
	2,6-Linked	44	0.8	65	1.9	30	0.7	56	2.0	68	3.0	45	1.8	30	0.9
	2,1-Linked					28	0.7					30	1.2	20	0.6
	2,1,6-Linked													2	0.1
α -D-Glc	1-Linked			2	0.1			16	0.6	3	0.1			13	0.4
	1,6-Linked														
		Se4-E		Se4-F		Se5-A		Se5-B		Se5-D		Se5-E		Se5-G	
		%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n
β -D-Fru	2-Linked	58	2.0	31	1.3	21	1.0	20	0.8	18	0.8	38	1.7	46	2.0
	2,6-Linked	26	0.9	23	1.0	62	3.0	72	3.0	47	2.0	46	2.0	45	2.0
	2,1-Linked			46	2.0			2	0.1	20	0.8	3	0.1		
	2,1,6-Linked	16	0.5									11	0.5	9	0.4
α -D-Glc	1-Linked					17	0.8	6	0.2	15	0.6	2	0.1		
	1,6-Linked														

Dentro de las fracciones con DP4, se identificó la presencia de una glucosa terminal en los tetrasacáridos Se4-A y Se4-D, identificándolos como 6,6-kestotetraosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-Glup] y 1,6-kestotetraosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-Glup] de acuerdo con la nomenclatura sistemática propuesta por Waterhouse & Chatterton, también denominados 6,6-nistosa y 1,6-nistosa (Lewis, 1993a). El compuesto Se4-B contiene 4 fructosas con únicamente enlaces β (2-6) y fue identificado como levanotetraosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-D-Fruf]. Los compuestos Se4-C y Se4-F contiene 4 fructosas con uno y dos enlaces β (2-1) dentro de su estructura. Se4-C es hidrolizable por SacB y rinde Se3-C y fructosa como productos, por ello fue identificado como β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-D-Fruf (6,1,6-fructotetraosa). Se4-F no es hidrolizable por SacB y puede por tanto contener dos estructuras con uno o dos enlaces β (2-1) consecutivos en el extremo no reductor: β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)-D-Fruf (1,6,1-fructotetraosa) ó β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-D-Fruf (6,1,1-fructotetraosa). Por último, la derivatización del tetrasacárido Se4-E arrojó la presencia de una fructosa enlazada en sus C1, C2 y C6, elemento

indicativo de un punto de ramificación, por ello este producto fue identificado como la oligolevana ramificada β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-[β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)-] β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-D-Fruf (1&6-*levanotetraosa*). Es de hacer notar que la abundancia del PMAA indicativo de la fructosa tri-enlazada no alcanza la unidad porcentual en el análisis hecho para Se4-E (Tabla 3). Este fenómeno se observó también en los análisis de otros compuestos con estructuras ramificadas y puede deberse a pérdidas por volatilidad de este PMAA.

Por último, en el grupo de los pentasacáridos, se identificaron a los compuestos Se5-A, Se5-B, Se5-D como 6,6,6-kestopentaosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-Glup], levanopentaosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-D-Fruf] y 1,6,6-kestopentaosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-Glup], respectivamente. Los compuestos Se5-E y Se5-G se identificaron como estructuras ramificadas por la presencia de una fructosa tri-enlazada. La hidrólisis de Se5-E por SacB deriva en la aparición de Se4-E, de modo que dos estructuras pueden proponerse para este pentasacárido (ver Fig. 3.4). Por otro lado, Se5-G no es hidrolizable por SacB, esta propiedad es compartida con Se4-E, y por ello se propone que el pentasacárido Se5-G posee la estructura de β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-(β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)-) β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-D-Fruf (6;1&6-*levanopentaosa*). Lo anterior permite establecer que la ubicación del punto de ramificación en la fructosa anterior a la terminal impide la acción exo-hidrolítica de SacB, esto corrobora reportes en los que se ha observado la incapacidad de SacB para hidrolizar completamente levanas y que es atribuido a la presencia de puntos de ramificación (Méndez-Lorenzo et al., 2015). Finalmente, no fue posible obtener las fracciones Se5-C, Se5-F y Se5-H en cantidades suficientes o lo suficientemente puras para su análisis y por ello no se logró su identificación.

La Fig. 3.4 muestra las estructuras propuestas para los FOS identificados, que de acuerdo con su composición y estructura se clasificaron en 5 grupos:

- *6K-FOS* (serie GF_n): productos Se4-A y Se5-A. Contienen una molécula de sacarosa inicial (GF_n) y fructosas con enlaces β 2-6. Estos compuestos forman parte de la serie de FOS tipo levana por excelencia.
- *1K-FOS* (serie GF_n): productos Se4-D y Se5-D. Contienen una molécula de sacarosa inicial seguida de una fructosa con enlace β 2-1 y fructosas subsecuentes con enlaces β 2-6.
- *Oligolevanas lineales* (serie F_n): productos Se2-A, Se3-B, Se4-C y Se5-C. Contienen únicamente moléculas de fructosa unidas con enlaces β 2-6.

- *Oligolevanas ramificadas* (serie F_n): productos Se4-E, Se5-E y Se5-G. Contienen únicamente moléculas de fructosa con enlaces β2-6 y un punto de ramificación, esto es, una fructosa que bifurca la estructura al estar enlazada en las posiciones 1 y 6.
- *Oligofructósidos mixtos* (serie F_n): productos Se3-C, Se4-C, Se4-F. Contienen únicamente moléculas de fructosa con enlaces β2-6 y β2-1.

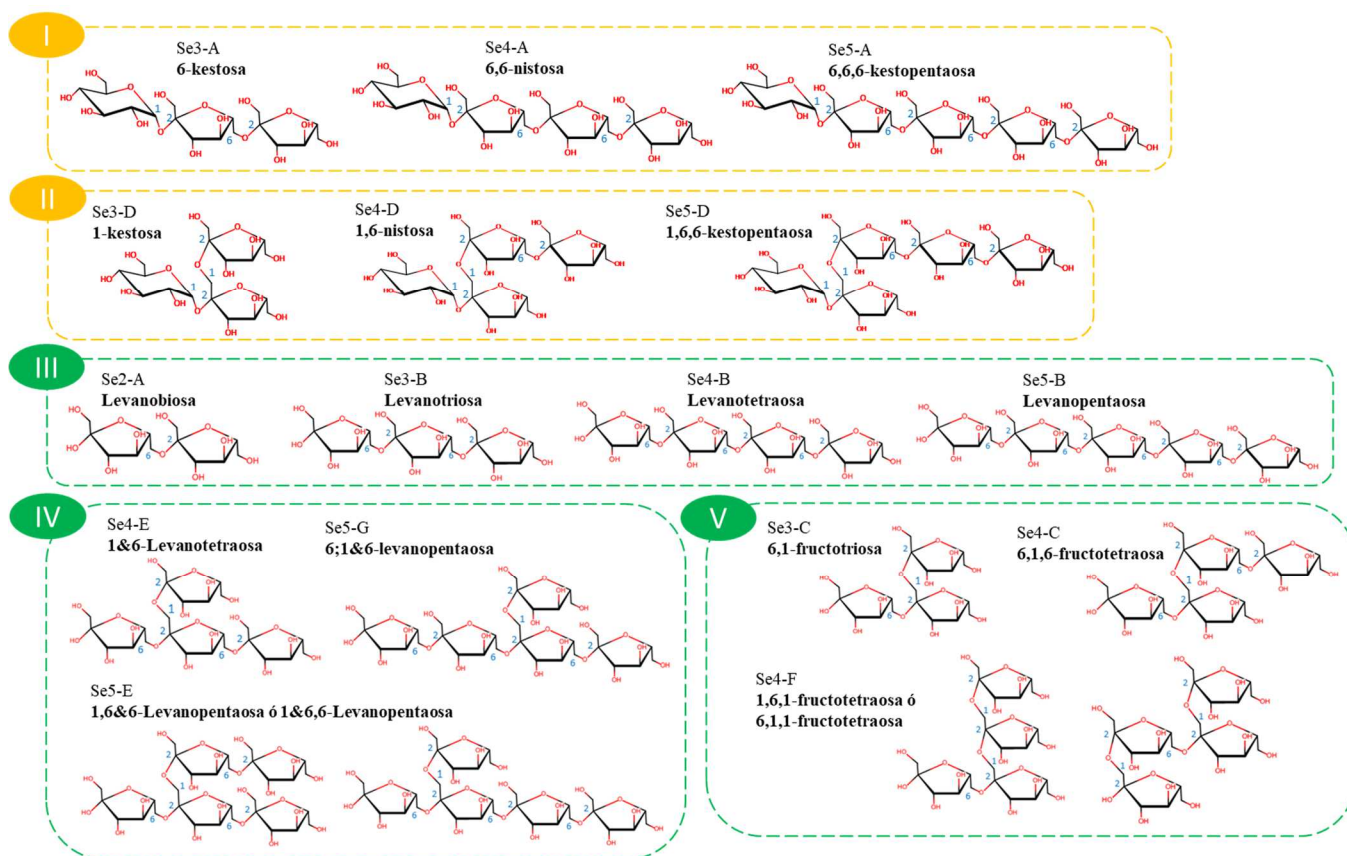


Fig. 3.4 Estructuras propuestas para los FOS derivatizados a PMAA y analizados por GC-MS. Los 16 compuestos purificados fueron clasificados en cinco grupos, dos de ellos contienen una glucosa inicial (rectángulos en amarillo) y los otros tres carecen del grupo glucosilo (rectángulos en verde): I) 1K-FOS, II) 6K-FOS, III) Oligolevanas, IV) Oligolevanas ramificadas y V) Oligofructósidos mixtos.

Como era de esperarse, dado que se emplea una actividad endolevanasa, los principales productos del método secuencial fueron oligolevanas y oligofructósido (FOS que carecen de glucosa inicial) con DP menores a 7. Las oligolevanas lineales pueden derivarse de los cortes endolíticos que es capaz de realizar LevB1 sobre las ramas de LevanB (levana empleada como sustrato); mientras que las oligolevanas ramificadas y los oligofructósidos mixtos pueden tener su origen en cortes endolíticos en puntos cercanos a los puntos de ramificación presentes en la estructura del sustrato. En menor cantidad se observó la formación de FOS con glucosa inicial que se clasificaron en dos grupos (6K-FOS ó 1K-FOS) de acuerdo con el

trisacárido que contienen en su estructura, 6-kestosa ó 1-kestosa. Como se explica en el Capítulo 4, la levansacarasa SacB emplea estos dos trisacáridos como iniciadores de las cadenas de levanas que conforman LevanB, durante su síntesis a partir de sacarosa. Debido a esto, los 1K-FOS y 6K-FOS identificados en este apartado deben corresponder a los restos de la fracción inicial de LevanB después de sus hidrólisis por la endolevanasa LevB1.

3.3. FOS del método simultáneo

El método bi-enzimático simultáneo se desarrolló empleando 100 unidades de actividad levansacarasa por cada unidad de actividad endolevanasa, teniendo 600 g/L de sacarosa como sustrato. Después de reaccionar SacB y LevB1 con sacarosa por 7 h a 37°C, alrededor del 80% de sacarosa fue consumida con una relación hidrólisis/transferencia global de 26/74; el valor de hidrólisis incluye la cantidad de fructosa libre derivada de la acción hidrolítica de ambas enzimas.

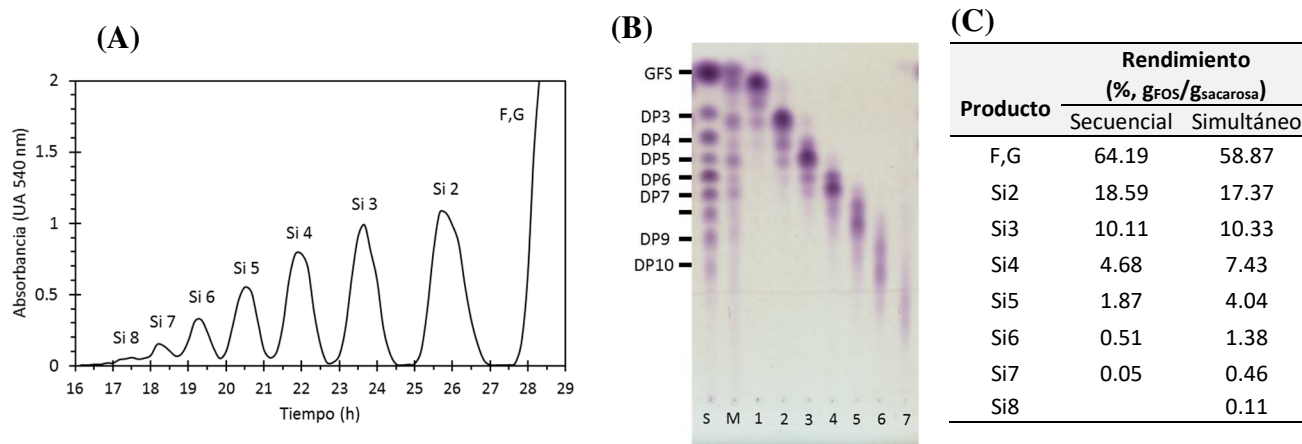


Fig. 3.5 Separación mediante SEC de FOS obtenidos en el método bi-enzimático simultáneo. (A) Perfil de elución en SEC. (B) Análisis en TLC de las fracciones separadas. Carril S: Estándar de inulinas DP3-DP10, M: Mezcla de FOS sintetizados, 1: Fr. Se2 / 2: Fr. Se3 / 3: Fr. Se4 / 4: Fr. Se5 / 5: Fr. Se6 / 6: Fr. Se7 / 7: Fr. Se8. (C) Tabla de rendimientos.

La Fig. 3.5-A muestra la separación por SEC de los productos de reacción, determinándose que el DP de las fracciones Si2, Si3, Si4, Si5, Si6, Si7 y Si8 son de 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente. La correcta separación de los componentes se verificó por TLC (Fig. 3.5-B). Nuevamente se determinó que los FOS en mayor proporción son aquellos con DP2 con un 17% del total de la sacarosa empleada, mientras que la abundancia de productos más grandes decae consiguiéndose el 10% para los FOS con DP3, el 7% para FOS DP4, 4% para FOS DP5 y 2% para aquellos con DP mayor a 5 (Fig. 3.5-C). Con fines comparativos se estimaron los rendimientos en términos de sacarosa para los FOS obtenidos mediante el

método secuencial, considerando para la etapa de síntesis de LevanB una relación hidrólisis/transferencia de 20/80. Como puede observarse en la Fig. 3.5-C existen rendimientos similares para los FOS DP2 y DP3 en ambos métodos, sin embargo, el método simultáneo ofrece mejores rendimientos para los FOS de mayor tamaño. Por ejemplo, el método simultáneo rinde FOS con DP4 y DP5 en 7% y 4% respectivamente, dichos valores son casi el doble de los obtenidos con el método secuencial.

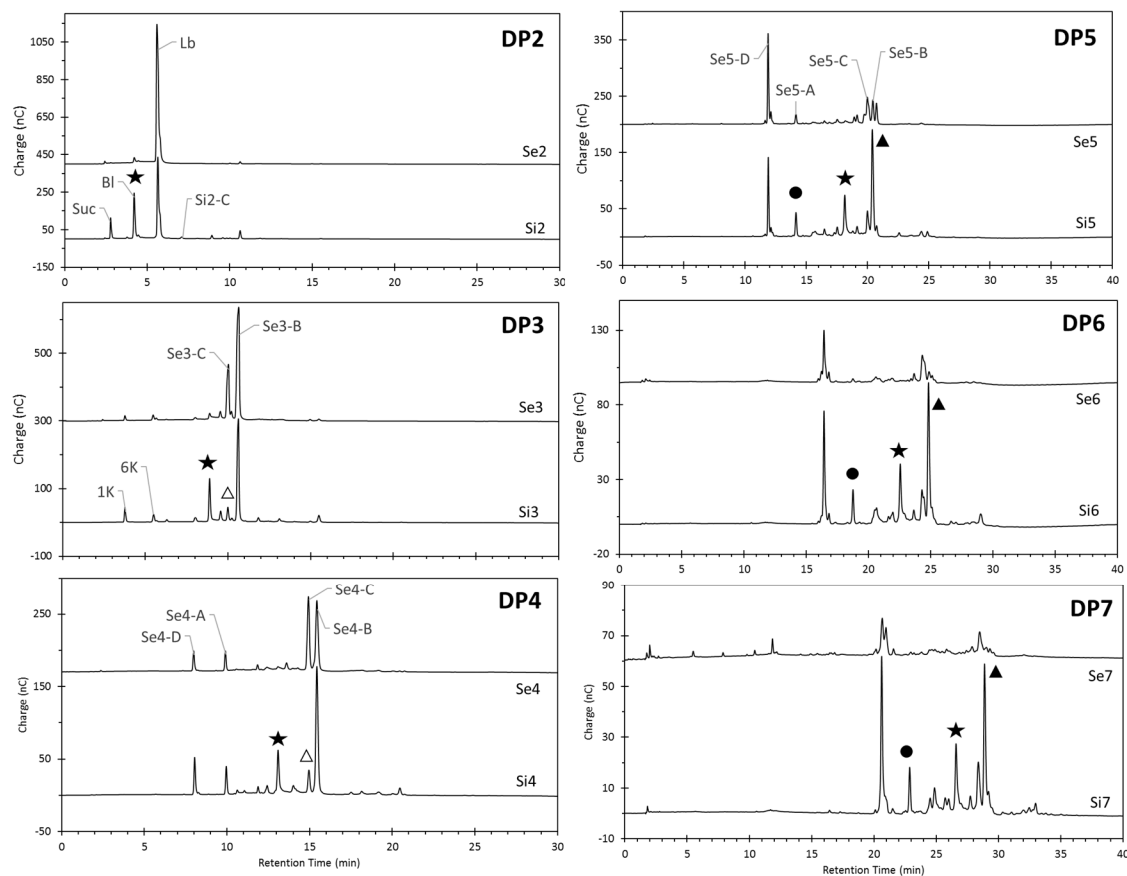


Fig. 3.6 Comparación de los perfiles en HPAE-PAD de las fracciones obtenidas durante la separación por SEC de los FOS del método bi-enzimático secuencial y simultáneo. Se#: fracciones del método secuencial, Si#: fracciones del método simultáneo. Dentro de los productos del método simultáneo se señalan aquellos que se generan en menor proporción (triángulos blancos: oligolevanas mixtas), aquellos en mayor proporción (círculos: 6K-FOS y triángulos negros: oligolevanas) y aquellos únicos en la reacción simultánea (estrellas: blasto-FOS). Suc: sacarosa, BI: blastosa, Lb: levanobiosa, 1K: 1-kestosa, 6K: 6-kestosa.

El análisis en HPAEC-PAD de las fracciones de distinto DP obtenidas en SEC se muestra en la Fig. 3.6, y con fines comparativos se incluyen también los perfiles correspondientes a los FOS del método secuencial. La mayoría de los compuestos ya identificados entre los FOS del método secuencial también son generados en la reacción simultánea sobre sacarosa, diferenciándose en la proporción en que se acumulan. En este sentido, en la reacción simultánea puede observarse una menor proporción de los compuestos 1,6-levanotriosa y

1,6,6-levanotetraosa (Se3-C y Se4-C, marcados con triángulos blancos), y en contraste, una mayor proporción de FOS con DP mayor a 4 de las series de oligolevanas (Se5-B y superiores marcados con triángulos negros) y 6K-FOS (Se5-C y superiores marcados con círculos negros). Esta última observación se extiende para las oligolevanas y 6K-FOS de las fracciones de DP 6 y 7 debido a que la identificación puede realizarse considerando el orden de elución de las series (1K-FOS < 6K-FOS < oligolevana). De mayor relevancia es la observación de una serie de productos exclusivos del método simultáneo dentro de cada una de las fracciones de distinto DP (marcados con estrellas), incluyendo la blastosa dentro de los productos con DP2.

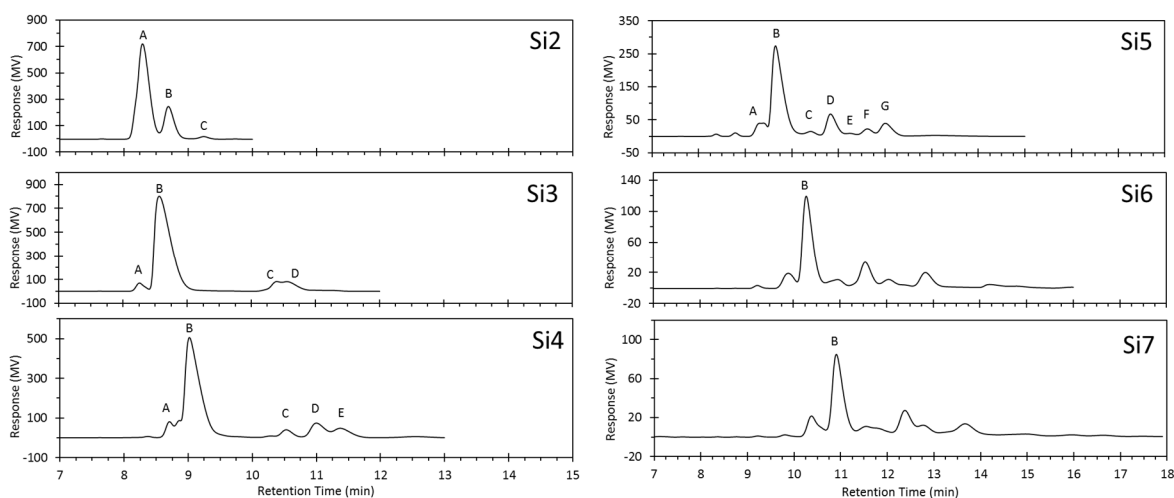


Fig. 3.7 Perfil de elución en rpHPLC de las fracciones obtenidas en SEC para los FOS del método simultáneo.

Con el fin de analizar por separado los nuevos compuestos la reacción simultánea, las fracciones de distintos DP fueron ahora sometidas a rpHPLC (Fig. 3.7). Dentro de los perfiles de elución, se observa que este método permite la acumulación de más de un producto disacárido, los principales entre ellos son la levanobiosa y la blastosa que fueron identificados mediante análisis en HPAEC-PAD en las fracciones Si2-A y Si2-B, respectivamente. Se encontró, además, que la sacarosa no convertida durante la reacción coeluye con la blastosa dentro de la fracción de Si2-B. Adicionalmente, un tercer disacárido fue aislado en la fracción Si2-C. El análisis en GC-MS de este compuesto derivatizado (Fig. 3.8 y Tabla 4) arrojó la presencia de 2-O-acetil-3,4,6-tri-O-methyl-D-glucopiranosidos (Picos 1 y 2), PMAAs indicativos de una glucosa enlazada en su C2. Con esto, el compuesto Si2-C fue identificado como β -D-Fruf-(2 \rightarrow 2)- α / β -D-Glup, el isómero β (2-2) de la sacarosa denominado en este trabajo *Ercosa*.

Con respecto a los trisacáridos, el perfil SEC de la fracción Si3 (Fig. 3.7) contiene un compuesto extra (Si3-C) a los encontrados en la fracción Se3 que fue identificado como 1-kestosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-Glup]. También se observa que las fracciones de mayor tamaño (Si4-Si7) presentan perfiles similares a los obtenidos en la separación de los FOS del método secuencial en cuanto al número de picos. Sin embargo, se diferencian en que las fracciones del método simultáneo poseen un componente mayoritario, siendo el componente B el de mayor abundancia dentro de cada fracción (Si3-B, Si4-B, Si5-B, Si6-B, Si7-B).

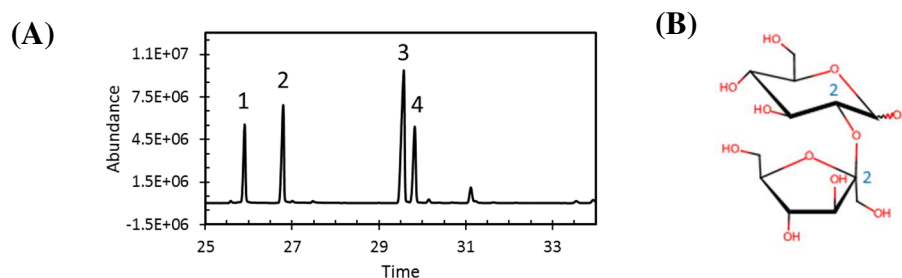


Fig. 3.8 Análisis en GC-MS del producto Si2-C (Ercosa). (A) TIC del producto derivatizado a PMAA y (B) estructura propuesta.

Tabla 4 PMAAs identificados en la derivatización del compuesto Si2-C (Ercosa)

Picos ^a	Tr ^a	Compuesto derivado	Tipo de enlace	Patrón de Fragmentación ^b
1, 2	25.9 26.8	2-O-acetil-3,4,6-tri-O-methyl-D-glucopiranosido	2-linked-Glu	75 (100), 74 (68), 71 (67), 88 (63), 101 (56)
3, 4	29.9 30.2	2,5-di-O-acetil-1,3,4,6-tetra-O-metil-manitol/glucitol	2-linked Fru	129 (100), 161 (79), 87 (22), 101 (19), 145 (10), 71 (10), 130 (7), 162 (6), 74 (5)

^a Orden de elución y tiempo de retención (Tr) en la Fig. 3.8.

^b m/z (Abundancia Relativa, %).

Los componentes B fueron recolectados, encontrándose por HPAEC-PAD que cada uno corresponde a dos compuestos que coeluyen, uno de los cuales es la oligolevana correspondiente al DP de la fracción en SEC (Fig. 3.9-A). Los compuestos adicionales corresponden a los observados en primera instancia como exclusivos del método simultáneo (Fig. 3.1). Debido a que no fue posible separarlos, la identidad de los compuestos desconocidos fue revelada a través de la derivatización a PMAA conjunta de los pares contenidos en las fracciones Si3-B, Si4-B y Si5-B (Fig. 3.9-B). Los análisis en GC-MS de estos pares de productos (Fig. 3.9-B y Tabla 5) contienen señales provenientes de fructosas terminales (picos 3 y 4) y fructosas en enlaces β 2-6 (picos 5 y 6), estos componentes son

esperados debido a la presencia de una oligolevana dentro del par de compuestos. Sin embargo, el patrón de fragmentación de dos picos adicionales (picos 1 y 2), indica la presencia de un α -glucopiranosido terminal enlazado en posición 6. El fragmento base de estas moléculas tiene m/z 88 con dos fragmentos prominentes de m/z 101 y m/z 75 (Tabla 5). Señales similares se encontraron en la derivatización de la blastosa, cuyo TIC muestra los compuestos 1 y 2 representativos de su glucosa reductora terminal y los compuestos 3 y 4 indicativos de su fructosa no reductora terminal (Fig. 3.9-B). Con base a lo anterior se propone que los compuestos característicos del método simultáneo corresponden a FOS que tienen a la blastosa en lugar de la sacarosa como base estructural y por ello se denominaron *Blasto-FOS*. Las estructuras propuestas para estos compuestos se presentan en la Fig. 3.9-C.

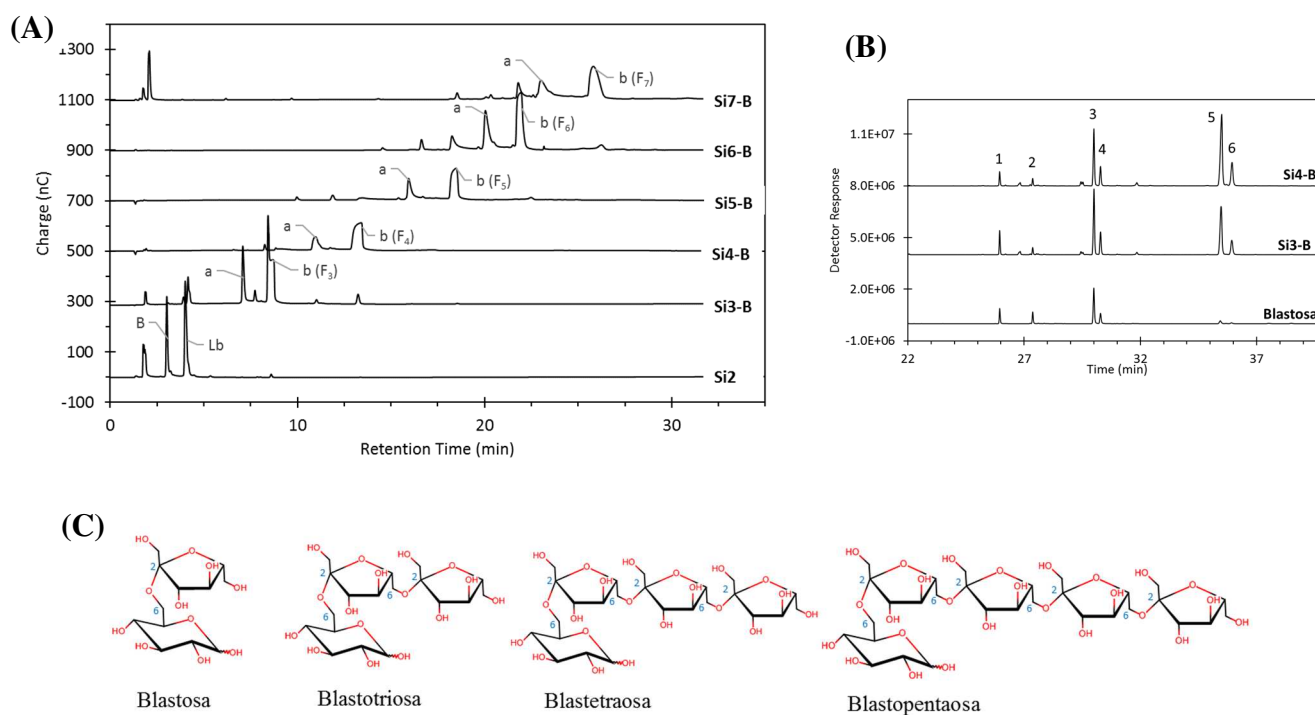


Fig. 3.9 Análisis en HPAEC-PAD y GC-MS de FOS exclusivos del método simultáneo. (A) HPAEC-PAD de los picos B obtenidos durante la separación por SEC. (B) TIC de los FOS derivatizados a PMAA. (C) Estructuras propuestas para los Blasto-FOS.

Tabla 5 PMAA identificados en la derivatización de las fracciones de Se3-B, Si3-B, Si4-B y blastosa.

Picos ^a	Tr ^a	Compuesto derivado	Tipo de enlace	Patrón de Fragmentación ^b
1, 2	25.6 27.3	6-O-acetil-1,2,3,4-tetra-O-methyl-D-glucopiranosido	6-linked Glu	88 (100), 101 (50), 75 (32), 73 (14), 89 (7), 87 (6), 71 (5), 177 (3), 59 (3), 127 (3)

3, 4	29.9 30.2	2,5-di-O-acetil-1,3,4,6-tetra- O-metil-manitol/glucitol	2-linked Fru	129 (100), 161 (79), 87 (22), 101 (19), 145 (10), 71 (10), 130 (7), 162 (6), 74 (5), 89 (5)
5, 6	35.4 35.9	2,5,6-tri-O-acetil-1,3,4-tri- O-metil-manitol/glucitol	2,6-linked Fru	129 (100), 161 (44), 87 (26), 189 (18), 99 (12), 101 (11), 130 (7), 71 (7), 145 (6), 74 (4)

^a Orden de elución y tiempo de retención (Tr) en la Fig. 3.9.

^b m/z (Abundancia Relativa, %).

3.4. Efecto del sinergismo SacB/LevB en la síntesis de FOS tipo levana

La principal diferencia entre los productos obtenidos entre las dos conformaciones del método bi-enzimático estudiado es la síntesis de blastosa y blasto-FOS observada únicamente durante la acción concertada de ambas enzimas. La formación de blastosa ha sido reportada durante la reacción polimérica de SacB y de otras levansacarosas como producto de la hidrólisis del trisacárido neo-kestosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-(β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-)D-Glup], uno de los primeros productos de transferencia sobre la sacarosa (Homann et al., 2007; Iizuka, Mima, Ammar, Ito, & Minamiura, 2002) o también como una posible reacción de transferencia sobre glucosa libre (Feingold, Avigad, & Hestrin, 1956). También se ha determinado que la neo-kestosa es capaz de actuar como donador para formar levana empleando extractos de *Aerobacter levanicum*, liberándose blastosa como subproducto (Hestrin et al., 1956). Dado que este disacárido no es capaz de actuar como donador, se sugirió que para la formación de levana a partir de neo-kestosa la levansacarasa actúa directamente sobre este trisacárido como molécula aceptora. Sin embargo, como se detallará en el capítulo 4 de este trabajo, la blastosa puede actuar como molécula aceptora durante la síntesis de levanas que desarrolla SacB a partir de sacarosa, dando lugar a la formación de una serie completa de FOS (DP>10) derivados de la blastosa. En el caso de la acción conjugada SacB/LevB1, la endolevanasa podría estar actuando sobre las levanas en crecimiento, evitando la formación de productos de gran tamaño y favoreciendo una mayor acumulación de cadenas *de novo* sintetizadas por la levansacarasa, entre las cuales se incluirían los blasto-FOS. Adicionalmente, dado que en la reacción simultánea también permanece la glucosa liberada por hidrólisis de sacarosa y que llega a ser junto con la fructosa más de la mitad de la mezcla final de productos, esta molécula también podría estar sujeta a reacciones de transferencia que dieran lugar a una mayor acumulación de blastosa y sus derivados.

Por otro lado, menos sorprendente resulta las síntesis de oligolevanas, FOS que carecen de glucosa terminal y en cambio poseen una fructosa terminal reductora, como productos predominantes en las dos conformaciones del método enzimático estudiado. Lo anterior

debido a que la actividad endolítica de LevB1 sobre la levana de bajo peso molecular genera principalmente levanobiosa y fructosa como un subproducto importante. En el caso de la reacción simultánea, la generación de las oligolevanas se ve aún más favorecida por la acumulación de fructosa en el medio de reacción, molécula que se ha demostrado es capaz de actuar como aceptora incluso en la propia síntesis de levanas por SacB (Rapoport et al. 1966; este trabajo, capítulo 4).

3.5 CONCLUSIONES

Las variantes del sistema bi-enzimático SacB-LevB1 evaluadas en este trabajo presentaron similares perfiles estructurales de los FOS sintetizados. Un total de 17 productos fueron purificados, en los cuales se corroboró la presencia de enlaces β 2-6 principalmente, y por tanto su naturaleza tipo levana. Las diferencias estructurales de los productos, tales como la inclusión de glucosa inicial, enlaces β (2-1) o puntos de ramificación, llevó a clasificarlos dentro de 6 grupos: oligolevanas lineales, oligolevanas ramificadas, oligofructósidos mixtos dentro de la serie Fn, y 6K-FOS, 1K-FOS y blasto-FOS de la serie GFn. Como era de esperarse, dado que se empleó una actividad endolevanasa, los principales productos fueron oligolevanas con DP menores a 7 en ambas conformaciones del sistema bi-enzimático. La principal diferencia entre los productos, fue la proporción de glucosa incorporada en los FOS sintetizados, siendo los FOS del método simultáneo los que tuvieron una mayor composición de glucosa. Lo anterior debido a que el sinergismo de SacB/LevB1 deriva en una mayor acumulación de blastosa y una nueva serie de FOS (blasto-FOS), no reportada hasta ahora.

El trabajo realizado en este primer apartado permitió la estandarización de una metodología de cromatografía preparativa (SEC-rpHPLC) para la purificación de FOS y, en primera instancia, la obtención de estándares de productos asociados a la acción de la enzima modelo (SacB), así como de sustratos con alto grado de pureza para las reacciones de acepto planeadas. Esta misma metodología fue también empleada para la obtención de productos derivados de reacciones enzimáticas adicionales al proceso bi-enzimático aquí señalado.

Capítulo 4

Estudio de aceptores inherentes al Mecanismo No Procesivo: Síntesis de LevanB²

Se ha propuesto que la levansacarasa de *Bacillus subtilis* genera sus productos poliméricos, LevanA y LevanB, a través de dos procesos distintos y mecanismos esencialmente diferentes (Raga-Carbajal et al., 2016). Considerando lo anterior, la participación de las moléculasceptoras dentro de uno u otro mecanismo, así como las interacciones enzima-aceptor pueden llevarse a cabo de distinta forma. Por lo anterior, se decidió estudiar primeramente la participación de moléculas aceptores en el contexto de un mecanismo no procesivo, como es el propuesto para la síntesis de LevanB (Fig. 4.1). Este mecanismo se entiende como un proceso cíclico de captación de la molécula aceptora y liberación al medio de reacción una vez que se le ha transferido el grupo fructosilo.

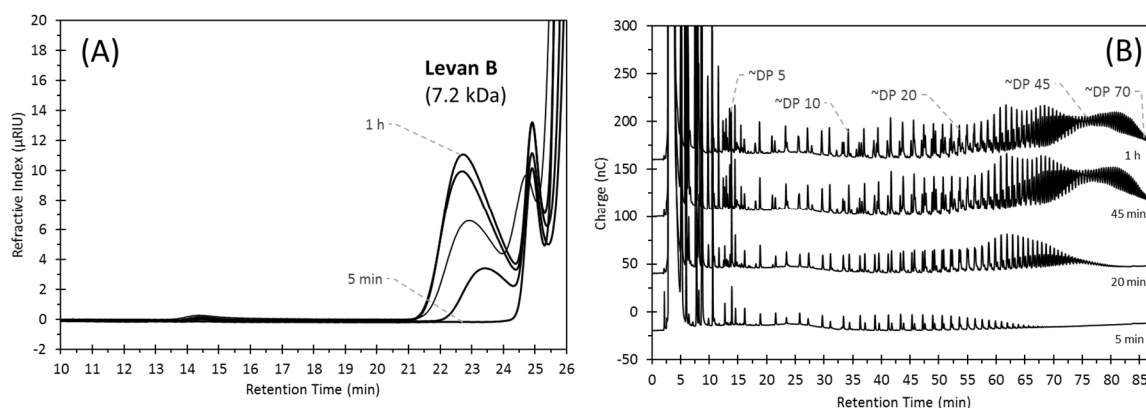


Fig. 4.1 Síntesis no procesiva de LevanB monitoreada por GPC(A) y HPAEC-PAD (B). Condiciones de Reacción: SacB $1 \mu\text{M}$ ($55 \mu\text{g/mL}$, 10 U/mL), Sacarosa 100 g/L , 37°C .

En la literatura pueden encontrarse reportes en los que se evalúa la especificidad de levansacarasas hacia moléculasceptoras exógenas de distinta naturaleza en reacciones denominadas *reacción de aceptor*. En este capítulo, se presenta el estudio de múltiples

²Algunos resultados de este capítulo fueron publicados en el artículo: Understanding the transfer reaction network behind the non-processive synthesis of low molecular weight levan catalyzed by *Bacillus subtilis* levansucrase (2018) Raga-Carbajal E., López-Munguía A., Álvarez L. and Olvera C. *Scientific Reports*. 8, 15035.

reacciones de aceptor con distintos productos de SacB purificados y algunos derivados del capítulo anterior. Esto permitió la identificación, evaluación y caracterización cinética de moléculasceptoras inherentes a la reacción, esto es, de moléculas que son productos pero que también pueden actuar como sustrato *intermediario* dentro de la reacción de polimerización que desarrolla SacB a partir de sacarosa.

4.1 La síntesis de LevanB involucra distintas moléculas iniciadoras

Reportes de hace más de 50 años evidenciaban ya la generación de FOS de distintas estructuras durante la síntesis de levanas por las LSs de *A. levanicum* y *B. subtilis* (Feingold et al., 1956; Rapoport et al., 1966), sin embargo, los métodos analíticos de aquel entonces permitieron observar e identificar solo una pequeña parte de dichos intermediarios.

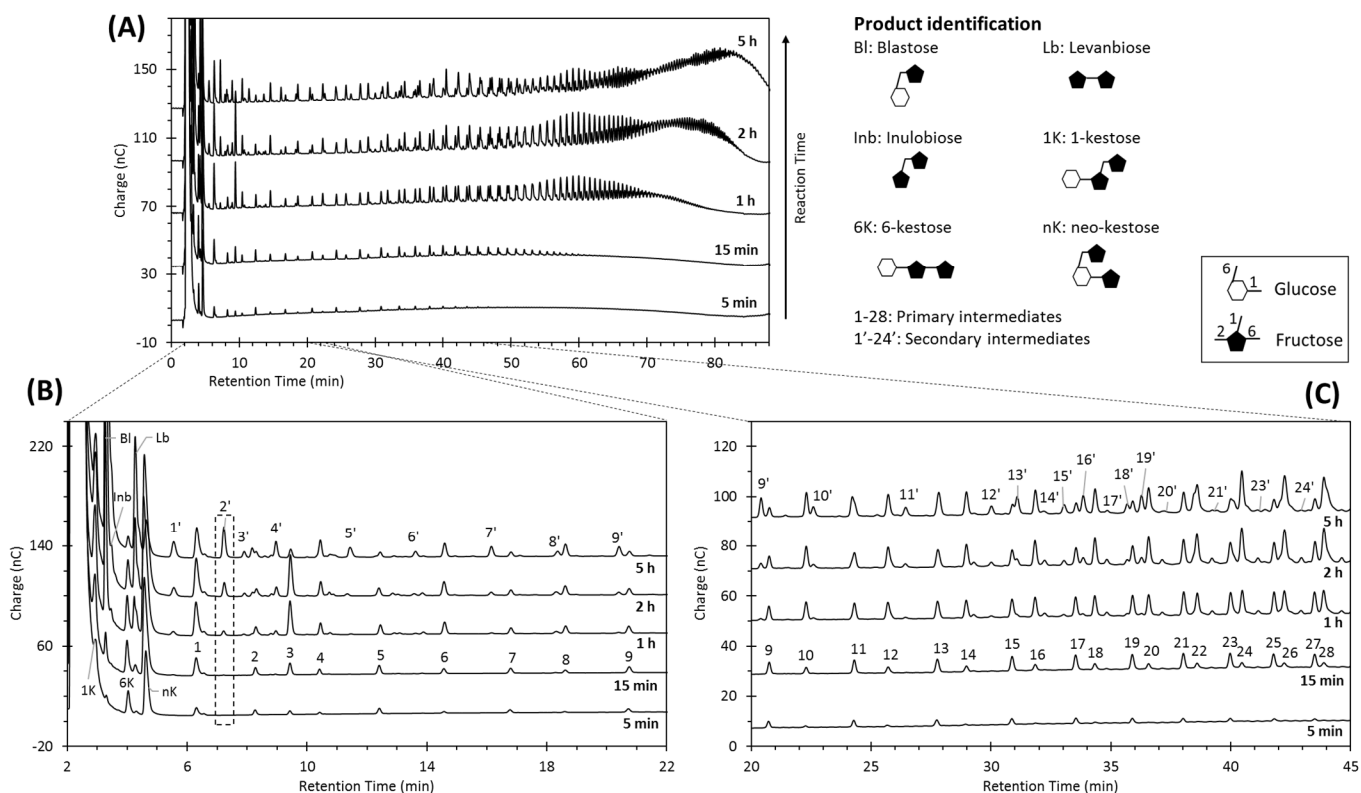


Fig. 4.2 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante la síntesis no procesiva de levanas desarrollada por SacB. Condiciones de reacción: 0.5 μM de SacB, 100 g/L de sacarosa, 25°C. Los cromatogramas inferiores corresponden a partes amplificadas del cromatograma superior. Dentro de los productos no identificados, los intermediarios primarios (1-28) se forman desde los primeros minutos de reacción, mientras que los intermediarios tardíos (1'-24') emergen después de 1 hora de reacción.

Actualmente, el análisis por HPAEC-PAD nos ha permitido observar que la síntesis de LevanB se lleva a cabo no procesivamente a través de la liberación al medio de reacción de cada uno de los productos de transferencia, obteniéndose un perfil plagado de oligosacáridos

hacia el final de la reacción. La Fig. 4.2 muestra la evolución de la reacción de SacB bajo condiciones que permiten la síntesis preferencial de LevanB (SacB 0.5 μM , 100 g/L sacarosa, 25°C), en ella es posible observar el alargamiento gradual de los intermediarios de la reacción para dar lugar al producto de mayor tamaño, llegándose a detectar más de 150 compuestos. Entre los productos de menor tamaño es posible identificar a los disacáridos blastosa, levanobiosa e inulobiosa y los trisacáridos 1-kestosa, 6-kestosa y neo-kestosa. Entre estos productos, la blastosa es el que alcanza una mayor concentración al final de la reacción (1.7 g/L), mientras que los demás permanecen siempre por debajo de 1 g/L (Fig. 4.3). Lo anterior se debe a que la especificidad de SacB guía la reacción hacia la generación de un producto polimérico, de forma que la acumulación de estos productos de menor tamaño estará definida por la medida en que sean tomadas como moléculas aceptoras y elongadas durante la reacción.

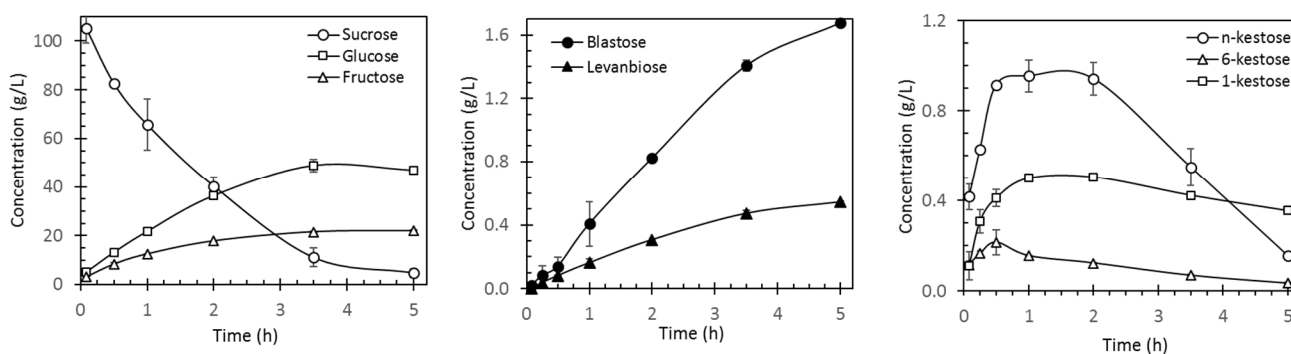


Fig. 4.3 Cinética de formación de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos durante la síntesis de LevanB.

Además del claro incremento en el tamaño de los intermediarios, una inspección detallada de la Fig. 4.2 evidencia la generación de nuevos intermediarios en tiempos posteriores a 1 hora de reacción. Como ejemplo, la formación tardía del compuesto 2' se expone dentro de un cuadro discontinuo en la Fig. 4.2-B. Este compuesto y muchos otros intermediarios nacientes son de menor tamaño que los intermediarios previamente formados, lo cual puede indicar que la elongación de levanas está ocurriendo *de Novo* a partir de otros iniciadores diferentes a la sacarosa. De este modo es posible identificar dos familias de intermediarios que se forman en distintos tiempos de la reacción: un primer grupo de intermediarios que aparece desde el inicio de la reacción y durante los primeros 15 minutos, mientras que la aparición de una segunda familia de intermediarios ocurre ya avanzada la reacción. Considerando la evolución del perfil de intermediarios y la cinética de formación de los productos de menor tamaño (Fig. 4.3), la síntesis de LevanB puede dividirse en tres fases:

➤ *Fase temprana* (primeros minutos de reacción). Los trisacáridos 1-kestosa, 6-kestosa y neo-kestosa se forman como primeros productos de transferencia. La acumulación de

estos ocurre rápidamente alcanzando sus concentraciones máximas en los primeros minutos de reacción. Cuando poco menos de 20% de la sacarosa inicial ha sido convertida, la neo-kestosa es el trisacárido que mayormente se acumula alcanzando 0.9 g/L, seguido por 1-kestosa con 0.5 g/L y finalmente 6-kestosa con únicamente 0.2 g/L. la formación de estos trisacáridos primigenios da cabida a la generación de muchos otros productos (*intermediarios primarios*) que gradualmente incrementan su tamaño hasta alcanzar un grado de polimerización de alrededor de 30 (los primeros 28 miembros de este grupo están numerados en la Fig. 4.2-B y Fig. 4.2-C. Paralelamente, la glucosa (subproducto de la reacción global) y la fructosa (producto de la hidrólisis de sacarosa) comienzan a acumularse desde el inicio de la reacción.

➤ *Fase tardía.* Conforme la reacción transcurre y más del 30% de la sacarosa inicial ha sido procesada, nuevos productos emergen entre el espectro de intermediarios previamente formados. Entre estos nuevos productos la blastosa y la levanobiosa alcanzan concentraciones de 0.16 g/L y 0.4 g/L en la primera hora de reacción y la duplican hacia la segunda hora cuando más de la mitad de sacarosa se ha consumido. Al mismo tiempo, otro disacárido, la inulobiosa, hace su aparición. La formación de estos productos está relacionada con la rápida acumulación de glucosa y fructosa que ahora alcanzan 36 y 18 g/L respectivamente. Más importante es la detección de un nuevo grupo de intermediarios, designados como *intermediarios secundarios*, después de una hora de haberse iniciado la reacción (ver las señales marcadas con números primos en las Fig. 4.2-B y Fig. 4.2-C). Estos nuevos intermediarios incluyen FOS con DP entre 3 y 20 (picos 1'-24' en Fig. 4.2-B y 4.2-C), en contraste con los intermediarios primarios que ahora alcanzan DPs mayores a 40 (picos 1-28 en Fig. 4.2-B y 4.2-C). Durante esta fase, la concentración de neo-kestosa permanece constante hasta que más de 50% de sacarosa es convertida. Al mismo tiempo, se observa el lento decremento en concentración de 1-kestosa y 6-kestosa.

➤ *Fase de agotamiento de sacarosa.* Cuando la sacarosa se ha agotado, el principal producto es una distribución de levanas de bajo peso molecular, con un DP promedio de 50, el cual contiene intermediarios primarios y secundarios, así como los productos finales de su elongación. Es importante resaltar el notable descenso en la concentración de neo-kestosa que ocurre cuando la sacarosa comienza a escasear después de dos horas de reacción. Este comportamiento cinético es homologado únicamente por el compuesto 3 de los intermediarios primarios, identificado más adelante como 6-neo-nistosa. Al final de la reacción, la 1-kestosa es el mayor producto trisacárido (0.35 g/L), mientras que 6-kestosa disminuye hasta 0.15 g/L. En cambio, los disacáridos blastosa y levanobiosa alcanzan niveles de 1.67 y 0.54 g/L.

A continuación, se aborda en forma más detallada cada familia de intermediarios, así como sus orígenes. Para identificar a los iniciadores de cada una los grupos de intermediarios, se llevaron a cabo reacción de aceptor empleando los productos de reacción cuya cinética ha sido comentada: 1-kestosa, 6-kestosa, neo-kestosa, levanobiosa y blastosa.

4.1.1 Intermediarios Primarios: síntesis de levanas a partir de 1-kestosa y 6-kestosa

El primer aceptor en una reacción de transferencia con sacarosa como único sustrato, es invariablemente otra molécula de sacarosa, lo interesante resulta al observar que el producto de esa transferencia conducida por la levansacarasa no es solo uno, sino tres (1-kestosa, 6-kestosa y neo-kestosa) tal y como muestra el perfil de productos en los primeros instantes de la reacción (Fig. 4.2-B).

En lo que respecta a los intermediarios primarios acumulados en los primeros 30 minutos de reacción, su origen debe estar ligado inequívocamente a la transferencia sobre estos trisacáridos primigenios, por lo cual se evaluó la participación de 1-kestosa y 6-kestosa como aceptores en reacciones de síntesis de LevanB. Las Figs. Fig. 4.4-A y Fig. 4.4-B muestran la evolución de las reacciones de aceptor de 1-kestosa y 6-kestosa respectivamente, en ambos casos se aprecia que los compuestos actúan como moléculasceptoras favoreciendo la formación de una serie exclusiva de compuestos dentro del perfil de LevanB. Más aún, la comparación de los perfiles de oligosacáridos generados (Fig. 4.4-C) demuestra claramente que los trisacáridos ensayados favorecen la formación de dos series distintas entre que sí que corresponden a los intermediarios primarios de la reacción de SacB con sacarosa. Con base a lo anterior, se concluye que la mayoría de los intermediarios tempranos tienen como iniciadores a la 1-kestosa y 6-kestosa y las series de oligosacáridos tipo levana derivados de estos trisacáridos fueron entonces denominados *1K-FOS* y *6K-FOS*, respectivamente.

Particularmente, la serie de 1K-FOS tiene un comportamiento cromatográfico distinto a la serie de FOS con exclusivamente enlaces $\beta(2-1)$ (de acuerdo con su comparación con estándares de inulinas con DP entre 3 y 10), lo cual sugiere que la transferencia que SacB realiza sobre la 1-kestosa ocurre con enlaces $\beta(2-6)$ para la generación de las cadenas lineales de esta serie. Lo anterior denotaría que es después de la generación de un trisacárido en el segundo ciclo de transferencia, cuando la especificidad de la enzima guía a la formación preferencial de enlaces $\beta(2-6)$. Con el fin de corroborar lo anterior, los intermediarios primarios 1 y 2 fueron purificados a través de SEC-rpHPLC y caracterizados a través de experimentos de RMN de 1D y 2D (Anexo C. Espectros de RMN). El compuesto 1 fue identificado como $\beta\text{-D-Fruf-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Fruf-(2}\rightarrow\text{1)-}\beta\text{-D-Fruf-(2}\leftrightarrow\text{1)-}\alpha\text{-D-Glcp}$ (1,6-nistosa), y el compuesto 2 como $\beta\text{-D-Fruf-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Fruf-(2}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-Fruf-(2}\leftrightarrow\text{1)-}\alpha\text{-D-Glcp}$ (6,6-nistosa). Las Figs. Fig. 4.5-A y Fig. 4.5-B muestran la completa asignación de señales

del espectro HSQC de ambos compuestos. Estos tetrasacáridos son productos de la transferencia de un grupo fructosil sobre la posición 6 de la fructosa terminal de la 1-kestosa y 6-kestosa, respectivamente. Debido a que las series de 1K-FOS y 6K-FOS cubren completamente la familia de intermediarios primarios, a excepción del compuesto 3, se concluye que 1-kestosa y 6-kestosa son los principales iniciadores inherentes a la fase temprana de la síntesis de LevanB.

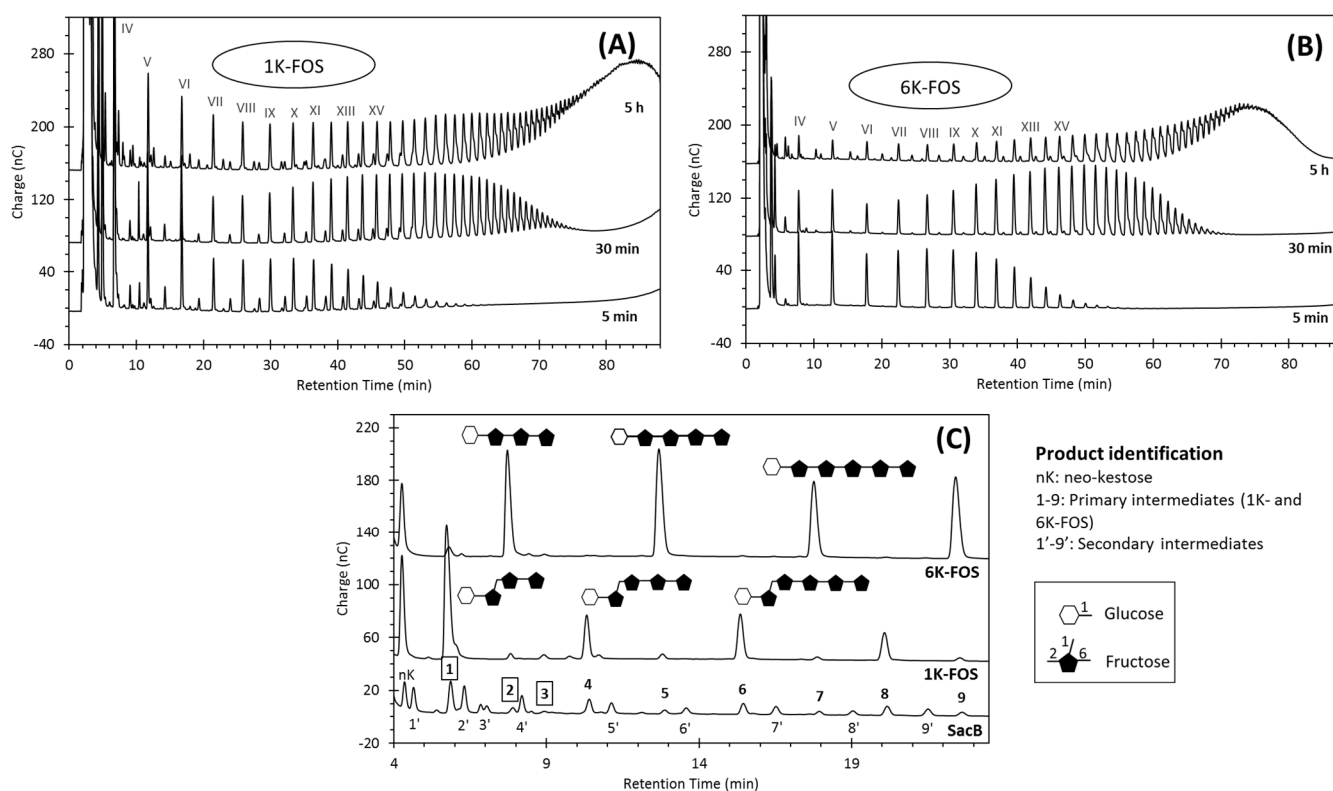
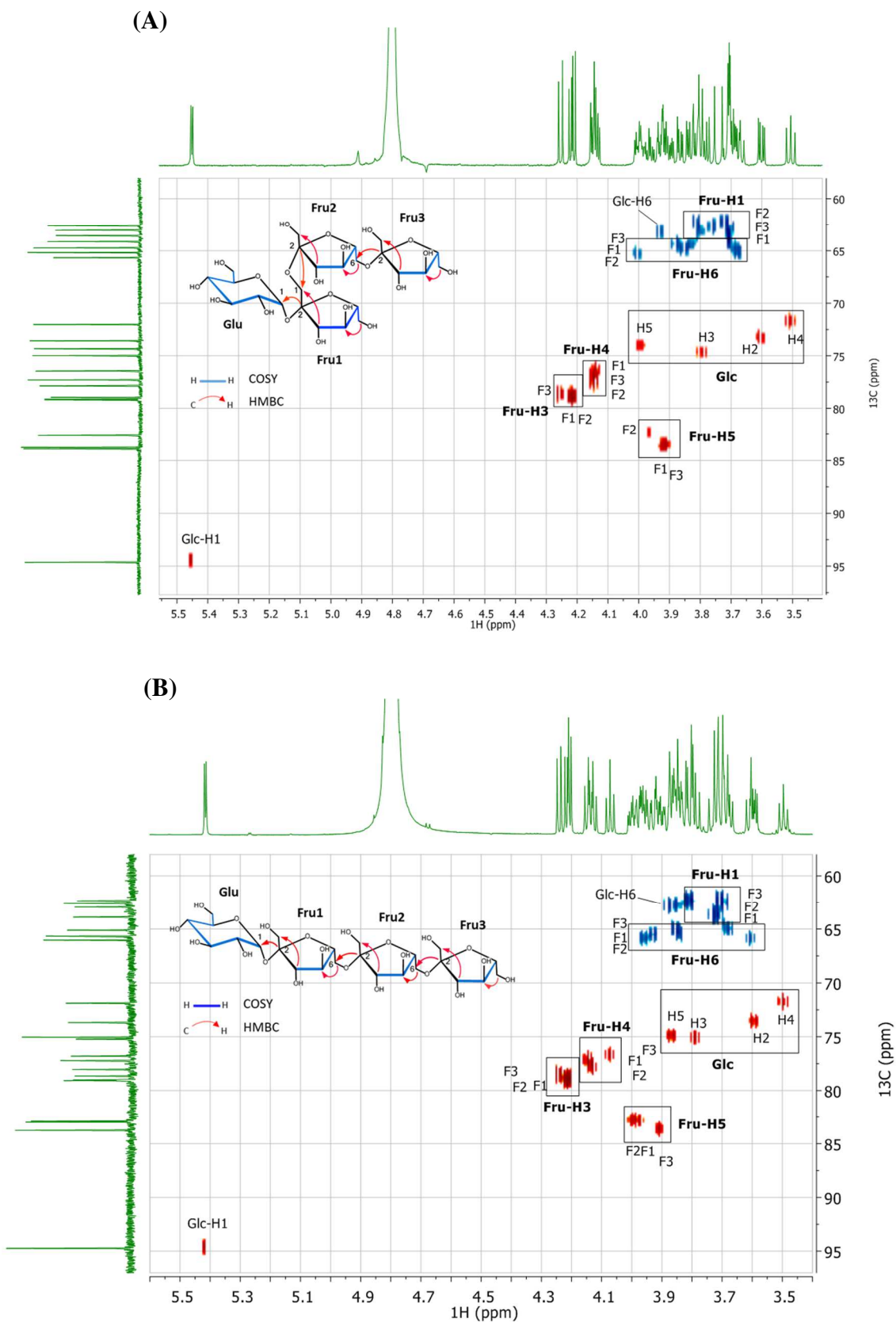


Fig. 4.4 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante las reacciones de aceptor de 1-kestosa (A) y 6-kestosa (B). (C) Comparación de los perfiles a los 5 min de cada reacción con el perfil final de la reacción de SacB con únicamente sacarosa. Condiciones de reacción: SacB 0.5 μ M, 100 g/L de sacarosa, 5 mM de aceptor, 25°C. Los números romanos indican el DP estimado de los compuestos dentro de cada una de las series de levanas. Los productos analizados por RMN se marcan con un recuadro.

La implicación de la 1-kestosa como iniciador en la síntesis de levanas ya ha sido considerada en estudios anteriores con SacB así como con las levansacararas de *A. levanicum* y *Bacillus natto*. Rapoport et al. (1966) reportaron a la 1-kestosa como el primer producto sintetizado por la levansacarasa de *B. subtilis*, y determinaron que compuestos de mayor tamaño son obtenidos a través de la adición a la 1-kestosa de residuos fructosilos con enlaces β (2-6). Por su parte, Feingold et al. (1956) purificaron fructooligosacáridos a partir de reacciones de sacarosa con células de *A. levanicum* y levansacarasa libre de células, siendo-



la 1-kestosa el mayor producto oligosacárido generado. Así mismo reportaron la transferencia sobre este trisacárido dada la obtención de mono-, di- y tri-fructósidos de 1-kestosa. En este mismo trabajo, se reportan solo trazas de 6-kestosa y la obtención de un tetrasacárido producto de la transferencia sobre dicho aceptor. Más recientemente, Iizuka et al. (2002) reportaron a la 1-kestosa, la 6-kestosa y en menor proporción a la neo-kestosa como iniciadores en la reacción de síntesis de levanas por la LS de *Bacillus natto*, dada la observación de estos compuestos en la composición de la levana generada a partir de análisis de RMN. En este sentido, los resultados de este trabajo muestran por primera vez la identificación cromatográfica de series de levanas derivadas de 1-kestosa y 6-kestosa, con más de 15 miembros, todos ellos intermediarios inherentes a la síntesis de la levana de bajo peso molecular generada por SacB.

4.1.2 Intermediarios Secundarios: síntesis de levanas a partir de levanobiosa y blastosa

Conforme avanza la reacción de síntesis de LevanB se detectó la formación de intermediarios adicionales a los esperados en la elongación de sacarosa como primer aceptor (series de 1-kestosa y 6-kestosa), esto pone de manifiesto la participación de otros subproductos de la reacción como moléculasceptoras inherentes a la síntesis de levanas. Como ya se detalló, la síntesis de LevanB conlleva la acumulación de levanobiosa, inulobiosa y blastosa. El origen de los difructósidos se asocia a la transferencia de grupos fructosilos a moléculas de fructosa libre catalizada por SacB, con levanobiosa (enlace β 2-6) como producto preferencial y en menor medida inulobiosa (enlace β 2-1). Por otro lado, la blastosa es usualmente asociada como producto de hidrólisis de la neo-kestosa (Homann et al., 2007), sin embargo también debe considerarse su formación a través de la transferencia directa de fructosa a una molécula de glucosa libre (Feingold et al., 1956). Considerando que tanto la blastosa como la levanobiosa son los productos de bajo DP de mayor acumulación, ambos disacáridos fueron evaluados como aceptores con el fin de elucidar su rol en la formación de los intermediarios observados en la síntesis de LevanB.

En ensayos iniciales se observó una baja afinidad de SacB por blastosa y levanobiosa, de modo que en ambas reacciones la concentración del aceptor tuvo que incrementarse a 20 mM con el fin de detectar los productos de reacción. La evolución de la reacción de aceptor de blastosa con SacB y sacarosa se muestra en la Fig. 4.6-A. Desde la fase inicial de esta reacción se observa la generación de un trisacárido marcado con el número III, que corresponde con el intermediario secundario 2', y que al igual que una serie completa de productos eventualmente se sobreacumulan hacia el final de la reacción. Dentro de esta serie de productos son fácilmente identificables los miembros con DP estimados entre 3 y 11. La comparación de este perfil con el perfil final de la reacción de SacB con sacarosa confirma

que todos ellos corresponden a una serie dentro del grupo de intermediarios secundarios (Fig. 4.6-C).

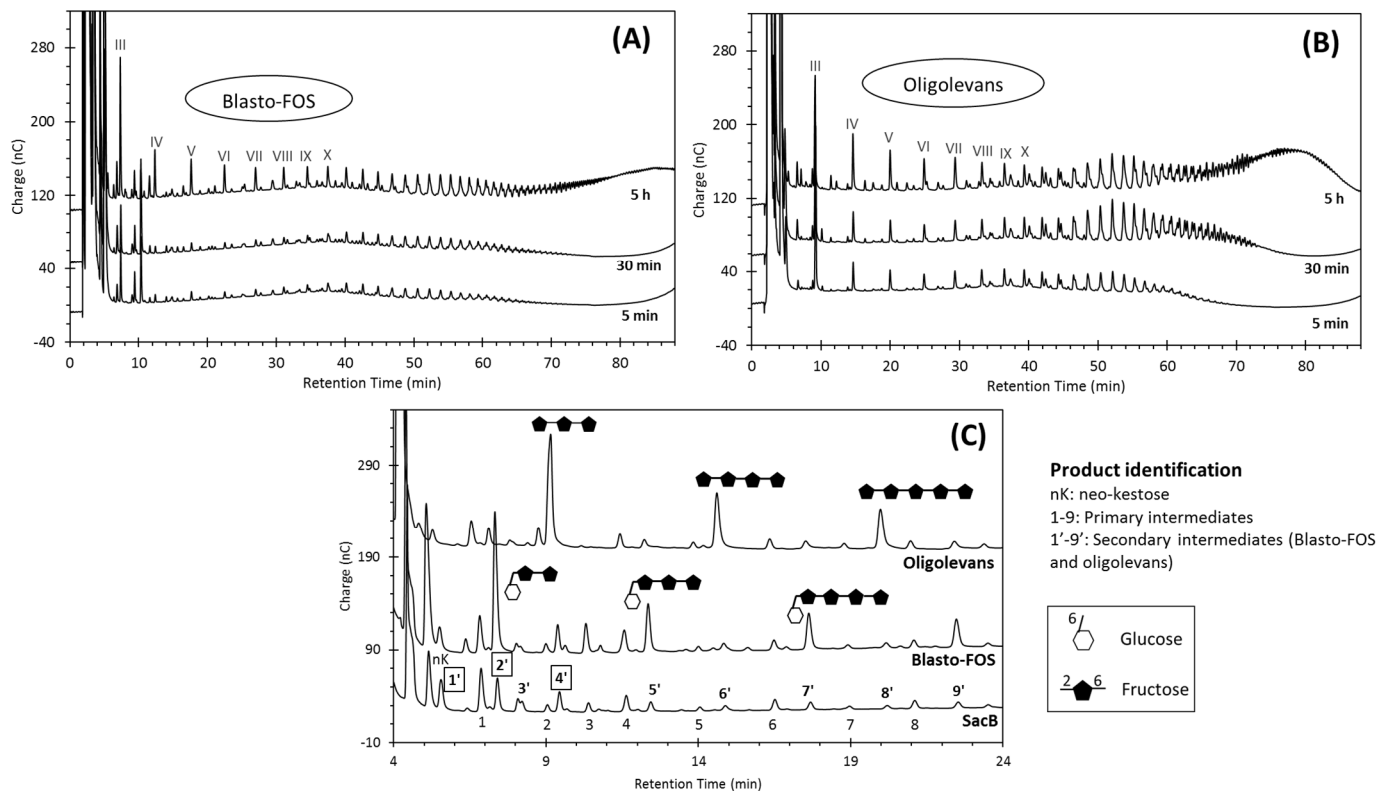


Fig. 4.6 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante las reacciones de aceptor de blastosa (A) y levanobiosa (B). (C) Comparación de los perfiles a las 5 h de cada reacción con el perfil final de la reacción de SacB con únicamente sacarosa. Condiciones de reacción: SacB 0.5 μ M, 100 g/L de sacarosa, 20 mM de aceptor, 25°C. Los productos analizados por RMN se marcan con un recuadro.

Con el objetivo de corroborar la estructura de esta nueva serie de oligosacáridos denominados *blasto-FOS*, el producto 2' fue purificado y caracterizado a través de experimentos de RMN de 1D y 2D (Anexo C. Espectros de RMN). En el espectro de ^1H de este compuesto se observaron dos protones anoméricos a desplazamientos químicos (δ) de 5.27 ppm (d, $J = 3.76$ Hz) y 4.67 ppm (d, $J = 7.7$ Hz), las constantes de acoplamiento de estas señales evidencian la presencia de una mezcla de anómeros α - y β - de un glucósido, en una relación de 27:100 de acuerdo con la integración de las señales. La presencia de ambos anómeros, indica que la posición C1 del residuo glucosilo se encuentra libre. El espectro HSQC mostró la unión de estos protones anoméricos con los carbonos a δ_{C} 94.72 y 98.56 ppm, respectivamente. Además, el espectro de ^{13}C NMR muestra la presencia de otros dos carbonos anoméricos cuaternarios a δ 106.56, y 106.39, atribuidos a dos residuos fructosilos. La conectividad se dedujo a partir de conexiones en el espectro de HMBC, el cual exhibió la correlación del carbono cuaternario (C-2') a δ_{C} 106.56 de Fru' con los protones metilenos (H-6) de Glc, así como la correlación del segundo carbono cuaternario (C-2'') a δ_{C} 106.39 de

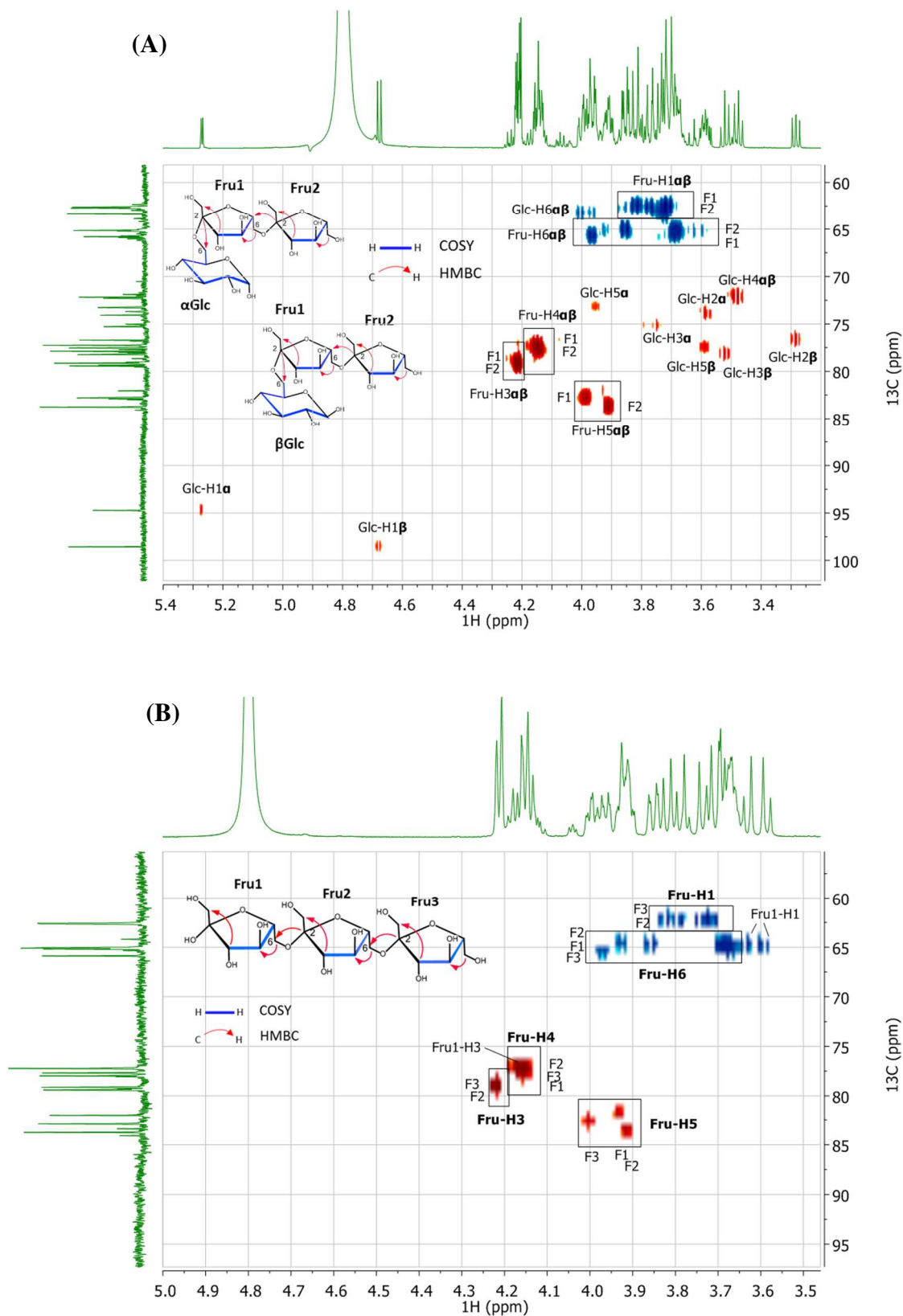


Fig. 4.7 Espectros HSQC de blastotriosa (A) y levanobiosa (B). Se muestra la asignación de señales del espectro y en la estructura se esquematizan los puntos claves obtenidos de experimentos 1D y 2D que permitieron la identificación de los compuestos.

Fru'' con los protones metilenos H-6' (δ_H 3.99) de Fru'. De acuerdo con esto, el compuesto 2' se caracterizó por primera vez como la mezcla isomérica 27/100 β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- α/β -D-Glcp, llamado aquí *blastotriosa* (Fig. 4.7-A), un producto derivado de la transferencia de una molécula de fructosa a la posición 6 del grupo fructosilo de la blastosa.

Por otro lado, la Fig. 4.6-B muestra el desarrollo de la reacción de aceptor de la levanobiosa. En esta se ilustra la elongación del disacárido aceptor dando lugar a la acumulación de una serie exclusiva de levanas (presumiblemente *oligolevanas* carentes de glucosa inicial) desde los primeros minutos de la reacción. Más aún, la serie entera corresponde con varios compuestos clasificados como intermediarios secundarios. La Fig. 4.6-C ejemplifica la correspondencia entre el trisacárido, tetrasacárido y pentasacárido de esta serie de oligolevanas con los intermediarios secundarios 4', 6' y 8'. La identidad de esta serie fue confirmada tras la purificación y análisis en NMR del producto 4' (Fig. 4.7 y Anexo C. Espectros de RMN), identificado como β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf (levanotriosa), el trisacárido miembro la serie de las oligolevanas.

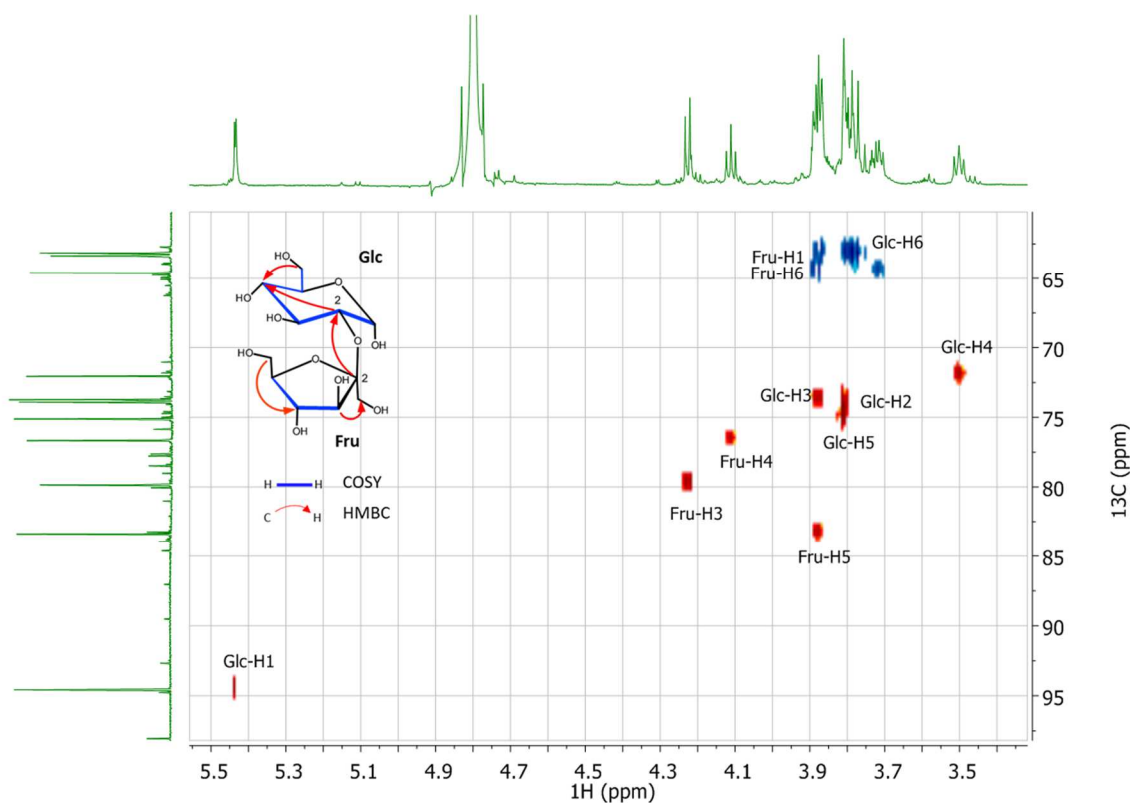


Fig. 4.8 Espectro HSQC de Ercosa. Se muestra la asignación de señales del espectro y en la estructura se esquematizan los puntos claves obtenidos de experimentos 1D y 2D que permitieron su identificación.

Adicionalmente, se logró purificar el producto 1' de la Fig. 4.6, un intermediario secundario no alineado con las series descritas hasta ahora. El análisis en RMN de este compuesto muestra la señal de un protón anomérico a δ_H 5.44 (d, $J = 2.9$ Hz), asignado a un

grupo α -glucosilo (Fig. 4.8). El espectro HSQC mostró la correlación de este protón con el carbono anomérico a δ_C 94.57. Además, el espectro de ^{13}C evidenció la presencia de un carbono anomérico cuaternario perteneciente a un grupo fructosilo. La completa asignación de las señales 1H y ^{13}C pertenecientes a los dos sistemas de espines se logró a partir del análisis de las señales presentes en los espectros COSY, HSQC, y HMBC (Fig. 4.8 y Anexo C. Espectros de RMN). La unión interglucosídica de las dos unidades se dilucidó a través de la correlación entre el H-2 de la glucosa a δ_H 3.80 y el C-2 de la fructosa a δ_C 106.13 observada en HMBC, lo cual indica que este disacárido posee una glucosa reductora. Estos datos permitieron identificar al compuesto 1' como el isómero $\beta(2-2)$ de la sacarosa [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 2)- α -D-Glcp], denominado *ercosa* en este trabajo, un producto que muy probablemente se deriva de la transfructosilación de la glucosa.

Hay varios reportes en la literatura que abordan la capacidad de las levansacarasas de transferir grupos fructosilos de la sacarosa a fructosa o glucosa libres. Por ejemplo, se han encontrado levanobiosa, inulobiosa, blastosa, *ercosa* y un isómero $\beta(2-3)$ de la sacarosa dentro de los productos de transferencia de la LS de *A. levanicum* (Feingold et al., 1956). En el mismo contexto, se ha reportado la incorporación de fructosa marcada radioactivamente en levana sintetizada por SacB con sacarosa (Rapoport et al., 1966). Sin embargo, este es el primer reporte en el que se provee evidencia del rol de aceptor de la blastosa en la síntesis de levanas y la identificación cromatográfica de toda una nueva serie completa de oligosacáridos derivados de ésta. Cabe señalar que la observación del papel de aceptor de la fructosa y levandiosa se ha reportado empleando grandes cantidades del aceptor con respecto a la cantidad de sacarosa empleada, usualmente condiciones equimolares o relaciones aceptor/donador por arriba de 1 (Rapoport y col., 1966; Yamamoto, Iizuka y Tanaka, 1985; Iizuka y col., 2002), cantidades superiores a las empleadas en este trabajo. En este sentido la actividad hidrolítica de SacB y por tanto la formación de fructosa potencialmente aceptora, estaría formando un papel importante en la composición de la levana finalmente sintetizada. En nuestro caso de estudio, la síntesis de LevanB ocurre en un principio con niveles altos de hidrólisis que disminuyen conforme avanza la reacción, desde un 62% hasta un 47% derivado de una mayor eficiencia de transfructosilación de la enzima. Lo anterior representa la generación de hasta 122 mM de fructosa libre al final de la reacción, haciéndose evidente la formación de las oligolevanas cuando la concentración de fructosa en el medio es de 66 mM y resta 193 mM de sacarosa por ser convertida. Esta relación aceptor/donador de 0.34 (66 mM/193 mM) es incluso mayor a la que se tenía inicialmente en la reacción de aceptor de la levandiosa (20 mM/292mM = 0.068), en cuyo caso la formación de oligolevanas es claramente favorecida. Esta discrepancia puede deberse a una baja capacidad aceptora de la fructosa que se ve aún más mermada ante la competencia de otras moléculas con mayor potencial aceptor que se van generando durante la síntesis de levanas.

4.1.3 Neo-serie de levanas

Finalmente, se investigó el papel de la neo-kestosa en la síntesis de levanas a través de una reacción de aceptor, teniendo nuevamente sacarosa como molécula donadora. Cabe mencionar que también se tuvo que incrementar la concentración de neo-kestosa inicial a 20 mM para poder ver su efecto en el perfil con mayor claridad (la concentración evaluada con anterioridad para los trisacáridos 1-kestosa y 6-kestosa fue de 5 mM), esto implica de antemano una menor afinidad del aceptor. La Fig. 4.9-A muestra que al inicio de la reacción solamente un producto se ve favorecido, coincidiendo con el intermediario primario número 3 de la Fig. 4.2-A. Este compuesto debe tratarse de un producto de transferencia presuntamente en posición β 2-6 sobre la neo-kestosa. Este producto fue exitosamente purificado y datos de NMR (Anexo C. Espectros de RMN) permitieron identificarlo como β -D-Fruf(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-Fruf, nombrado 6-neo-nistosa en este trabajo (Fig. 4.10). A pesar de que no hay un cambio notorio en el perfil al inicio de la reacción, el principal efecto de la adición de neo-kestosa se observa hacia el final de la reacción, en cuyo perfil la sobreacumulación de la serie de blasto-FOS es evidente. Es de hacer notar que la neo-nistosa formada también es consumida hacia el final de la reacción. Tal como ya se había mencionado, esta cinética de formación y posterior consumo es observada tanto para la neo-kestosa como para la ahora identificada 6-neo-nistosa en la reacción de síntesis de LevanB (Fig. 4.2-B)

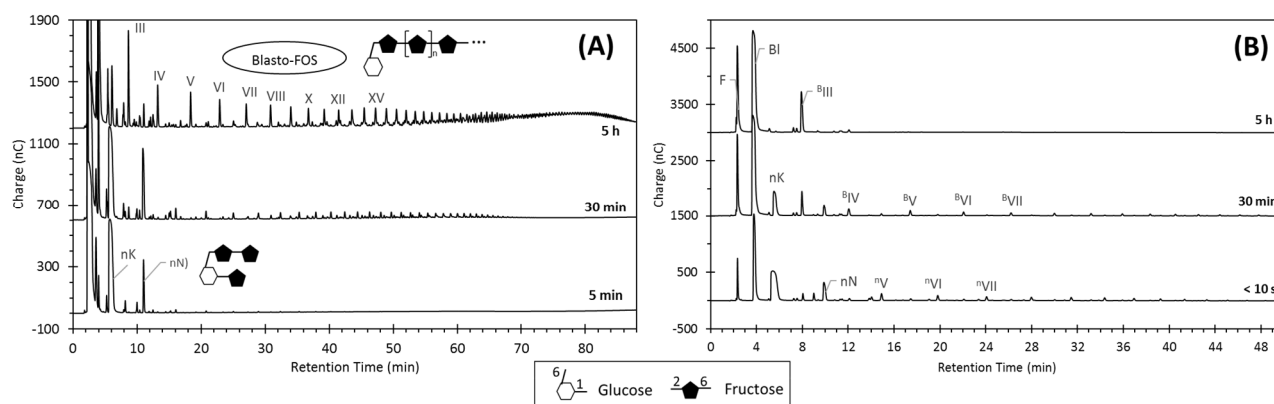


Fig. 4.9 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante la reacción de aceptor de neo-kestosa (A) y reacción control (B). Condiciones de reacción A): SacB 0.5 μ M, 100 g/L de sacarosa, 20 mM de nK, 25°C; B) SacB 0.5 μ M, 20 mM de nK, 25°C. El número romano indica el grado de polimerización estimado del compuesto dentro de la neo-serie de levanas (n V- n VII) o dentro de la serie de blasto-FOS (B III- B VII).). nK: neo-kestosa, nN: 6-neo-nistosa, B III: blastotriosa.

Como experimento control, se realizó una reacción con neo-kestosa como único sustrato para examinar su capacidad como molécula donadora advertida en reportes anteriores (Hestrin et al., 1956). En esta reacción, la neo-kestosa es principalmente hidrolizada dando lugar a la acumulación de fructosa y blastosa desde el inicio de la reacción, sin embargo,

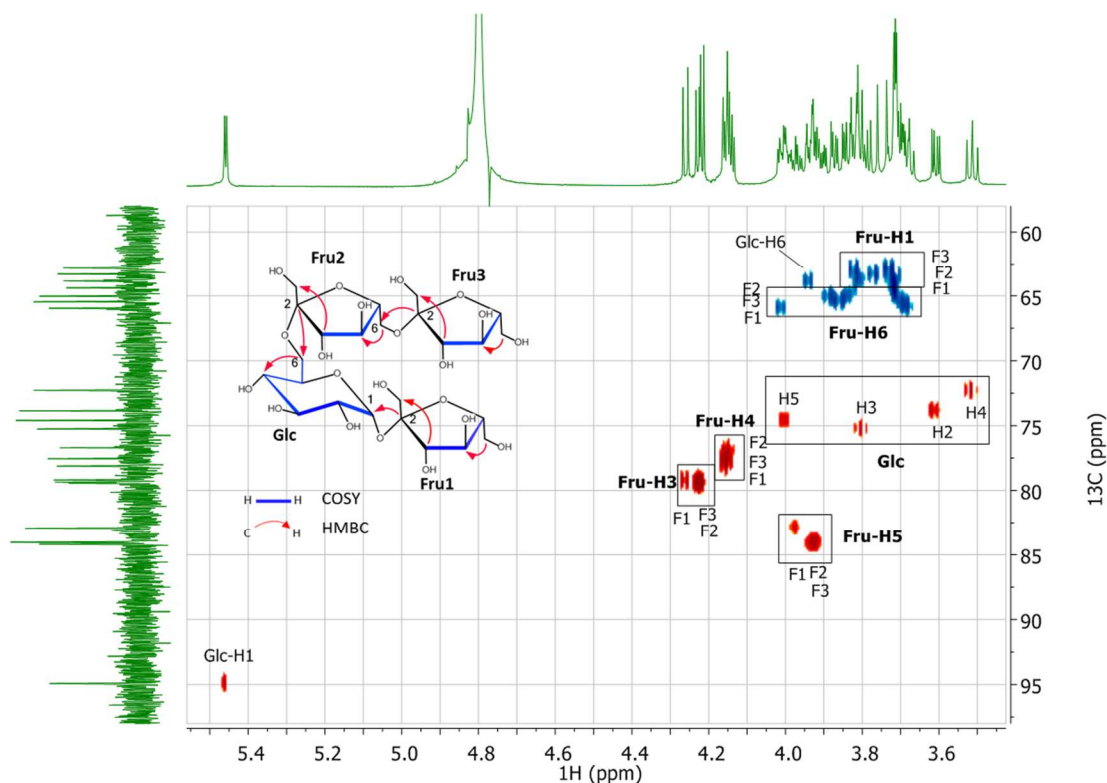


Fig. 4.10 Espectro HSQC de 6-neo-nistosa. Se muestra la asignación de señales del espectro y en la estructura se esquematizan los puntos claves obtenidos de experimentos 1D y 2D que permitieron su identificación.

también se detectan productos de transferencia de varios tamaños (Fig. 4.9-B). Al principio de la reacción, la neo-kestosa participa tanto como donador como aceptor, lo cual da origen a la 6-neo-nistosa y a una serie de nuevos compuestos que no coinciden con las series hasta ahora descritas, por lo que debe tratarse de neo-serie de levanas que alcanzan DPs de hasta 12. Esta serie, sin embargo, no prevalece y hacia los 30 minutos es consumida para dar lugar a la serie de blasto-FOS con DPs similares. Finalmente, derivado de la poca cantidad de sustrato empleada, la actividad hidrolítica de SacB guía hacia la acumulación final de únicamente fructosa, blastosa y blastotriosa. Esta reacción revela como la capacidad de donador/aceptor de la neo-kestosa da pie a la generación de dos series de levanas, una derivada de la otra: primero una serie de neo-FOS y posteriormente una de blasto-FOS.

Con el fin de examinar la capacidad de aceptor/donador de otro miembro de esta neo-serie, se llevaron a cabo reacciones de SacB ocupando ahora 6-neo-nistosa (Fig. 4.11). Es de resaltar, que para estas reacciones bastó 5 mM del aceptor para obtener productos de transferencia detectables, en contraste con la concentración cuatro veces mayor empleada en la reacción con neo-kestosa. De esta forma, la reacción de aceptor de 6-neo-nistosa presentó a tiempos iniciales la generación de la misma serie de compuestos observada en la reacción control con neo-kestosa, esto es, neo-FOS producto de la transferencia secuencial sobre la 6-

neo-nistosa con grados de polimerización de hasta 17 (Fig. 4.11-A). Sin embargo, todos los miembros de esta serie son gradualmente consumidos dando lugar a la aparición de blasto-FOS. Por otro lado, la reacción control con 6-neo-nistosa revela que este neo-fructooligosacárido también es capaz de actuar como donador y aceptor en reacciones como único sustrato, dado que además de los predominantes productos de su hidrólisis (blastotriosa y fructosa) se observa la generación de productos de mayor tamaño desde los primeros segundos de la reacción (Fig. 4.11-B). Productos adicionales se observan en tiempos posteriores, apareciendo primero neo-FOS con DP de 5 y 6 y posteriormente blasto-FOS con DPs de hasta 7. En este sentido, a partir de 6-neo-nistosa SacB puede dar lugar a la formación de neo-FOS de mayor tamaño que posteriormente son consumidos con la concomitante liberación de blasto-FOS. Al final de la reacción, la actividad hidrolítica de SacB prevalece, acumulándose principalmente fructosa y blastotriosa, y en menor medida blastosa.

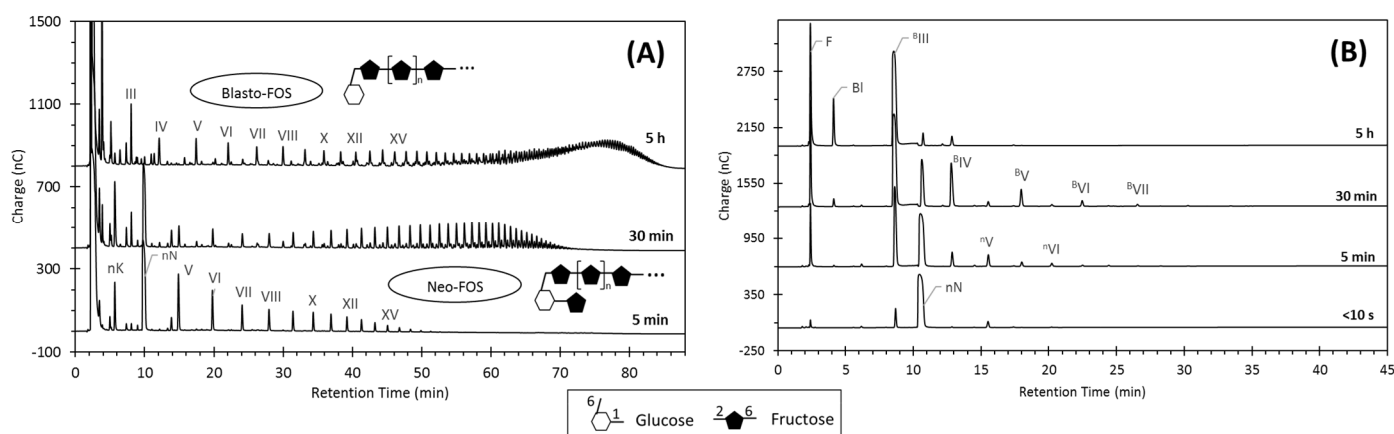


Fig. 4.11 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante la reacción de aceptor de 6-neo-nistosa (A) y reacción control de 6-neo-nistosa como sustrato único (B). Condiciones de reacción A): SacB 0.5 μ M, 100 g/L de sacarosa, 5 mM de neo-nistosa, 25°C; B) SacB 0.5 μ M, 5 mM de nN, 25°C. El número romano indica el grado de polimerización estimado del compuesto dentro de la neo-serie (ⁿV-ⁿVII) o dentro de la serie de blasto-FOS (^BIII-^BVII). nK: neo-kestosa, nN: 6-neo-nistosa, ^BIII: blastotriosa.

En conjunto, estos resultados resaltan la capacidad de SacB para sintetizar neo-FOS, entre los cuales solo el trisacárido y el tetrasacárido son visiblemente acumulados y posteriormente consumidos durante la producción de LevanB. El hecho de que no se observen los miembros restantes de la serie puede deberse a la baja tasa de formación de neo-kestosa así como a su baja capacidad de aceptor, lo cual corrobora su mayor acumulación entre los trisacáridos primigenios anteriormente descrita. Los resultados también evidencian la capacidad de los neo-FOS para actuar como aceptores y donadores al incubarse como sustratos únicos, fenómeno no observado en la incubación de SacB con levanobiosa, blastosa, 1-kestosa o 6-kestosa. La capacidad de donador de los neo-FOS es de esperarse debido a que conservan dentro de su estructura el enlace glicosídico de la sacarosa, molécula donadora por excelencia de SacB. Más aún esta potencial actividad donadora puede resultar importancia en la fase de

agotamiento de sacarosa lo cual explicaría el consumo de tanto la neo-kestosa y la 6-neo-nistosa hacia el final de la reacción. El consumo de estos productos en reacciones de transferencia hacia el agua (hidrólisis) o hacia alguna otra molécula de levana (transferencia) da lugar a la liberación de blastosa y blastotriosa, los cuales conservan únicamente la capacidad aceptora y pueden ser elongados hacia tamaños finales dentro de la distribución de LevanB.

4.2 Evaluación de aceptores de distinto grado de polimerización

La síntesis de LevanB involucra la formación de múltiples intermediarios de tamaños crecientes, productos por los cuales SacB puede tener afinidades crecientes que sirvan de fuerza conductora en la polimerización de las levanas. Para estudiar lo anterior, se evaluó la participación de moléculasceptoras de distinto grado de polimerización y su efecto en la reacción de transfructosilación de SacB. En específico se emplearon las fracciones de FOS con DP entre 2 y 7 obtenidos por el método bi-enzimático secuencial, que corresponden a pares Blasto-FOS/oligolevanas (apartado 3.3, Fig. 3.9). Adicional a los FOS DP 2-7, se evaluó una levana de bajo PM, denominada LevanBB, constituida por oligosacáridos con DP entre 7 y 25 (\overline{DP} 16), la síntesis y caracterización de este producto se detalla en el apartado 5.1.1.

Primeramente, como control, se examinó la posible reacción entre la enzima y cada uno de los aceptores en ausencia de sacarosa (Fig. 4.12). Como resultado de estas reacciones, por un lado, se observó que los FOS con DP2 (blastosa y levanobiosa) no son consumidos por la enzima, mientras que entre los trisacáridos únicamente la levanotriosa sufre cierta degradación, liberándose fructosa y levanobiosa como productos. Por otro lado, los FOS con DP mayor a 3 fueron completamente degradados, siendo fructosa, levanobiosa, blastotriosa y levanotriosa los productos remanentes de su consumo. Este fenómeno, no se observó en la incubación de LevanBB, cuya degradación fue incompleta incluso después de 8 h, con varios sub-productos con DPs mayores a 7 de estructura desconocida (datos no mostrados). Estos ensayos corroboran la actividad exo-hidrolítica de SacB sobre levanas, caracterizada recientemente como del tipo exo, esto es, la hidrólisis ocurre por liberación de fructosas de los extremos de las cadenas de levanas, importante particularmente a grandes concentraciones de enzima (Méndez-Lorenzo et al., 2015). En este sentido, los resultados sugieren un cierto límite (DP3) en la capacidad hidrolítica de SacB con respecto al tamaño de los sustratos. En lo que respecta al presente proyecto, este ensayo deja en claro que los sustratos evaluados no son capaces de sustentar reacciones de transferencia, esto es, no actúan como moléculas donadoras, por lo menos en las condiciones experimentales empleadas.

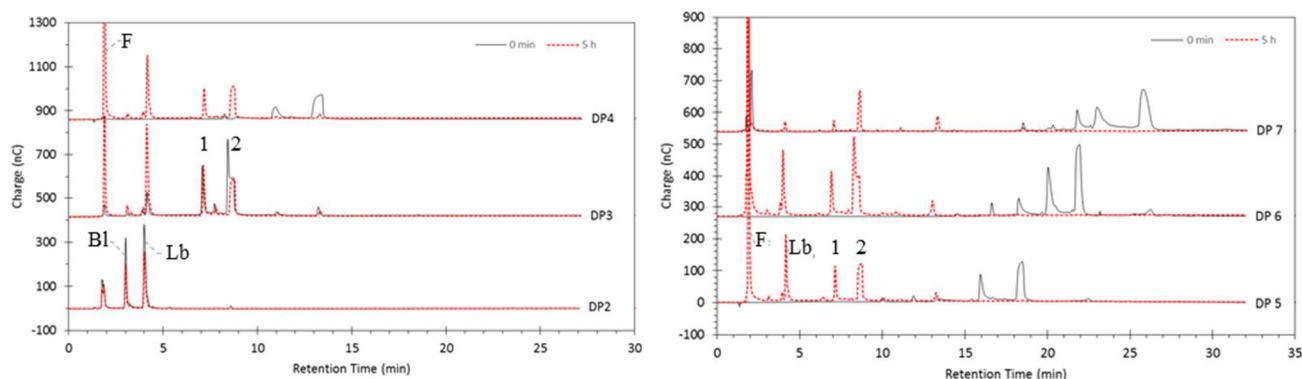


Fig. 4.12 Comparación de los perfiles iniciales y finales de la incubación de FOS con SacB (HPAEC-PAD). Condiciones de reacción: SacB 0.5 μ M, FOS 5 mM, 25°C, pH 6 y 350 rpm. F: fructosa, Bl: blastosa, Lb: levánobiosa, 1:blastotriosa, 2:levanotriosa.

A continuación, se analizó la evolución de las reacciones de síntesis de LevanB con la adición de cada una de las moléculas aceptoras de distinto tamaño. En primer lugar, se observó que la reacción de aceptor con los FOS DP2 (Fig. 4.13) generó un perfil muy similar al observado en la reacción sin aceptor. Sin embargo, puede observarse que la aparición de compuestos de mayor tamaño ocurre en tiempos más cortos comparados con la reacción típica de SacB, lo cual puede deberse a un incremento de la velocidad de reacción (activación) asociado al empleo de estos disacáridos como aceptores. También puede observarse que los disacáridos añadidos no se consumen completamente, lo cual podría estar relacionado con una baja afinidad de SacB por estos compuestos. Como ya se demostró anteriormente estos son subproductos inherentes a la síntesis de LevanB y fungen como iniciadores de intermediarios secundarios (blasto-FOS y oligolevanas).

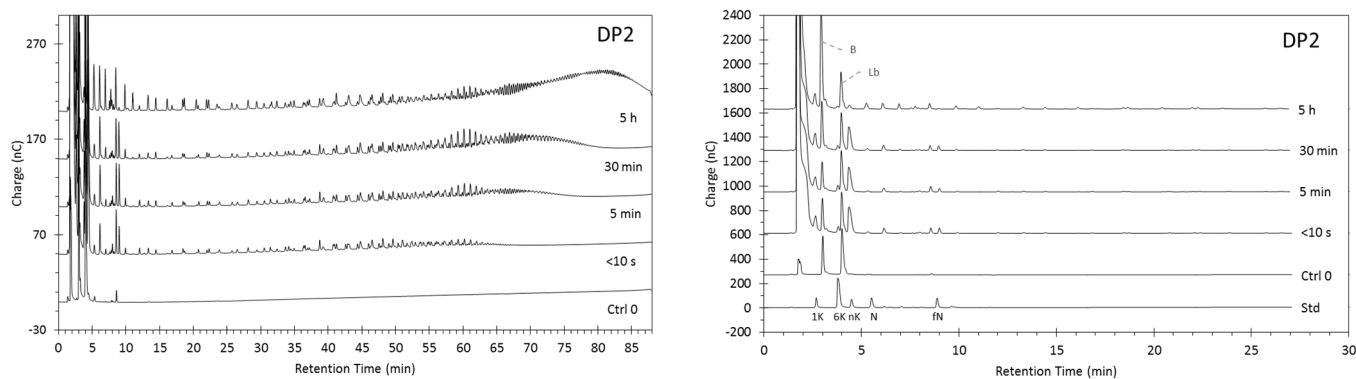


Fig. 4.13 Evolución en el perfil de oligosacáridos en la reacción de aceptor de los FOS DP2. El cromatograma de la derecha corresponde a una ampliación de los primeros tiempos de elución del cromatograma de la izquierda. Ctrl 0 corresponde al perfil inicial de cada aceptor. Condiciones de reacción: SacB 0.5 μ M, 100 g/L de sacarosa, 5 mM de aceptor, 25°C. 1K: 1-kestosa, 6K: 6-kestosa, nK: neo-kestosa, N: 1-nistosa, fN: 1,1-fructofuranosil-nistosa, B: blastosa, Lb: levánobiosa.

Perfiles contrastantes se obtuvieron en las reacciones empleando aceptores DP mayores (Fig. 4.14). En estas reacciones se observa que todos los aceptores añadidos son consumidos

por SacB y elongados hacia compuestos de tamaño intermedio en tiempos iniciales (<10 s, 5 min, 30 min) que finalmente dan lugar al perfil típico de LevanB (5 h). Los perfiles registrados denotan con claridad la participación de estos sustratos como moléculas aceptoras y el desarrollo de un mecanismo no procesivo para la elongación de los mismos, lo anterior evidenciado por la detección de todos los intermediarios de tamaño creciente.

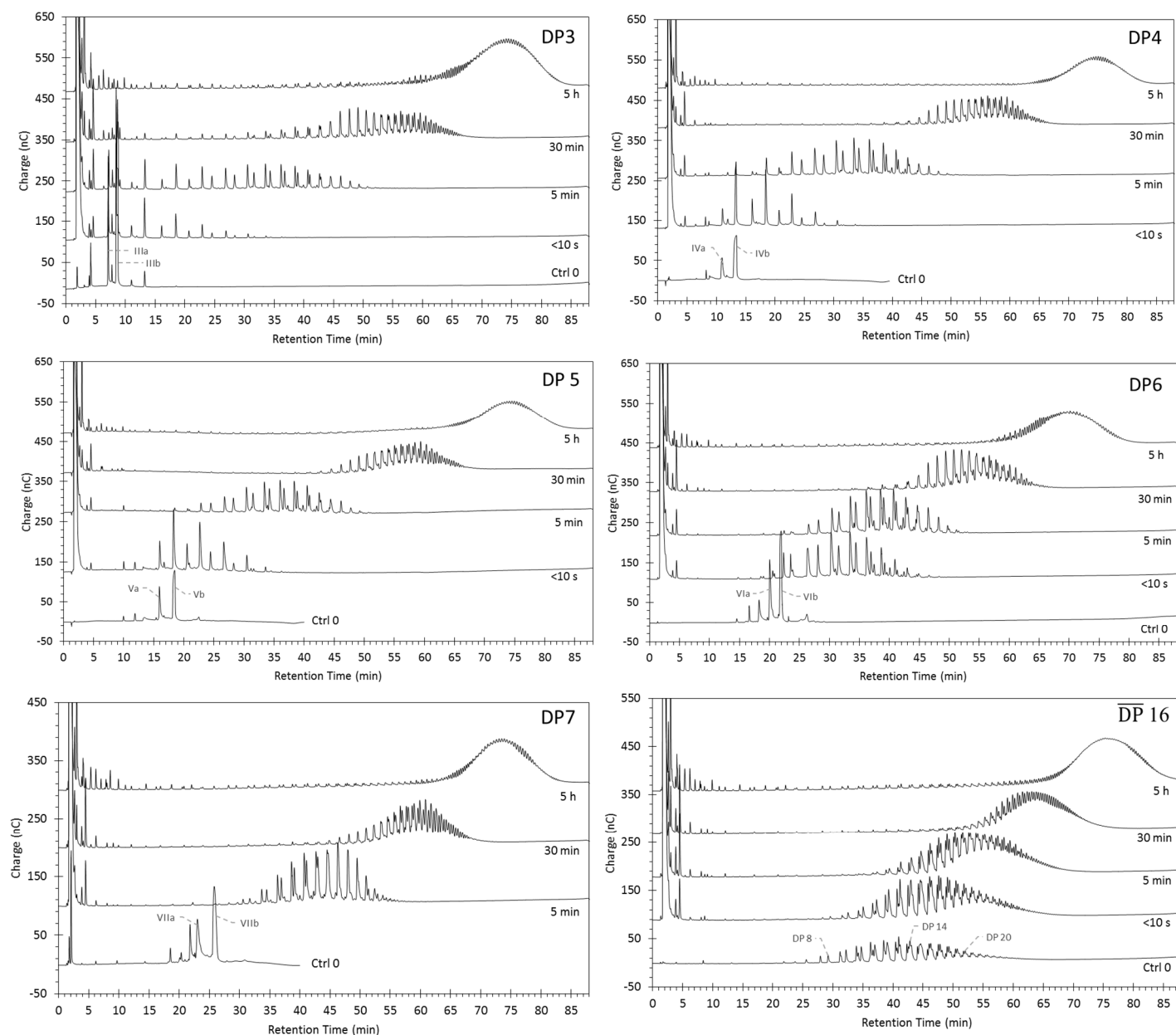


Fig. 4.14 Evolución en el perfil de oligosacáridos en las reacciones de aceptor de FOS de distinto DP. Ctrl 0 corresponde al perfil inicial de cada aceptor, los cuales contienen Blasto-FOS (IIIa-VIIa) y oligolevanas (IIIb-VIIb) de distintos DP. Condiciones de reacción: SacB 0.5 μ M, 100 g/L de sacarosa, 5 mM de aceptor, 25°C.

Como ya se había mencionado, los FOS empleados son intermediarios secundarios inherentes a la síntesis de LevanB a partir de sacarosa, sin embargo, al ser añadidos desde el

inicio de la reacción son ahora aceptores preferenciales. Adicionalmente, los perfiles finales de cada reacción presentan el perfil completo de intermediarios (primarios y secundarios), lo cual revela que posterior al consumo de los FOS añadidos y ante la presencia de sacarosa remanente, SacB realiza la síntesis *de novo* generando los intermediarios primarios habituales.

4.2.1 Efecto del grado de polimerización

Con el fin de cuantificar el efecto de las moléculas aceptores en la especificidad de SacB, se determinaron las relaciones H/T de las reacciones de aceptor a tiempo final (Fig. 4.15-A). A las 5 h de reacción se registraron conversiones superiores al 97% en todas las reacciones, en estas condiciones finales se observa que la adición de las moléculasceptoras favorece la proporción de la fructosa transferida, con una tendencia al alza atribuida al grado de polimerización. Los FOS DP2 registran un modesto incremento de 5%, lo cual corroborar con los pequeños cambios observados en la evolución del perfil de oligosacáridos. Por otro lado, los sustratos de mayor tamaño incrementan la proporción de productos de transferencia desde un 15 hasta un 20%. Este incremento se traduce en la formación de mayor cantidad de producto polimérico de bajo PM (LevanB), determinado a través de análisis de GPC (Fig. 4.15-B).

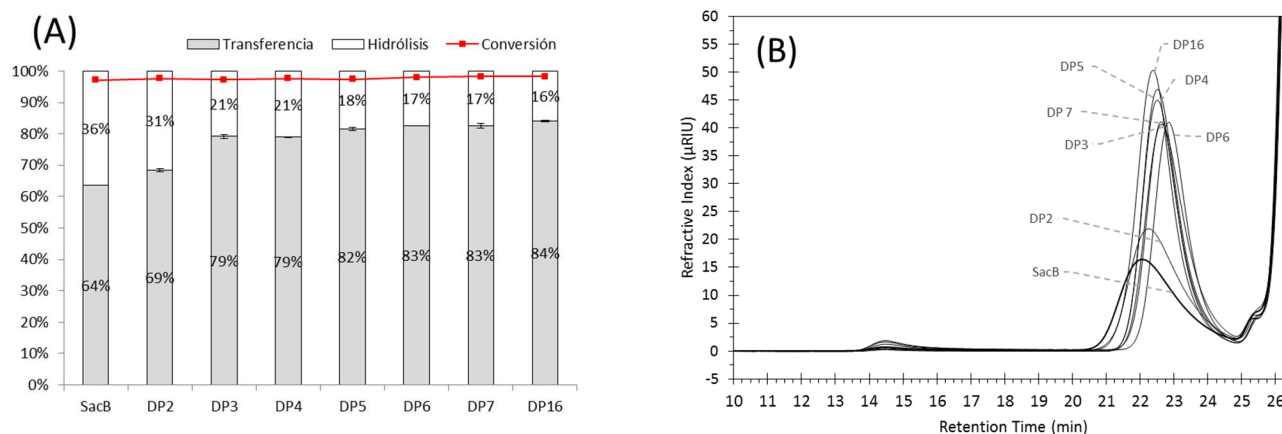


Fig. 4.15 Relación H/T y GPC de reacciones de aceptor. (A) Conversión y relación H/T a 5 h de reacción. (B) Perfil de levanas analizadas por GPC.

El efecto del grado de polimerización de los aceptores fue ahora evaluado a través de cinéticas en los tiempos iniciales de la reacción, determinándose para ello las velocidades iniciales de la reacción global (liberación de glucosa), reacción de hidrólisis (liberación de fructosa) y reacción de transferencia de fructosa (Fig. 4.16). En lo que se refiere a la reacción global, se observa que todos los aceptores añadidos generaron un efecto de activación, entre ellos los FOS DP2 resultaron los aceptores de menor eficiencia incrementando la reacción

global en únicamente 16%. Por otro lado, la velocidad global de reacción es por arriba del doble en presencia de aceptores con DP mayor a 2. Es de hacer notar que la diferencia de velocidades entre el aceptor DP3 y el DP16 no es tan grande como el incremento observado entre el aceptor DP2 y DP3, lo anterior señala que los FOS DP3 son los primeros de alta eficiencia

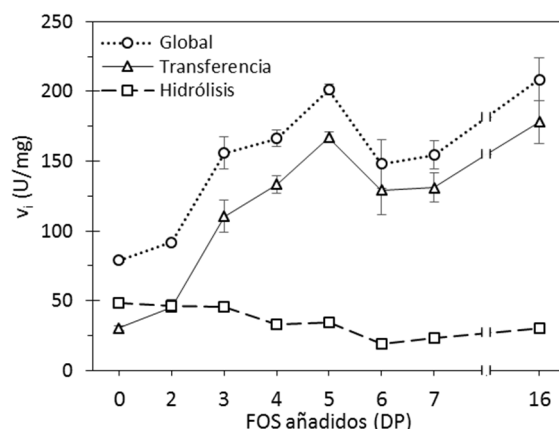


Fig. 4.16 Efecto del DP de los aceptores en las velocidades iniciales de reacción desarrolladas por SacB. Las velocidades se expresan en unidades de actividad específica (U/mg) considerando la liberación de glucosa (Global), liberación de fructosa (Hidrólisis) y transferencia de fructosa, determinados por HPLC.

Estos resultados coinciden con reportes en la literatura que señalan la activación de la reacción de SacB asociada a la incorporación de moléculasceptoras de tamaño creciente (Dedonder, 1966). Sin embargo, la identificación de trisacáridos como los primeros aceptores de mayor eficiencia contrasta con lo encontrado por Tanaka et al. (1979), quienes no observaron un efecto marcado en la actividad levansacarasa al ensayar oligolevanas con DP entre 2 y 5 (obtenidos por hidrólisis ácida de LevanA), mientras que oligolevanas con DP 9 la incrementaron cerca del 50%. Con respecto a moléculasceptoras más grandes, se ha reportado que el efecto activador depende del PM y la cantidad del polímero empleado (Tanaka y col., 1979; Ortiz-Soto y col., 2008). En particular, los resultados de este trabajo evidencian que la activación de la catálisis de SacB es debida a un claro favorecimiento de la reacción de transferencia, la cual se triplica al adicionar moléculasceptoras mayores a DP2, mientras la velocidad de hidrólisis presenta una tendencia a la baja disminuyendo hasta un 50%. Este favorecimiento de la reacción de transferencia puede deberse a una mayor afinidad de la enzima por las moléculasceptoras, una afinidad que puede incrementarse conforme mayor sea el DP de la molécula aceptoras debido a la existencia de interacciones en subsitios de unión a sustrato superiores al +2 (Strube et al., 2011). En este sentido, estudios calorimétricos permitieron determinar K_a de 73.5, 544 y 750 M^{-1} (K_d 13.6, 1.8 y 1.3 mM) en las interacciones entre SacB y sacarosa, LevanBB (\overline{DP} 16) y LevanB (\overline{DP} 50). Estos valores muestran una diferencia de una orden de magnitud entre el sustrato (DP2) y levanas

con \overline{DP} 16 y \overline{DP} 50 atribuidos posiblemente a sitios de unión en la superficie de SacB (Raga-Carbajal et al., 2016)

4.3 CONCLUSIONES

Los resultados de este capítulo confirman que la levansacarasa de *B. subtilis* desarrolla un mecanismo no procesivo en la síntesis LevanB y muestran por primera vez que ocurre a través de la generación de múltiples intermediarios que tienen su origen en distintas moléculas iniciadoras a través de la red de reacciones de transfructosilación esquematizada en la Fig. 4.17. Una primera familia de intermediarios se forma en tiempos tempranos de reacción a partir de la transferencia sobre los trisacáridos 1-kestosa y 6-kestosa. Dentro de este grupo también se incluye a la neo-kestosa y su principal producto de transferencia, la 6-neo-nistosa. Conforme avanza la reacción, en el medio de reacción se acumulan sub-productos con capacidad de fungir también como moléculas iniciadoras, entre ellos destacan principalmente la levanobiosa y la blastosa. La transferencia sobre ellos da lugar a series de oligolevanas y una nueva serie de levanas denominada blasto-FOS en tiempos posteriores de reacción (intermediarios secundarios).

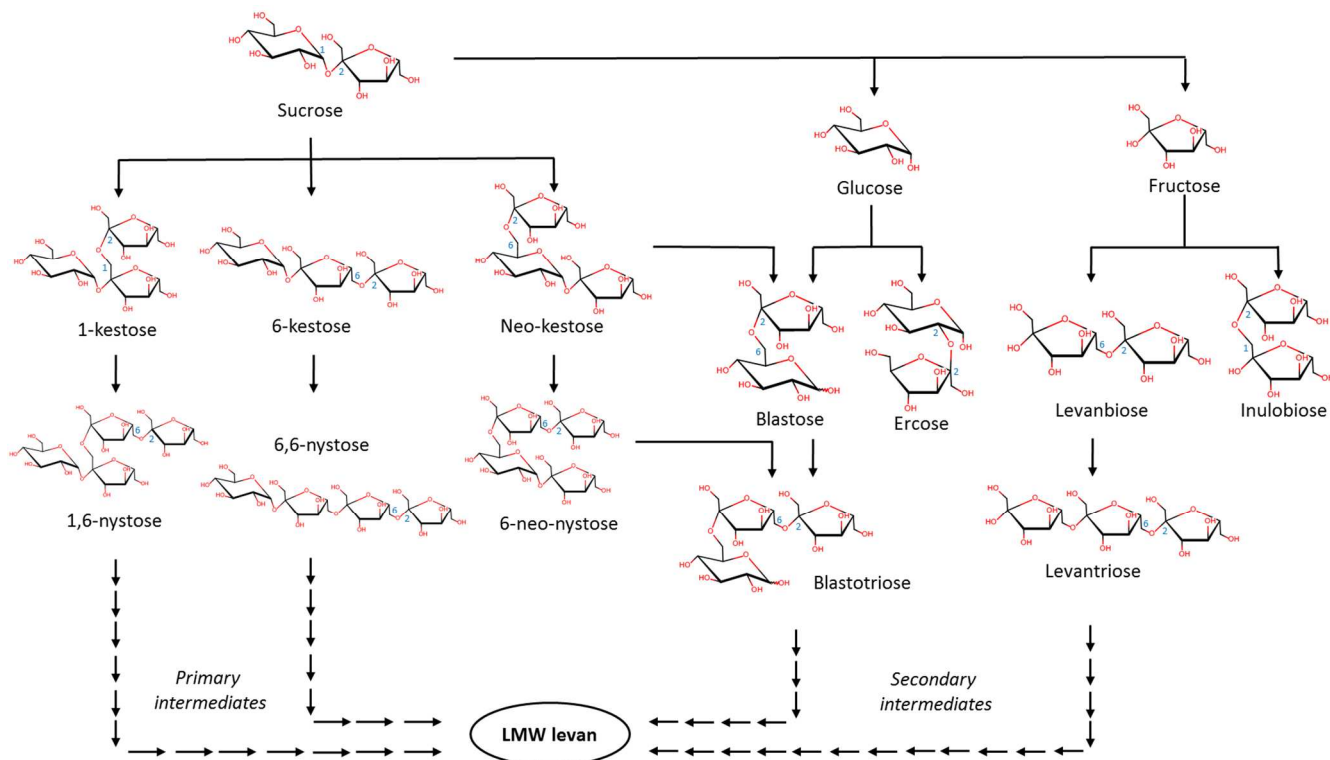


Fig. 4.17 Diagrama de los iniciadores e intermediarios involucrados en la síntesis no procesiva de LevanB desarrollada por la levansacarasa de *Bacillus subtilis*. Las series de levanas identificadas fueron clasificadas como intermediarios primarios o secundarios de acuerdo la fase de la reacción en la que se forman.

Los neo-FOS identificados son eventualmente consumidos debido a su capacidad de actuar como donadores ante la escases de sacarosa, incrementando la formación de blasto-FOS propensos a ser elongados. Como producto final se obtiene un conjunto de cadenas de levanas reductoras y no reductoras, dada el componente inicial que las integra. Estos resultados hacen evidente la participación de la fructosa y por tanto la actividad hidrolítica de SacB en la composición de la levana de bajo peso molecular.

Adicionalmente, los datos cinéticos sugieren que, dentro de los intermediarios secundarios, los trisacáridos constituyen los primeros aceptores de mayor eficiencia debido a un claro favorecimiento en la reacción de transferencia. De esta forma, si bien la levanobiosa y la blastosa son los iniciadores de los intermediarios secundarios, la transferencia sobre estas series de intermediarios ocurre mucho más eficientemente una vez se ha transferido una molécula de fructosa a los iniciadores. Los intermediarios de mayor tamaño continúan incrementando la velocidad de transferencia atribuido a la existencia de subsitios de unión accesibles a productos de mayor tamaño.

Capítulo 5

Estudio de aceptores inherentes al Mecanismo Procesivo: Síntesis de LevanA

Los estudios realizados en este capítulo se desarrollan en el marco de una polimerización procesiva, como la que se propone para la síntesis de LevanA, un producto de gran PM. En un mecanismo procesivo se plantea que la enzima mantiene unida a la molécula aceptora para ser sometida a múltiples ciclos de transferencia antes de su disociación. SacB desarrolla exclusivamente este mecanismo a concentraciones bajas de enzima, acumulando LevanA sin la detección de intermediarios de tamaño superior DP 20 (Fig. 5.1). Considerando esto, los estudios están encaminados en la evaluación de las distintas moléculas aceptoras que se identificaron como inherentes a la síntesis de LevanB en el capítulo anterior y que pudieran ahora ser capaces de integrarse a la maquinaria de elongación procesiva. Para ello, se retoma el estudio de la mutante H243L por Ortiz-Soto et al. (2008) y que se caracteriza por tener especificidad hacia la síntesis de LevanA. Lo anterior se realiza con el fin de proponer una enzima modelo alternativa para el estudio de la síntesis de LevanA dada la limitante impuesta por el efecto de la cantidad de enzima que se debe considerar cuando se usa SacB nativa.

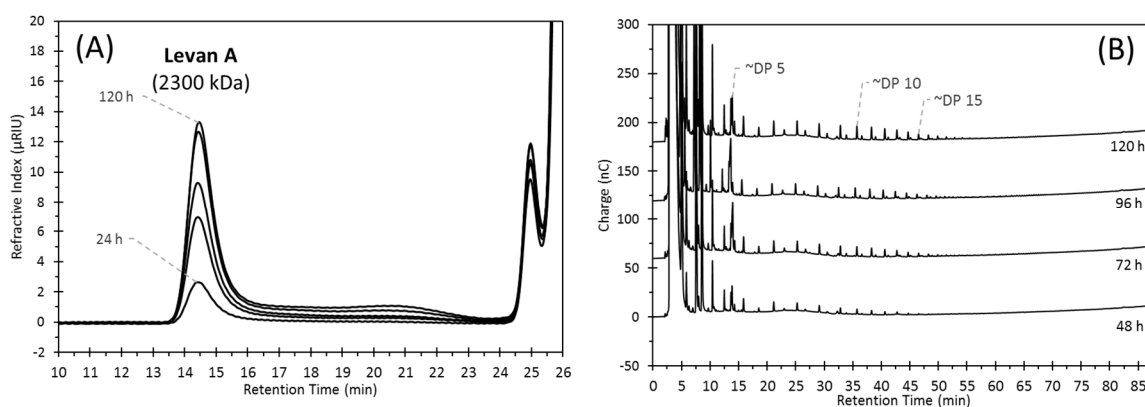


Fig. 5.1 Síntesis procesiva de LevanA monitoreada por GPC(A) y HPAEC-PAD (B). Condiciones de Reacción: SacB 0.01 μ M (0.55 μ g/mL, 0.1 U/mL), Sacarosa 100 g/L, 37°C .

5.1 Mutante H243L, enzima específica para la síntesis de LevanA

Estudios anteriores a este trabajo reportaron que la mutante H243L de SacB mantiene parámetros cinéticos parecidos a la enzima nativa pero modifica el perfil bimodal de levanas hacia la síntesis exclusiva de LevanA (Ortiz-Soto et al., 2008). Este perfil es desarrollado por SacB al emplear bajas cantidades de enzima ($0.01 \mu\text{M}$) y por tanto se requieren largos tiempos de reacción. La síntesis de LevanA y el mecanismo que da lugar a ella es una de las incógnitas en el estudio de SacB, de forma que la obtención de una variante que sirva de modelo para el estudio de la elongación de LevanA resulta de suma utilidad. Por lo anterior, se decidió estudiar la mutante H243L analizando el efecto de las condiciones de reacción (concentración de enzima y sustrato) en su perfil de productos.

5.1.1 Efecto de la concentración de enzima y concentración de sustrato sobre la especificidad de producto

Ensayos preliminares arrojaron que la mutación H243L origina una reducción de la actividad global (hidrólisis+transferencia) en la que se mantiene el 56% de la actividad original, mientras que en términos de la relación H/T se obtiene una paridad 50/50 entre ambas reacciones, un porcentaje similar en términos de transferencia al determinado para SacB en condiciones estándar de reacción (41/59 empleando $0.1 \mu\text{M}$ de enzima, 100 g/L de sacarosa, 37°C , (Raga-Carbajal et al., 2016)). Conociendo lo anterior se evaluó el efecto de las condiciones de reacción sobre el perfil de productos de la variante H243L empleando dos concentraciones de enzima ($0.1 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$) y dos concentraciones de sustrato (100 y 400 g/L de sacarosa). Las reacciones se desarrollaron hasta tiempos en los que se alcanzaron conversiones arriba del 90%. En estas condiciones finales es donde se realiza la comparación de las relaciones H/T.

En las reacciones empleando 100 g/L de sacarosa como sustrato, se puso de manifiesto la especificidad de la mutante H243L hacia la síntesis de LevanA, de tal modo que la producción exclusiva de este polímero ocurre sin importar la concentración enzimática empleada (Fig. 5.2). Esto adquiere mayor notoriedad si se considera que las concentraciones empleadas ($0.1 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$) guían a SacB hacia la síntesis bimodal (LevanA y LevanB) y síntesis exclusiva de LevanB, respectivamente, sin importar la concentración de sacarosa (Raga-Carbajal et al., 2016). Los cromatogramas de la Fig. 5.2 muestran también interrupciones de la línea base en tiempos de elusión entre 23.5 y 25 min los cuales indican la formación y acumulación de oligosacáridos, este fenómeno se observa también en las reacciones de síntesis exclusiva de LevanA por SacB, y está asociada a la liberación de oligosacáridos al medio de reacción con DP de alrededor de 20. La mayor diferencia entre

estas dos primeras condiciones evaluadas es la cantidad de polímero generado. La reacción con 1 μM de enzima muestra menor producción de polímero, lo cual se relaciona con una disminución de 22% en la cantidad de fructosa transferida cuando se compara con la reacción con 0.1 μM de enzima.

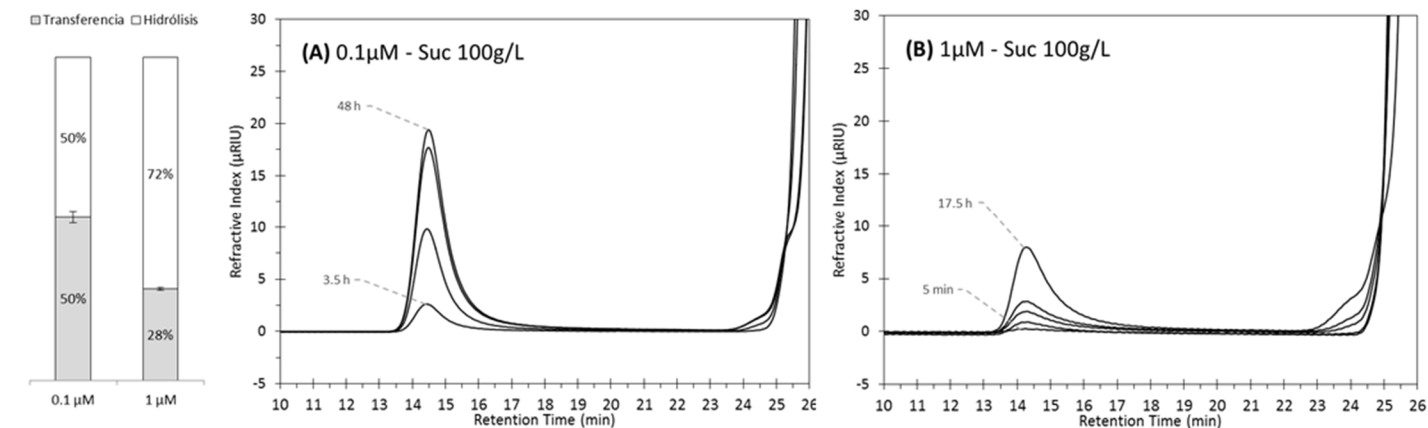


Fig. 5.2 Relación H/T y evolución del perfil de levanas en reacciones de H243L con 100 g/L de sacarosa empleando dos diferentes concentraciones de enzima

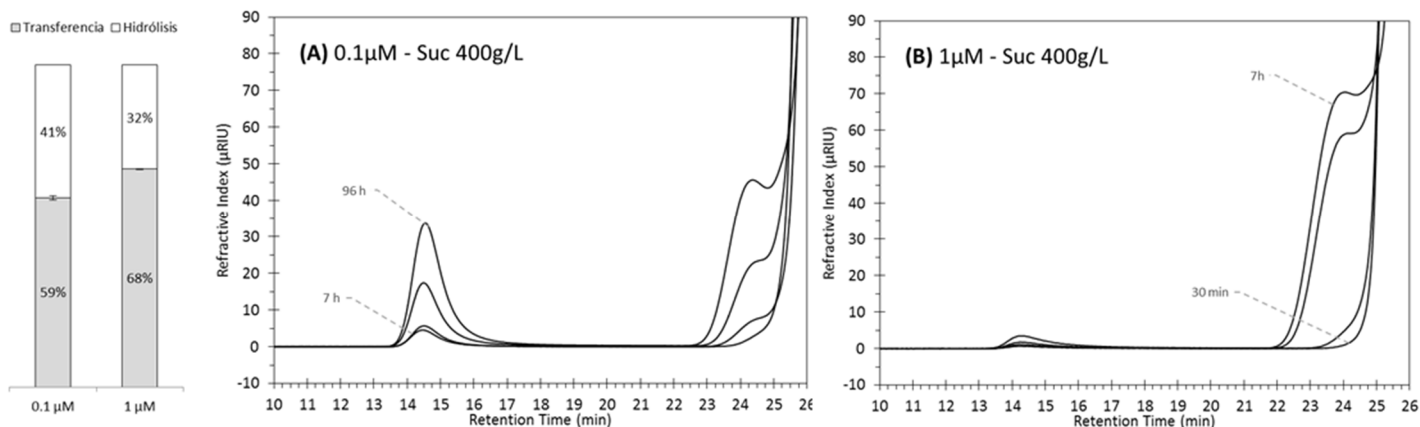


Fig. 5.3 Relación H/T y evolución del perfil de levanas en reacciones de H243L con 400 g/L de sacarosa empleando dos diferentes concentraciones de enzima.

Con el fin de evaluar el efecto de la concentración de sustrato en el perfil de productos, se realizaron a continuación reacciones incrementando a 400 g/L la cantidad de sacarosa inicial. Este incremento favoreció la formación de una distribución adicional de bajo PM con aproximadamente 3.3 kDa en promedio (Fig. 5.3), esto corresponde a menos de la mitad del tamaño típico de LevanB (7.4 kDa), por lo tanto, este producto puede considerarse como una LevanB de menor tamaño que se denominó *LevanBB*. A esta concentración de sustrato, la reacción con 0.1 μM de H243L (Fig. 5.3-A) tiene como productos poliméricos a LevanA y LevanBB en proporciones similares. Asimismo, esta condición generó una relación H/T de 41/59, de modo que la transferencia registró un incremento de 9% en comparación con la

reacción con 100g /L de sacarosa. Por otro parte, la reacción empleando 1 μM de enzima y 400 g/L de sustrato tiene como producto mayoritario y casi exclusivo a LevanBB (Fig. 5.3-B). Es de hacer notar que esta reacción requirió únicamente 7 h para alcanzar un consumo de sustrato por arriba de 90%, mientras que la reacción con 100 g/L requirió 17.5 h. En términos de la relación H/T, la reacción que dio lugar exclusivamente a LevanBB registró 68% de transferencia por 32% de hidrólisis (Fig. 5.3), lo que indica un incremento de 40% en la cantidad de fructosas transferidas con respecto a la reacción con 100 g/L de sacarosa.

Los resultados de esta sección muestran que la mutante H243L preserva la síntesis exclusiva de LevanA en condiciones de concentración de enzima donde SacB sintetiza un perfil bimodal de levanas o preferencialmente LevanB (Raga-Carbajal et al., 2016), esto sugiere que H243L es menos susceptible al incremento de la concentración de enzima, al menos en reacciones con 100 g/L de sacarosa. Por otro lado, la concentración de sacarosa parece tener un efecto mayor en la especificidad de H243L, de modo que su incremento a 400 g/L favorece la generación de una distribución adicional de productos de bajo PM. Efectos similares han sido reportados para las levansacarosas de *Zymomonas mobilis* y *Pseudomonas syringae*, que en condiciones de alta concentración de sacarosa anulan la síntesis de su producto polimérico en favor de la generación de FOS (Santos-Moriano et al., 2015; Visnapuu, Mardo, & Alamäe, 2015). Sin embargo, los productos de bajo PM que H243L genera son de mayor tamaño a los obtenidos en estos reportes y llegan a ser los únicos en la condición evaluada de mayor concentración de enzima y sustrato. De hecho, los perfiles obtenidos con 400 g/L de sacarosa y 0.1 y 1 μM de enzima pueden considerarse como un perfil bimodal y uno de exclusivamente una distribución de bajo PM, respectivamente, lo cual asemeja a lo sintetizado por SacB en las mismas condiciones de reacción, con la salvedad que SacB produce distribución con un PM promedio del doble al alcanzado por H243L. Esta capacidad limitada de elongación de los productos de bajo PM podría ser la responsable de las diferencias observadas entre SacB y H243L en las reacciones con 100 g/L.

5.1.2 Generación no procesiva de oligosacáridos asociada a la síntesis de LevanA

La síntesis exclusiva de LevanA desarrollada por SacB, se ha observado acompañada de la baja acumulación de oligosacáridos con DP menor a 20. De forma similar, la síntesis de LevanA desarrollada por H243L conlleva la liberación de oligosacáridos con DP menor a 15 que permanecen en baja concentración. Los perfiles de oligosacáridos observados al final de estas reacciones de síntesis se muestran en la Fig. 5.4. Los productos identificados en ambos perfiles se incluyen en la Fig. 5.5, junto con las rutas de transferencia que les da lugar. Entre estos productos se encuentran los mismos disacáridos y algunos trisacáridos observados

también en la síntesis de LevanB estudiada en el capítulo anterior. En particular, destaca la presencia de oligosacáridos con DP entre 4 y 20 correspondientes a levanas derivadas de únicamente 1-kestosa y 6-kestosa (1K-FOS y 6K-FOS). Con excepción de la blastotriosa observada en el perfil de H243L, ninguna oligolevana o blastoFOS con DP mayor a 2 se observa en los perfiles de las dos enzimas. La ausencia de estos productos está asociada a una menor acumulación de blastosa y levanobiosa durante la síntesis de LevanA comparada a la observada en la síntesis de LevanB.

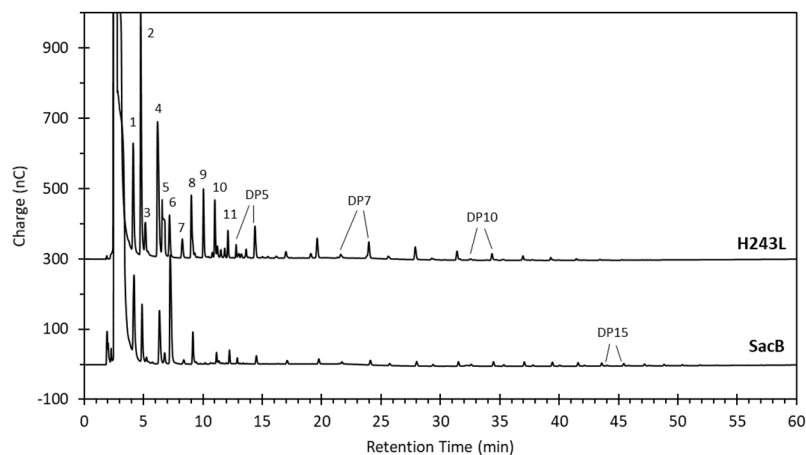


Fig. 5.4 Perfil de oligosacáridos en HPAEC-PAD generados durante la síntesis exclusiva de LevanA desarrollada por SacB y H243L. Condiciones de reacción: SacB 0.01 μ M / H243L 0.1 μ M, 100 g/L sacarosa, 37°C. 1:1-kestosa, 2: blastosa, 3: inulobiosa, 4: 6-kestosa, 5: levanobiosa, 6: neo-kestosa, 7: ercosa (isómero β 2-2 de la sacarosa), 8: 1,6-nistosa, 9: blastotriosa, 10: 6,6-nistosa, 11: 6-neo-nistosa, DP5-DP15: 1K-FOS y 6K-FOS con DP 5-15.

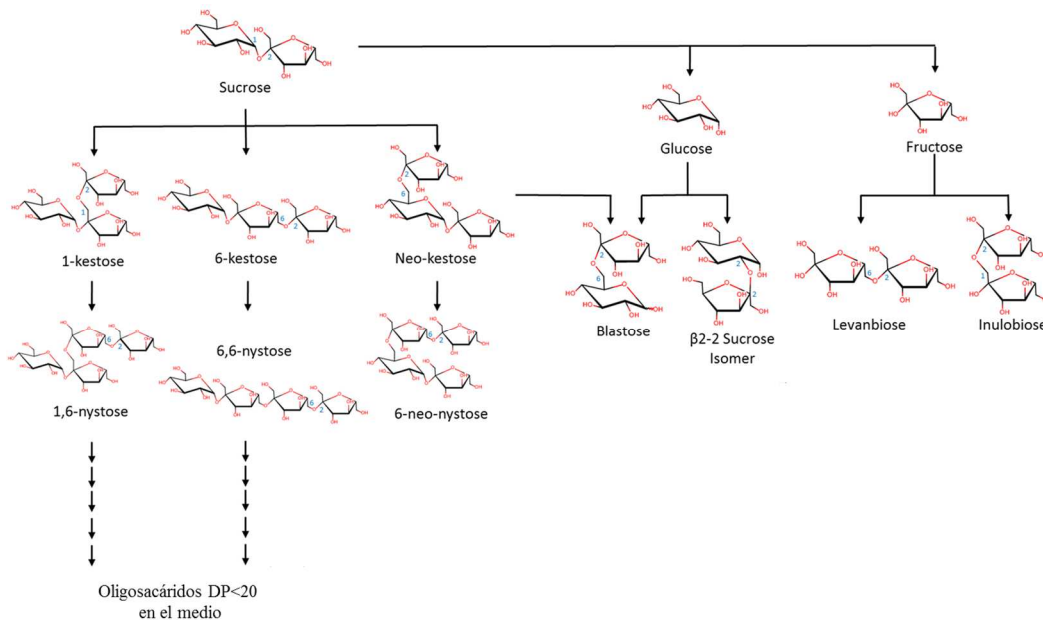


Fig. 5.5 Oligosacáridos formados durante la síntesis exclusiva de LevanA desarrollada por SacB.

Cabe recordar que 1K-FOS y 6K-FOS funcionan como intermediarios primarios en la síntesis no procesiva de LevanB, sin embargo, el papel que juegan estos mismos oligosacáridos en la síntesis de LevanA no es del todo claro. Por un lado, estos productos detectados, y por tanto libres en el medio de reacción, podrían tratarse de intermediarios de baja afinidad en la síntesis de LevanA formados no-procesivamente que al alcanzar un tamaño determinado (DP ~20) podrían alcanzar una afinidad tal que les permita ser elongados vía un mecanismo procesivo y por tanto dejar de aparecer en solución. Como segunda hipótesis, los oligosacáridos detectados podrían ser producto de eventos de disociación de la enzima, como una forma de *aborto* durante las primeras fases de la elongación procesiva iniciada por SacB.

Es de hacer notar que tanto en la reacción de SacB y H243L que dan lugar a la síntesis exclusiva de LevanA, la formación de oligosacáridos permanece en muy baja proporción comparado con el producto polimérico. Sin embargo, se observó que la formación de estos productos de bajo PM se incrementa al aumentar la concentración de sustrato, a tal grado que la formación exacerbada que da lugar a la acumulación de LevanBB puede inhibir la formación de LevanA. De hecho, el monitoreo de la formación de LevanBB a través de HPAEC-PAD (Fig. 5.6-A), permitió observar que esta distribución de bajo PM se forma vía un mecanismo no-procesivo asemejando la síntesis de LevanB, con la generación de levanas de las series 1K-FOS y 6K-FOS en los primeros tiempos de reacción (cuadros negros en Fig. 5.6-B) y la formación de oligolevanas y blasto-FOS en tiempos posteriores (triángulos negros en Fig. 5.6-B). La principal diferencia radica en que el tamaño máximo que alcanzan dichos intermediarios en la reacción de H243L es de alrededor de un DP de 25.

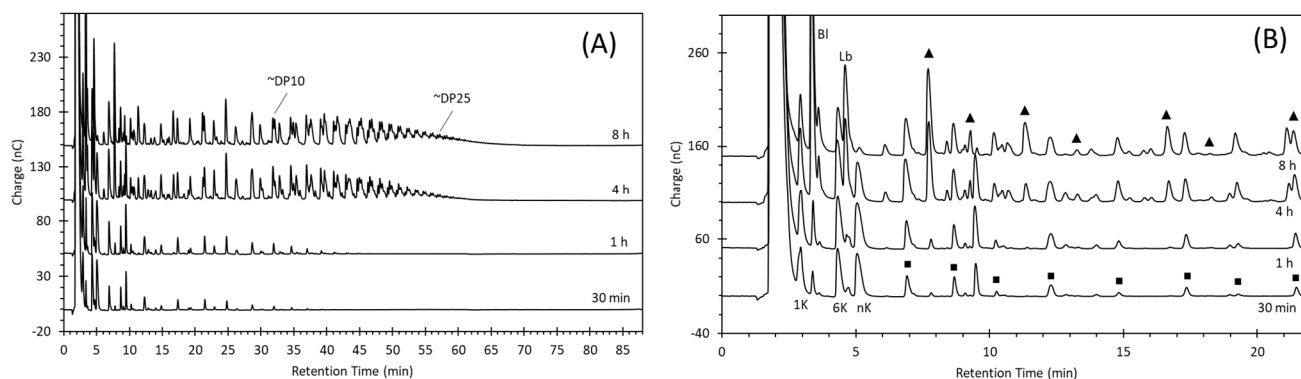


Fig. 5.6 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante la formación de LevanBB desarrollada por H243L. El cromatograma B corresponde a una vista ampliada del cromatograma A. Condiciones de reacción: H243L 1 μ M, 400 g/L sacarosa, 37°C. 1K: 1-kestosa, 6K: 6-kestosa, nK: neo-kestosa, BI: blastosa, Lb: levanobiosa, ■ : 1K-FOS y 6K-FOS, ▲ : blasto-FOS y oligolevanas.

El tamaño característico de este nuevo producto denominado LevanBB motivó su producción y purificación a escala de 50 mL para ser empleado en varios análisis desarrollados en este trabajo. En particular, este producto corresponde a la levana con \overline{DP} 16

empleada en reacciones de aceptor en el capítulo anterior. Dichos ensayos demostraron que las levanas que componen LevanBB puede ser ocupadas como iniciadores en la síntesis de LevanB. Por tal motivo, la acumulación de LevanBB en las reacciones de H243L, delata una capacidad limitada de esta enzima para elongar no procesivamente productos de bajo PM.

5.1.3 Información estructural

El residuo H243 es un aminoácido semiconservado entre las LSs, está presente en todas LS reportadas del género *Bacillus*, mientras que en LS de bacterias Gram negativas puede encontrarse triptófano o fenilalanina en dicha posición (Anexo D). Este es un residuo interno que en la levansacarasa SacB se encuentra estructurando una α -hélice localizada entre la segunda y la tercera hoja de la β -propela, que protubera la cavidad catalítica (Fig. 5.7).

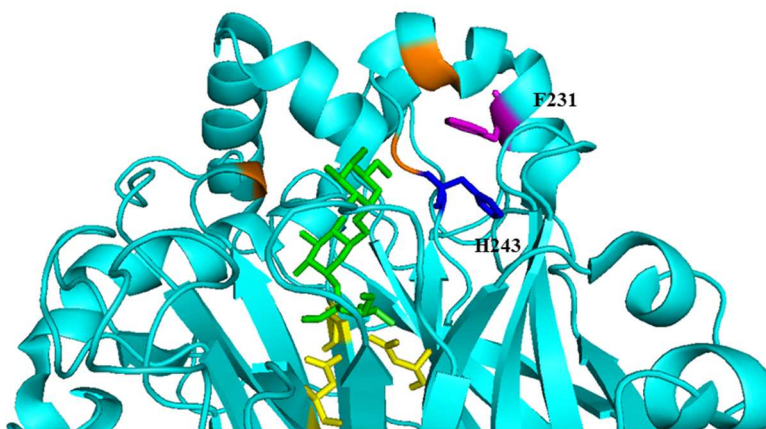


Fig. 5.7 Localización de los residuos H243 y F231 en la estructura cristalográfica de SacB (PBD: 3BYN). En verde una molécula de rafinosa y en amarillo los residuos catalíticos.

Una inspección de residuos cercanos permitió observar que el aminoácido H243 posee una orientación espacial que podría favorecer una interacción de “stacking” entre este residuo y F231 al interior de la región en la que se encuentra la α -hélice (Fig. 5.7). Adicionalmente, sobre la α -hélice se halla el residuo Y237, que como más adelante se detallará es importante para la síntesis de LevanB, permitiendo la efectiva elongación no procesiva de productos con DP más allá de 10. De este modo, la mutación por leucina en la posición 243 podría haber eliminado la interacción de “stacking” con F231 desestabilizando una región importante para la síntesis de LevanB, derivando en la capacidad limitada de elongación no procesiva que muestra la variante H243L. Desafortunadamente, los intentos de cristalización realizados durante el desarrollo de este proyecto no fueron fructíferos en la obtención de algún cristal apto para estudios de difracción que hubieran permitido clarificar el cambio estructural generado en esta variante.

5.2 Evaluación de moléculas aceptoras

Con el fin de encontrar moléculas aceptoras propias de la síntesis de LevanA se evaluaron algunos de los compuestos ya probados en la síntesis de LevanB. Las moléculas evaluadas fueron los compuestos purificados: 1-kestosa, 6-kestosa, neo-kestosa, levanotriosa y 6,6,6,6,6-kestooctaosa, así como una mezcla de disacáridos (levanobiosa y blastosa), una de trisacáridos (levanotriosa y blastotriosa), y una mezcla de aceptores con DP promedio de 16 (LevanBB). Como modelo enzimático se empleó la mutante H243L en las condiciones de reacción en las que mostró mayor rendimiento del polisacárido (0.1 μM enzima, 100 g/L sacarosa, 37°C).

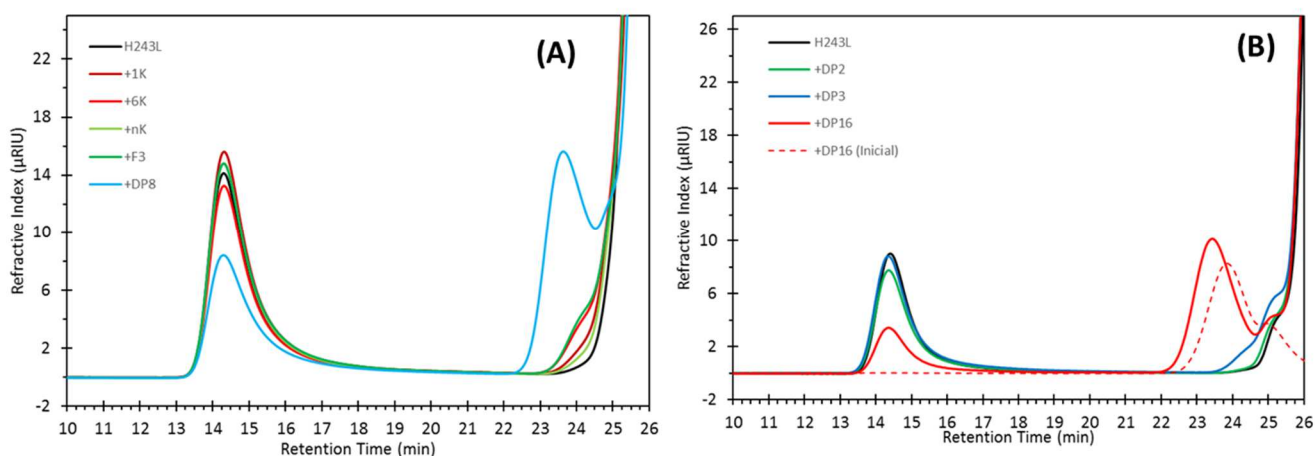


Fig. 5.8 Comparación del perfil en GPC obtenido en la reacción de H243L adicionada con distintos aceptores. 1K: 1-kestosa, 6K:6-kestosa, nK:neo-kestosa, F3:levanotriosa, DP8:6,6,6,6,6-kestooctaosa, DP2: levanobiosa+ blastosa, DP3: levanotriosa y blastotriosa, DP16: LevanBB. Condiciones de reacción: 0.1 μM de enzima, 292 mM, 37°C, pH 6, aceptor 5 mM, 24 h.

La reacción de H243L en las condiciones de estudio alcanzó la máxima conversión a las 24 h, bajo estos niveles de conversión es en el que se hacen las comparaciones de perfiles de levanas de la Fig. 5.8. Estos perfiles revelaron que la adición de disacáridos (levanobiosa, blastosa) o trisacáridos (1-kestosa, 6-kestosa, neo-kestosa, levanotriosa, blastotriosa) no afectó la cantidad de LevanA sintetizada por H243L (Fig. 5.8-A y Fig. 5.8-B). Dentro de estas reacciones, resaltan la acumulación de productos de bajo PM, observada como interrupciones de la línea base a 24 min. En este sentido la acumulación de productos de bajo PM es claramente favorecida durante la adición de los aceptores de mayor tamaño (DP8 y LevanBB), en cuyas reacciones estos productos de bajo PM predominan a costa de una disminución en la cantidad de LevanA.

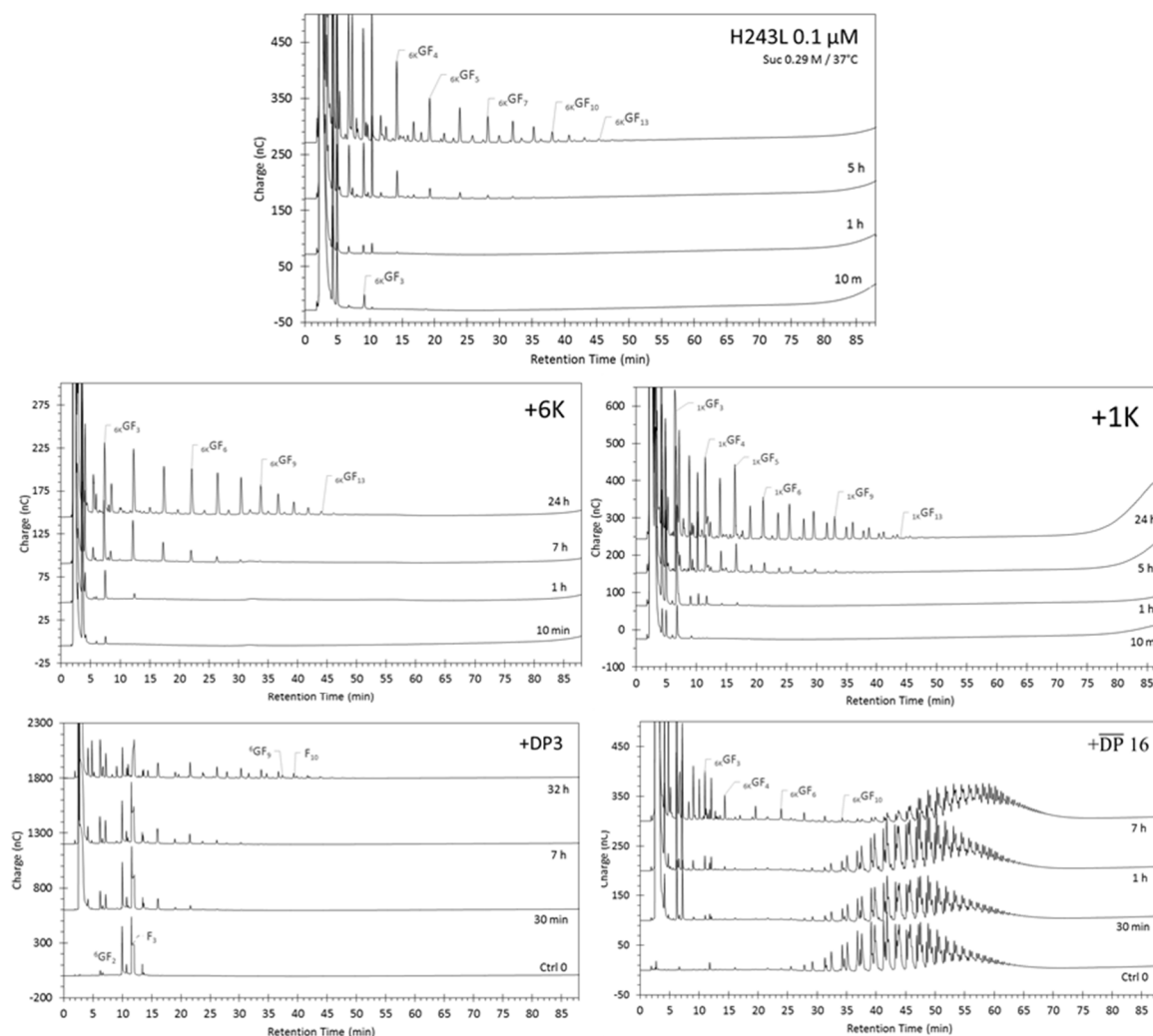


Fig. 5.8 Evolución en el perfil de oligosacáridos durante síntesis de LevanA por H243L con la adición de diferentes moléculas aceptoras. Condiciones de reacción: 0.5 μM de enzima, 100 g/L de sacarosa, 25°C, pH 6, aceptor 5mM. 1KGF_n : 1K-FOS, 6KGF_n : 6K-FOS, 6GF_n : blasto-FOS, F_n : oligolevanas.

Con el fin de definir el destino de los aceptores añadidos se analizó la evolución de algunas de estas reacciones a través de HPAEC-PAD (Fig. 5.8). Estos análisis permiten confirmar la participación de los compuestos añadidos como aceptores, sin embargo, la incorporación de estos compuestos ocurre parcialmente (dado que no se consumen totalmente) y contrario a lo esperado se lleva a cabo de forma no procesiva. En este sentido, la adición de 6-kestosa y 1-kestosa genera una mayor acumulación de 6K-FOS y 1K-FOS, respectivamente, con DP menor a 15, límite de tamaño observado en el perfil propio de la reacción de H243L. De forma similar, la adición en conjunto de los trisacáridos blastotriosa y levanotriosa favoreció la producción de blasto-FOS y oligolevanas con el mismo límite de tamaño, cabe mencionar que estos productos no se detectan en la reacción propia de H243L.

Por otro lado, en la reacción con LevanBB puede observarse el ligero incremento en el tamaño de la distribución de oligosacáridos que la componen, sin afectar el perfil de

productos con DP menor a 9 que H243L habitualmente acumula. Lo anterior corrobora que LevanBB actúa como aceptor y es elongado limitadamente de forma no procesiva.

Los experimentos de adición de aceptores se corroboran en reacciones de SacB para descartar algún efecto específico de la variante H243L. Los resultados mostraron que tampoco ningún aceptor condujo a una mayor acumulación de LevanA en reacciones catalizadas por SacB, en contraste, todos ellos inhibieron la producción de dicho polímero (Fig. 5.9). Inclusive resalta la capacidad de LevanBB como aceptor para ser eficientemente elongado hasta un tamaño similar al de LevanB de una forma no procesiva, según se observó también por HPAEC-PAD (datos no mostrados).

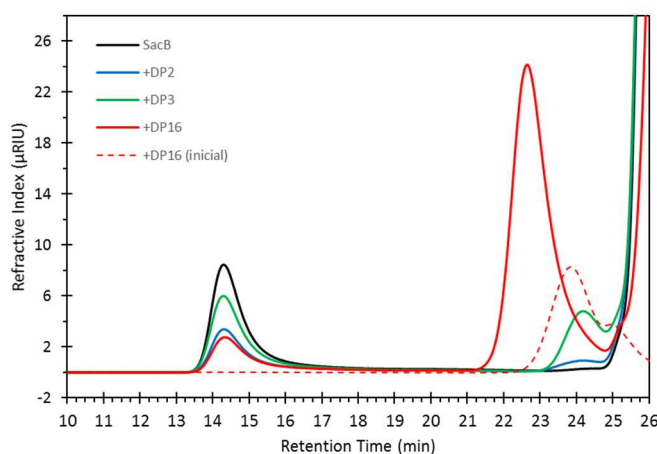


Fig. 5.9 Comparación del perfil en GPC obtenido en la reacción de SacB adicionada con distintos aceptores. DP2: levanobiosa+ blastosa, DP3: levanotriosa y blastotriosa, DP16: LevanBB. Condiciones de reacción: 0.01 μ M de enzima, 292 mM, 37°C, pH 6, aceptor 5 mM, 120 hrs.

La efectiva incorporación de cualquier aceptor en el mecanismo de LevanA hubiera supuesto la desaparición de este en el medio de reacción, aunado a un aumento significativo de la cantidad de polímero, lo anterior considerando que cada molécula de LevanA se debe formar a partir una molécula iniciadora. Con base en esto, los resultados indican que ninguno de los aceptores evaluados fue exitosamente incorporado en la síntesis procesiva de LevanA, aun cuando algunos ya habían sido reconocidos como iniciadores en la síntesis de LevanB, y que otros poseían un tamaño que podría haber favorecido una mayor interacción con la enzima debido a su longitud. Por otro lado, contrasta la capacidad que mostraron estos aceptores a ser elongados no procesivamente para dar lugar a productos de bajo PM. Desafortunadamente, no se pudo encontrar información de otros autores con la que se pudiera contrastar estos resultados, ya que los únicos reportes que señalan un favorecimiento en la formación de este tipo de polímeros de alto PM están relacionados a factores fisicoquímicos de la reacción tales como la presencia de solventes orgánicos o la inmovilización de la enzima

(Tanaka et al., 1979; Iizuka et al. 2002; Chambert & Petit-Glatron, 1989), sin prestar atención a la dinámica de formación del polímero.

Si bien los resultados de estos experimentos no son concluyentes, si permiten hipotetizar con respecto a la naturaleza de la polimerización procesiva de levanas que desarrolla SacB. Puede establecerse que la síntesis de LevanA conlleva un mecanismo estrictamente procesivo en el que la molécula iniciadora debe permanecer unida en todo momento a la enzima. Dentro de este mecanismo, una primera fase de alargamiento sería especialmente susceptible a ser detenida por diferentes factores, derivando en la liberación del aceptor en crecimiento al medio de reacción. Entre los factores que favorecen esta disociación pueden incluirse altas concentraciones de enzima (p. ej. 1 μ M), de sustrato (p. ej. 400 g/L) o de fuerza iónica (p. ej. 500 mM de fosfatos o acetatos). En este sentido, una vez que el aceptor es liberado prematuramente sería incapaz de unirse a la enzima en forma productiva para continuar la síntesis procesiva, siendo ahora sujeto a un alargamiento del tipo no procesivo. Un posible cambio conformacional del aceptor una vez que se disocia de la enzima podría ser el responsable de tal incapacidad. La efectiva elongación procesiva podría alcanzarse una vez el aceptor en crecimiento alcanza cierto tamaño o estructura que evita su disociación de la enzima guiando a su alargamiento hasta constituir un polímero de alto PM con miles unidades de fructosa en su estructura.

Con el fin de conciliar esta propuesta con el determinante efecto de la concentración de SacB en el cambio del mecanismo de elongación, puede plantearse la existencia de sitios de unión de sustrato y aceptores que participan en la elongación de levanas. El cambio del mecanismo de elongación resultaría de la participación de este segundo sitio de unión dentro de un fenómeno de *robo de los aceptores*. De esta forma, a altas concentraciones de enzima, las moléculas libres de SacB serían capaces de truncar la síntesis procesiva de levanas en sus primeros estadios al robar los aceptores en crecimiento asociados a otras moléculas de SacB. Estos aceptores serían entonces liberados al medio de reacción y susceptibles a un alargamiento del tipo no procesivo. Por otro lado, cuando se emplean bajas concentraciones de SacB, las interacciones entre moléculas de enzima e intermediarios en crecimiento en otras moléculas de SacB no tendrían lugar, lo cual permitiría la completa elongación procesiva de LevanA.

5.3 CONCLUSIONES

La mutante H243L constituye una variante de SacB con mayor tolerancia al efecto inhibitorio de la concentración de enzima en la síntesis de LevanA. El efecto de la mutación parece estar relacionado con la desestabilización de una zona relevante para la síntesis de

LevanB que trunca su elongación provocando la acumulación de levanas no mayores a DP de alrededor de 25. De este modo, seleccionando las condiciones de reacción esta enzima puede ser empleada con dos objetivos distintos: por un lado, puede permitir la síntesis de levana con una productividad mayor a SacB y por otro lado, puede emplearse en la producción de una distribución de levanas de PM menor a la de LevanB convencional, expandiendo así el repertorio de levanas obtenidas a través de la levansacarasa SacB.

Por otro lado, tanto H243L como SacB brindaron resultados similares en lo que refiere a los ensayos de evaluación de aceptor en la síntesis exclusiva de LevanA. Estos ensayos revelaron la incapacidad de distintos aceptores a integrarse en el mecanismo procesivo de LevanA. Lo anterior podría derivarse de una naturaleza estrictamente procesiva del mecanismo de elongación de LevanA, de forma que los sustratos exógenos solo pueden elongarse no procesivamente. En este sentido los oligosacáridos que se forman lateralmente durante la síntesis de LevanA pueden deberse a eventos de disociación de la enzima en las primeras fases del proceso que apagan la síntesis procesiva y activan la elongación no procesiva.

Capítulo 6

Identificación de sitios de interacción enzima-aceptor

Se ha hipotetizado sobre la existencia de sitios de interacción de oligosacáridos ubicados en la superficie de SacB capaces de guiar o auxiliar la elongación de la levanas. Relacionado a esto, en el capítulo 4 se demostró que el grado de polimerización de los intermediarios de la síntesis de LevanB tiene un efecto en la velocidad de transferencia desarrollada cuando actúan como aceptores. Lo anterior puede traducirse en la existencia de varios sitios de interacción de la enzima con las moléculasceptoras, de tal forma que entre mayor número de sitios de interacciones cubra dicho aceptor mayor es la afinidad por él. Es así como en el presente capítulo se presenta la búsqueda y caracterización de sitios de interacción enzima-aceptor involucrados en la síntesis de levanas de SacB a través de dos aproximaciones. La primera de ellas fue el empleo de herramientas bioinformáticas para la predicción de posibles sitios de interacción, con lo cual 9 residuos superficiales fueron seleccionadas y evaluados a través de mutaciones sitio-dirigidas. Por otro lado, y como último objetivo, se logró la co-cristalización de SacB en complejo con un oligosacárido, este último derivado de los esfuerzos de purificación de distintos FOS intermediarios sintetizados por SacB. La elucidación estructural del complejo cristalográfico permitió expandir la identificación de sub-sitios de unión a sustrato en el sitio activo, racionalizar algunos de los efectos observados en las mutantes previamente seleccionadas e hipotetizar sobre un segundo sitio de unión de oligosacáridos localizado fuera del sitio activo.

6.1 Selección de residuos superficiales con posible participación en la unión con aceptores

La búsqueda de posibles sitios de interacción enzima-aceptor en SacB se hizo empleando los servidores web FTMap, FTSite y metaPocket. Estas herramientas bioinformáticas están especializadas en la identificación de cavidades o regiones en la superficie de proteínas con mayores contribuciones energéticas y/o geométricas para la unión de ligandos (Kozakov et al., 2015; Zhang, Li, Lin, Schroeder, & Huang, 2011). La entrada en todos los casos fue la estructura cristalográfica de SacB, PDB 1OYG (Meng & Fütterer, 2003). Los residuos en los

cuales convergieron estos servidores fueron después filtrados seleccionando aquellos localizados alejados del sitio activo, con accesibilidad al solvente calculada a través del algoritmo ASAView (Ahmad, Gromiha, Fawareh, & Sarai, 2004), y con mayor grado de conservación entre levansacarosas de acuerdo al servidor ConSurf-DB (Celniker et al., 2013). El análisis de conservación de residuos se realizó considerando la estructura de SacB (PDB 1OYG) y las secuencias de un grupo de 12 LSs con actividad comprobada y por separado un grupo de 6 LSs del género *Bacillus*, para ello se empleó un multi-alineamiento de secuencias desarrollado en el servidor Clustal Omega (W. Li et al., 2015) que se incluye en el Anexo D. La selección final se realizó descartando aquellos residuos que ya han sido mutados en SacB o en alguna otra LS y cuyos efectos no fueron asociados al cambio del tamaño de los productos de reacción.

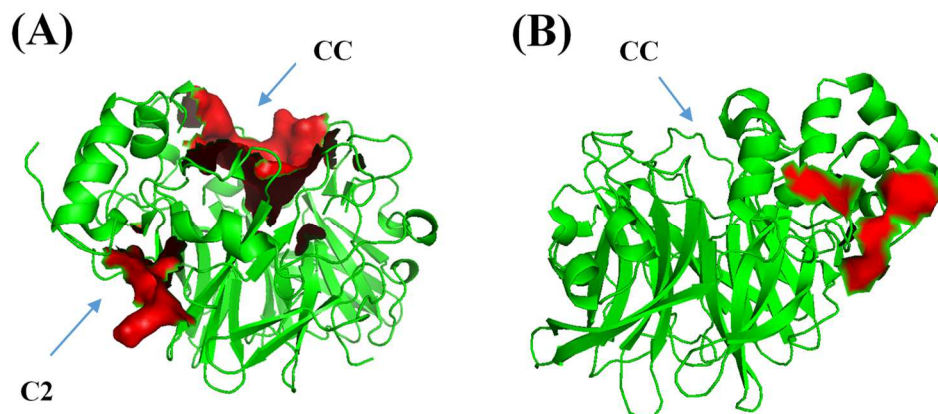


Fig. 6.1 Regiones superficiales con posible participación en la unión de ligandos. (A) En rojo la cavidad catalítica (CC) y una hipotética cavidad de unión secundaria (C2). (B) Vista de (A) girada 180° en el eje “y” mostrando en rojo el clúster de 3 residuos aromáticos superficiales (PBD: 1OYG).

Como resultado, tres regiones superficiales fueron seleccionadas. La primera de ellas corresponde a la cavidad catalítica (CC, Fig. 6.1-A), con 11 residuos conservados entre las LSs y 15 conservadas entre las LS del género *Bacillus*, entre los que se seleccionaron 4 residuos: N242, K363, Y237 y Y187. La mutación por Ala de los residuos homólogos a N242, K363 y Y237 en la LS de *B. megaterium* generó un cambio de especificidad concerniente al DP de sus productos (Strube y col., 2011). En este trabajo la mutación de estos residuos será estudiada en el marco de los dos mecanismos de elongación propuesto para SacB. La siguiente región comprende una segunda cavidad (C2) ubicada en la cara opuesta a la cavidad catalítica (Fig. 6.1-A), que contiene 4 residuos ultra-conservados y 7 conservados únicamente entre LS del género *Bacillus*. Dentro de esta región se seleccionó el residuo K389, al ser el único residuo con carga o aromático capaz de soportar alguna interacción con sacáridos. Por último, se identificó un clúster de residuos aromáticos (Y37,

Y41, Y271) situado entre las cavidades CC y C2 (Fig. 6.1-B), que fue seleccionado teniendo en mente la importancia de las interacciones del tipo "stacking" en interacciones entre proteínas y carbohidratos (Asensio, Ardá, Cañada, & Jiménez-Barbero, 2013; Hudson et al., 2015). La ubicación de los residuos seleccionados se muestra en la Fig. 6.2.

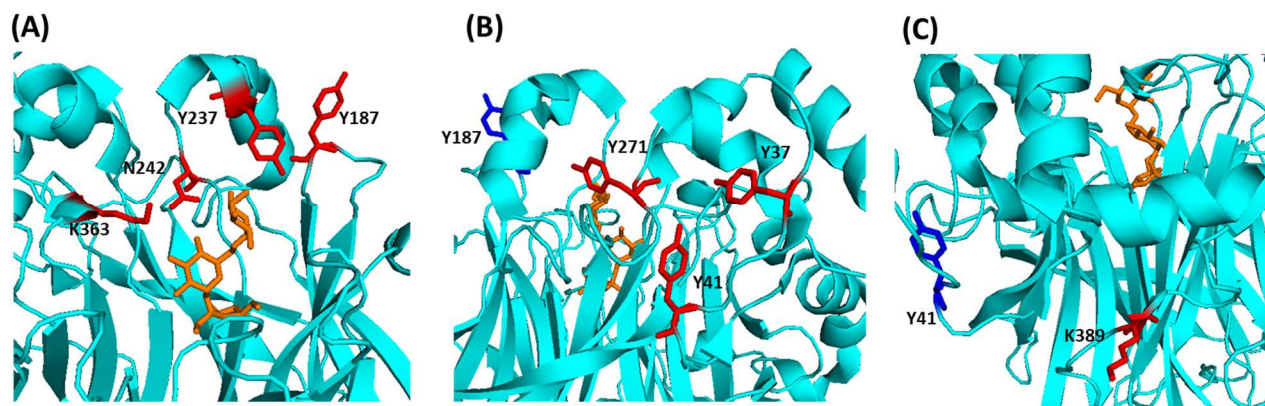


Fig. 6.2 Ubicación superficial de los residuos seleccionados con posible participación en la unión a aceptores. (A) Residuos de la cavidad catalítica, (B) Clúster de residuos aromáticos, (C) Residuo de la cavidad C2. En rojo se señalan los residuos seleccionados, en azul se presentan residuos como referencia y en naranja a la rafinosa unida en el sitio activo de la enzima (PDB: 3BYN).

6.2 Efecto de las mutaciones superficiales en la especificidad de productos

Con el fin de determinar si los residuos seleccionados son partícipes en la síntesis de levanas cada uno de ellos fue mutado por alanina. De esta forma se busca eliminar cualquier posible interacción generada por las cadenas laterales sin afectar en gran medida el esqueleto de la proteína. Para el caso del clúster exterior de tirosinas, se generó una triple mutante conteniendo las tres mutaciones Y/A. De este modo, seis variantes de SacB fueron construidas y satisfactoriamente expresadas y purificadas: N242A, K363A, Y237A, Y187A, K389A y una triple mutante (TM) Y37A/Y41A/Y271A.

En lo que respecta a la actividad específica, la mutante K389A fue un 12% más activa con respecto a la WT; sin embargo, todas las demás mutaciones produjeron una reducción a niveles entre el 88% y el 16% de la actividad global original, siendo la mutante Y187A la menos afectada y la mutante N242A la más afectada (Fig. 6.3).

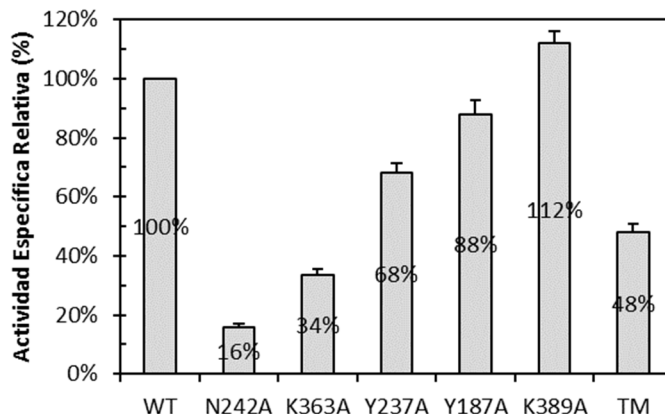


Fig. 6.3 Actividad específica relativa de las mutantes de SacB. Actividad global medida a través de la liberación de azúcares reductores. TM=Triple mutante Y37A/Y41A/Y271A.

Considerando el efecto que tiene la concentración de enzima sobre la especificidad de productos de SacB, las variantes se hicieron reaccionar con 100 g/L de sacarosa a 37°C empleando dos concentraciones de enzima: primeramente, una concentración de 0.1 μM (“Condición No. 1”, condición estándar en la que SacB produce un perfil bimodal de levanas) y posteriormente 1 μM (“Condición No. 2”, condición que dirige la síntesis hacia la formación exclusiva de LevanB).

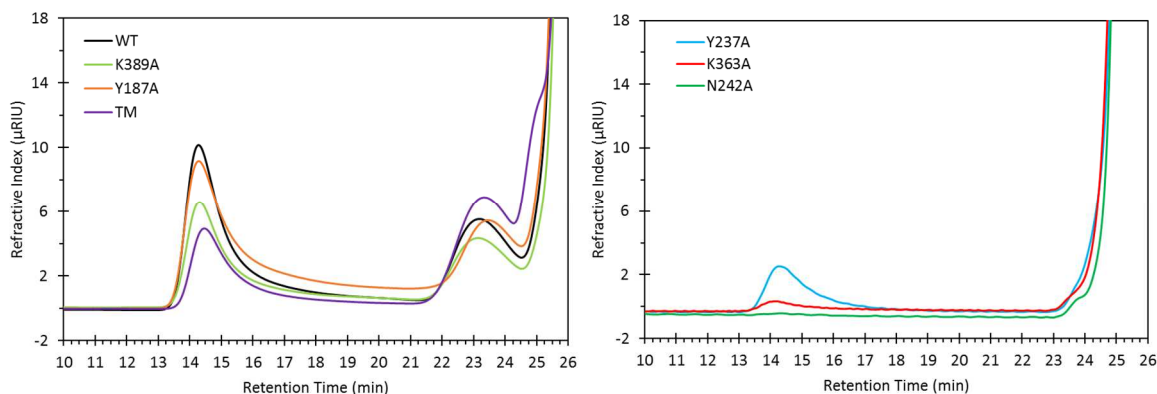


Fig. 6.4 Perfil de polímeros sintetizados por las variantes de SacB en la Condición de reacción No. 1: 0.1 μM de enzima, 100 g/L de sacarosa, 37 °C, pH6. TM=Triple mutante Y37A/Y41A/Y271A.

En la Condición No. 1 los perfiles de levanas sintetizadas (Fig. 6.4) muestran por un lado que las mutantes K389A, Y187A y TM conservan el perfil bimodal, variando entre ellas la cantidad relativa entre uno y otro polímero. En cuestión del tamaño de los productos se observa una ligera disminución en el tamaño de LevanB sintetizado por Y187A con respecto a las otras variantes. Por otro lado, las mutantes Y237A y K363A no son capaces de sintetizar LevanB y en lo que respecta a LevanA, ambas la sintetizan, pero K363A lo hace a niveles

apenas detectables. En el caso de N242A, la síntesis de polisacáridos es completamente eliminada.

En la Condición de reacción No. 2, las mutantes K389A y Y187A cambiaron su perfil bimodal hacia la síntesis exclusiva de LevanB (Fig. 6.5). El efecto de la alta concentración de enzima fue de igual forma inhibitorio para la síntesis de LevanA en las mutantes Y273A y K363A que ahora no sintetizan ningún polímero, tal como lo hace N242A en ambas condiciones evaluadas. Únicamente la variante TM conservó un perfil bimodal con una marcada preferencia hacia LevanB, pero conservando una baja producción de LevanA. Lo anterior indica que las mutantes conservan el cambio de especificidad de productos impuesto por la concentración de enzima característica de SacB, resaltando la variante TM debido a su baja pero persistente acumulación de LevanA en estas condiciones.

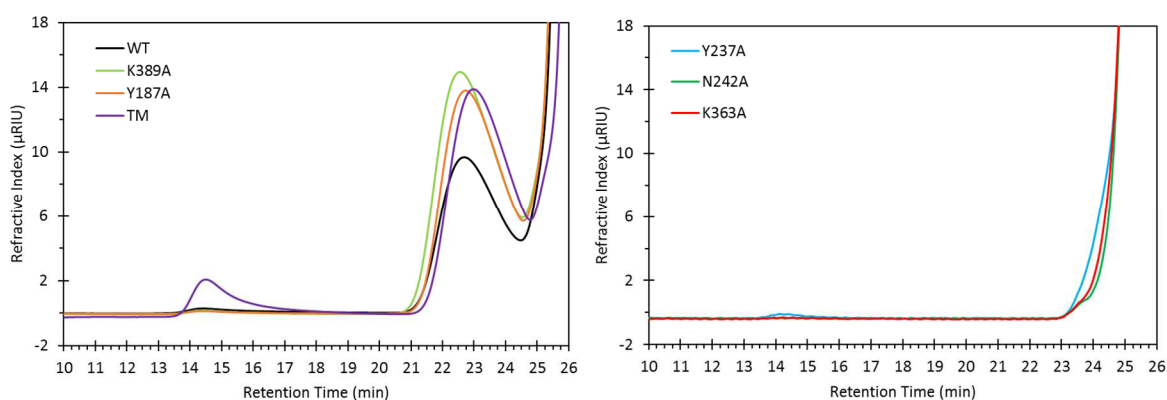


Fig. 6.5 Perfil de polímeros sintetizados por las variantes de SacB en la Condición de reacción No. 2: 1 μM de enzima, 100 g/L de sacarosa, 37 $^{\circ}\text{C}$, pH6. TM=Triple mutante Y37A/Y41A/Y271A.

Finalmente, la Fig. (Fig. 6.6) presenta el perfil de los oligosacáridos sintetizados por las variantes generadas en este estudio, los cuales son similares en las dos condiciones estudiadas para cada enzima. En lo que concierne a las mutantes que pueden sintetizar LevanB (Y187A, K389A y TM), sus perfiles son similares al generado por la enzima nativa al integrar todas las series de levanas descritas en el capítulo 4 como inherentes a la síntesis de LevanB con DP de hasta alrededor de 70. Sin embargo, es de hacer notar que el perfil de la mutante Y187A parece poseer una distribución con una media de tamaño ligeramente menor a la LevanB convencional. Esta ligera disminución en el tamaño promedio de LevanB podría estar relacionada con la moderada pérdida de actividad específica que conlleva la mutación. Desafortunadamente el análisis por HPAEC-PAD pierde resolución en esa región de PM, por lo que otro tipo de análisis se requiere para respaldar la diferenciación del producto.

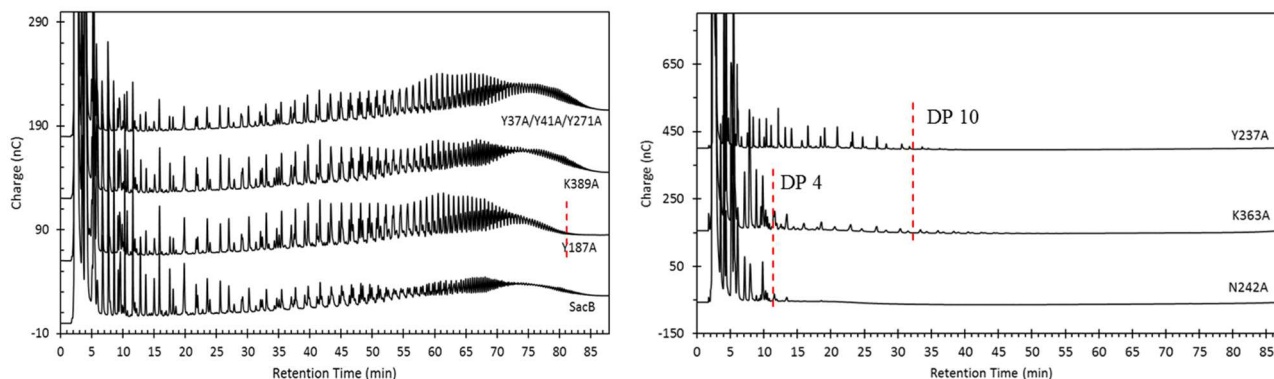


Fig. 6.6 Perfil de oligosacáridos sintetizados por las variantes de SacB. Condiciones de reacción: 1 μ M de enzima, 100 g/L de sacarosa, 37 °C, pH6

Con respecto a los perfiles de las variantes incapaces de sintetizar LevanB, estos muestran marcadas diferencias en cuanto al tamaño de los oligosacáridos detectados. En el perfil de oligosacáridos de la mutante N242A se pueden observar únicamente compuestos con DP de hasta 4, identificados como: blastosa, levanobiosa, inulobiosa, 1-kestosa, 6-kestosa, neo-kestosa, 1,6-nistosa y 6,6-nistosa. La mutante Y237A presenta un perfil de oligosacáridos con un tamaño máximo de DP alrededor de 10 (sin embargo, oligosacáridos con DP de hasta 15 pudieron detectarse al ensayarse la síntesis de estos productos a una mayor escala). El espectro de FOS sintetizados incluye blastosa, levanobiosa, inulobiosa, 1-kestosa, 6-kestosa, neo-kestosa, intermediarios primarios (1K-FOS y 6K-FOS) con DP hasta 10, blastoFOS con DP hasta 6 y oligolevanas con DP hasta 4. Finalmente, la mutación K363A generó un efecto similar a Y237A, lográndose detectar dentro de su perfil oligosacáridos con la misma extensión. Entre estos productos los de mayor abundancia alcanzan DP de 4, mientras que se detecta la generación de otras series a nivel de trazas con DP de hasta 15. Entre los productos es evidente la presencia de blastosa, levanobiosa, inulobiosa, 1-kestosa, 6-kestosa, neo-kestosa, blastotriosa, levanotriosa, 1,6-nistosa y 6,6-nistosa, mientras que cantidades muy pequeñas de intermediarios primarios con DP entre 5 y 15 también pudieron identificarse.

En términos generales, la evaluación del perfil de productos de las seis mutantes generadas nos permite descartar a los residuos K389 y el clúster exterior de tirosinas como sitios de interacción relevantes en la síntesis de levanas. En contraste, los residuos N242, Y237, K363 y en menor medida Y187 pueden ser reconocidos como sitios de interacción partícipes en la síntesis de polisacáridos. El efecto de la mutación N242A es similar a la homóloga reportada para SacB de *B. megaterium* (Strube et al., 2011). Este residuo, localizado en la orilla de la cavidad catalítica, ha sido reconocido como un elemento estructural requerido para la actividad polimerasa en conjunto con la Arg360 (Meng & Fütterer, 2008). Así mismo,

Homman y col. (2005) sugirieron que la Asn252 en *B. megaterium* contribuye al sitio de unión del aceptor identificándolo como parte del subsitio +2 y comprobaron que la mutación por aspartato preserva la actividad polimerasa, mientras que la remoción de la cadena lateral (N252A, N252G) suprime la síntesis de polisacáridos sin afectar la actividad hidrolítica. Por otro lado, el efecto de la mutación Y237A es similar al reportado para la LS de *B. megaterium*, con la salvedad que esta variante aún es capaz de sintetizar LevanA en algunas condiciones. Strube et al. (2011) sugieren la participación de este residuo en un mecanismo de “stacking” dentro de la dinámica de elongación, esto al observar que la mutación de tirosina por triptófano forma el mismo espectro de oligosacáridos que la WT. Por último, el perfil de productos de esta variante contrasta con lo reportado para la mutante K373A en *B. megaterium*, cuyo perfil de oligosacáridos alcanza DP de hasta 6.

Por tanto, los resultados sugieren que N242 es indispensable desde las primeras etapas de elongación, mientras que los tres residuos restantes pueden ser requeridos dentro de subsitios de unión de cadenas de mayor tamaño en la periferia de la cavidad catalítica. Más aún, la participación de los residuos Y237, K363 y Y187 parece estar relacionada exclusivamente con la síntesis de LevanB, dado que la mutación de estos residuos trunca o disminuye dicho proceso mientras que la generación de LevanA prevalece. En el marco de la síntesis bimodal característica de SacB, se sugiere entonces que la vía de elongación o línea de ensamblaje de LevanB no es compartida con la síntesis de LevanA.

6.2.1 Propiedades de las interacciones enzima-aceptor con los residuos N242, K363 y Y237

Una vez identificados los primeros sitios de interacción implicados en la síntesis de LevanB, se procedió a evaluar cinéticamente las variantes que comprometen dichos sitios en reacciones empleando moléculas aceptoras con grado de polimerización promedio de 16 (LevanBB). Para ello nuevamente se seleccionaron condiciones de reacción que conducen a la síntesis preferencial de LevanB (0.5 μ M de enzima, 100 g/L sacarosa, pH 6, 25°C), condiciones en las cuales puede observarse que las variantes son incapaces de sintetizar LevanB (Fig. 6.7-A). El objetivo de evaluar la adición de un intermediario de la síntesis de LevanB consistió en estudiar la posibilidad de regenerar dicha síntesis a partir de un aceptor que debido a las mutaciones es imposible de obtener durante la reacción. Sin embargo, tal y como muestra la Fig. 6.7-B, la adición del aceptor no regeneró la síntesis de LevanB. Por el contrario, la mutante K363A fue capaz de regenerar la síntesis de LevanA, algo difícil de explicar puesto que se había observado anteriormente que el incremento de la concentración de enzima inhibe invariablemente la síntesis de este polímero aún para esta variante.

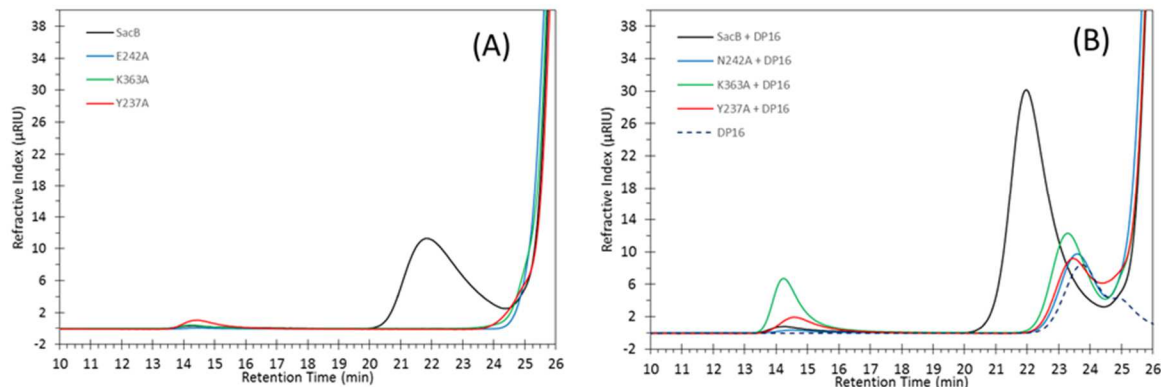


Fig. 6.7 Perfiles de levanas generados a niveles de conversión arriba del 95% por las mutantes superficiales de SacB, con (B) y sin (A) adición de moléculas aceptoras de (DP) 16. En línea discontinua se muestra el perfil inicial de los aceptores DP16. Condiciones de reacción: 0.5 μM de enzima, 100 g/L sacarosa, 5 mM aceptor, 25°C, pH 6.

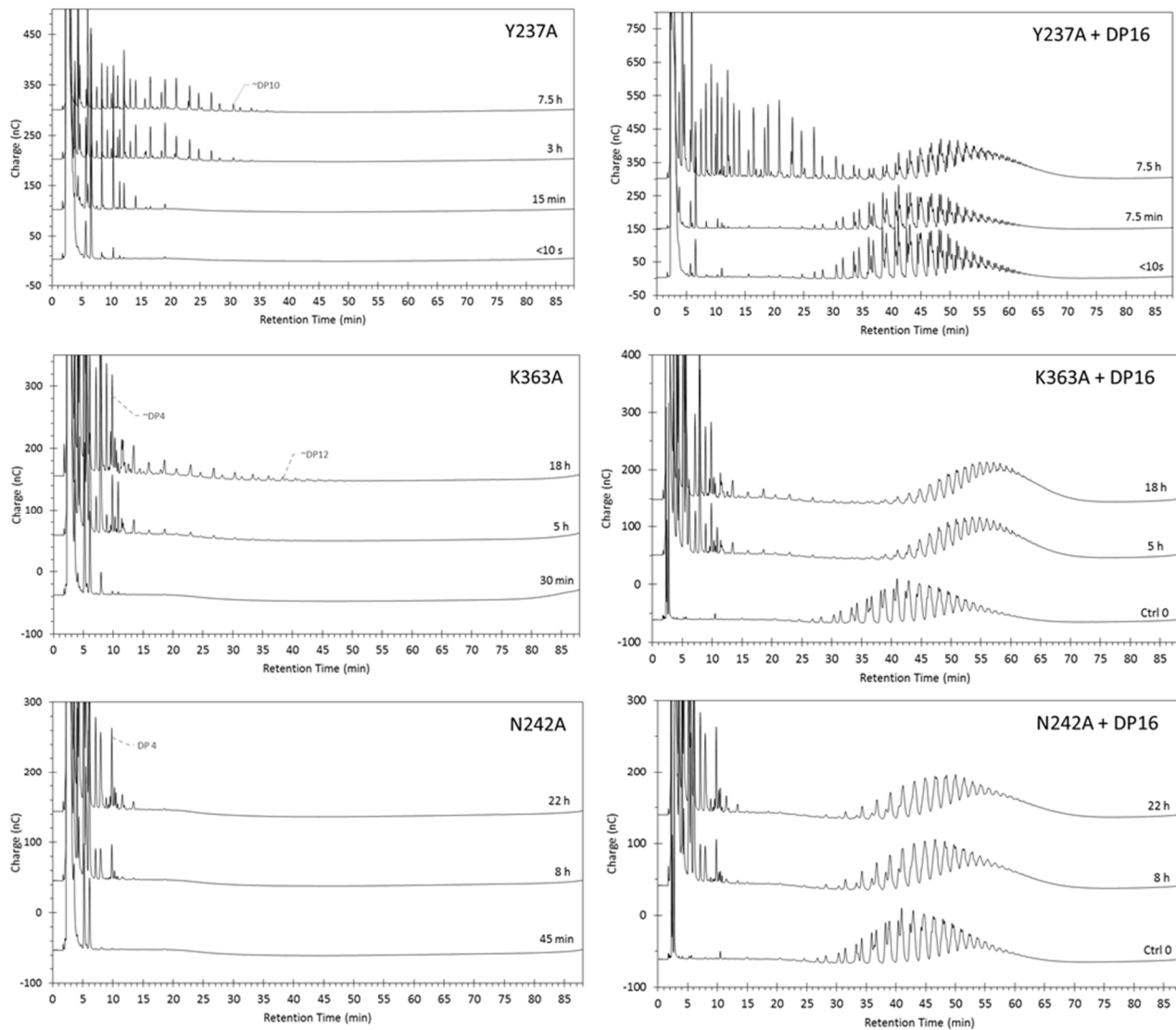


Fig. 6.8 Perfiles de oligosacáridos generados por las mutantes superficiales de SacB, con y sin adición de moléculas aceptoras de (DP) 16 (LevanBB). Condiciones de reacción: 0.5 μM de enzima, 100 g/L de sacarosa, 5 mM aceptor, 25°C, pH 6. En los tiempos finales para cada reacción se alcanzan conversiones arriba del 95%.

La modificación del aceptor que fue añadido puede observarse de mejor manera mediante el análisis en HPAEC-PAD del perfil de oligosacáridos. Estos análisis (Fig. 6.8) demuestran que las variantes son capaces de elongar en cierta medida a LevanBB, pero en ningún caso este es alargado hasta el tamaño habitual de LevanB. Por otro lado, no se observó modificación alguna en el perfil de los FOS que las variantes sintetizan *per sé*.

Adicionalmente, se determinaron las velocidades iniciales globales, de hidrólisis y transferencia con y sin la adición de aceptores con el fin de evaluar los efectos cinéticos generados por las mutaciones (Tabla 6). Entre los resultados, se encontró primeramente que las mutaciones generan un descenso de la actividad global derivado principalmente de una afectación de la capacidad de transferencia de la enzima. En este sentido Y237A, K363A y N242A retienen el 65%, 32% y 16%, respectivamente, de la actividad global medida por liberación de glucosa, esto debido a que conservan velocidades de transferencia menores al 20% de la generada por la enzima nativa, siendo N242A la variante más afectada. Adicionalmente, se observó que la disminución de la actividad global de K363A y N242A se debe también a una disminución de la actividad hidrolítica dado que caen hasta 42% y 22% de la actividad original, en cambio la variante Y237A no genera cambios en este parámetro.

Tabla 6. Velocidades iniciales de las reacciones (global, transferencia e hidrólisis) de SacB y sus variantes con y sin adición de las moléculas aceptoras DP16¹.

	+ DP16					
	V _{iG}	V _{iT}	V _{iH}	V _{iG}	V _{iT}	V _{iH}
WT	78.91 ± 1.7	30.45 ± 0.5	48.45 ± 1.7	208.40 ± 15.3	178.12 ± 12.8	30.27 ± 2.4
Y237A	51.20 ± 2.4	5.14 ± 0.8	46.05 ± 1.5	57.88 ± 0.2	13.47 ± 0.2	44.40 ± 0.4
K363A	25.22 ± 0.22	5.16 ± 0.6	20.27 ± 0.4	39.20 ± 2.9	16.24 ± 0.9	22.96 ± 2.0
N242A	12.63 ± 0.0	2.01 ± 0.2	10.62 ± 0.1	14.59 ± 0.0	3.25 ± 0.2	11.34 ± 0.2

¹Condiciones de reacción: 0.5 μM de enzima, 100 g/L de sacarosa, 5 mM DP16, 25°C, pH 6.

V_{iG} = Reacción global, medida por la liberación de glucosa, U/mg.

V_{iT} = Reacción de transferencia, medida por la diferencia entre glucosa y fructosa libres, U/mg.

V_{iH} = Reacción de hidrólisis, medida por la liberación de fructosa, U/mg.

Por otro lado, se encontró que la adición de los aceptores DP16 en la reacción de síntesis de LevanB acelera la reacción global casi al triple, con un ligero incremento de la reacción de hidrólisis y un incremento de la reacción de transferencia de casi 6 veces, lo cual se relaciona con el empleo preferencial de estos sustratos como aceptores (Tabla 6). Sin embargo, este efecto activador no fue tan marcado en los ensayos con las mutantes. Si bien existe un incremento en la velocidad de transferencia del doble y el triple al añadir el aceptor en las reacciones con las mutantes Y237A y K363A, respectivamente, dichas velocidades permanecen una orden de magnitud por debajo del obtenido con la WT. En el caso de la

mutante N242A, el efecto fue casi nulo, determinándose velocidades de reacción similares en los ensayos con y sin adición de aceptores.

La información reunida en esta sección sugiere que los residuos N242, Y237 y K363 pueden ser partícipes en interacciones superficiales vitales para el mecanismo de elongación de LevanB, de forma que la eliminación de dichas interacciones imposibilita la generación de este producto aún a partir de iniciadores de tamaño intermedio como lo son los aceptores $\overline{\text{DP16}}$. En este sentido, la anulación de una sola interacción y de acuerdo con su posición en la línea de ensamblaje, podría estar impidiendo la adecuada interacción enzima-aceptor

6.3 Estructura cristalográfica del complejo SacB-oligosacáridos

La generación de variantes de SacB con especificidad de productos modificada hacia la síntesis de oligosacáridos (mutantes H243L, N242A y Y237A), en conjunto con el establecimiento de una metodología cromatográfica preparativa para la separación de dichos productos (SEC/rpHPLC), permitió la obtención de diversos FOS del tipo levana con alto grado de pureza, particularmente aquellos obtenidos en baja proporción en el sistema bi-enzimático descrito en el capítulo 3. Entre dichos productos destacan neo-FOS, 1K-FOS y 6K-FOS algunos con DP de hasta 8, algunos de ellos fueron inclusive empleados en varias de las reacciones de aceptor descritas en capítulos anteriores. De particular utilidad fue la purificación del compuesto 1&6,6,6,6,6-kestooctaosa (octasacárido de la serie de levanas 1K-FOS), el cual fue exitosamente co-cristalizado con la enzima SacB. Para la obtención de dicho complejo se empleó la variante inactiva de SacB D86A/E342A, con el fin de evitar la actividad hidrolítica de SacB sobre el ligando, tal como se observó con los FOS empleados en la sección 4.2.

La estructura del complejo SacB-oligosacárido se resolvió a través de reemplazo molecular empleando las coordenadas de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* (PDB: 1OYG) como modelo inicial (Meng and Futterer, 2003). La estructura cristalográfica final presenta una resolución de 2.05 Å. La unidad asimétrica del cristal refractado contiene dos moléculas de SacB, cadenas A y B (Fig. 6.9-A). En ambas moléculas, además de la densidad electrónica de la proteína, se observó densidad electrónica dentro de la cavidad catalítica correspondiente a una cadena de seis fructosas enlazadas por enlaces β 2-6 (sitio de unión de oligosacárido 1, OB 1). Adicionalmente, se observó densidad electrónica indicativa de otro oligosacárido en un sitio circundante a la cavidad catalítica central (sitio OB 2). Las densidades electrónicas adicionales permitieron modelar un hexasacárido y un disacárido en las cadenas A y B respectivamente, ambos compuestos por únicamente fructosa con enlaces β 2-6. El modelo incluye también dos moléculas de calcio, una en cada molécula de proteína, y un total de 9

moléculas de bromo provenientes del medio de cristalización repartidas en distintos puntos. La estructura cristalográfica de SacB en complejo con los oligosacáridos se muestra en la Fig. 6.9-B. Las coordenadas atómicas y los factores de estructura del complejo cristalográfico se depositaron en el Protein Data Bank con el código de acceso 6N3M.

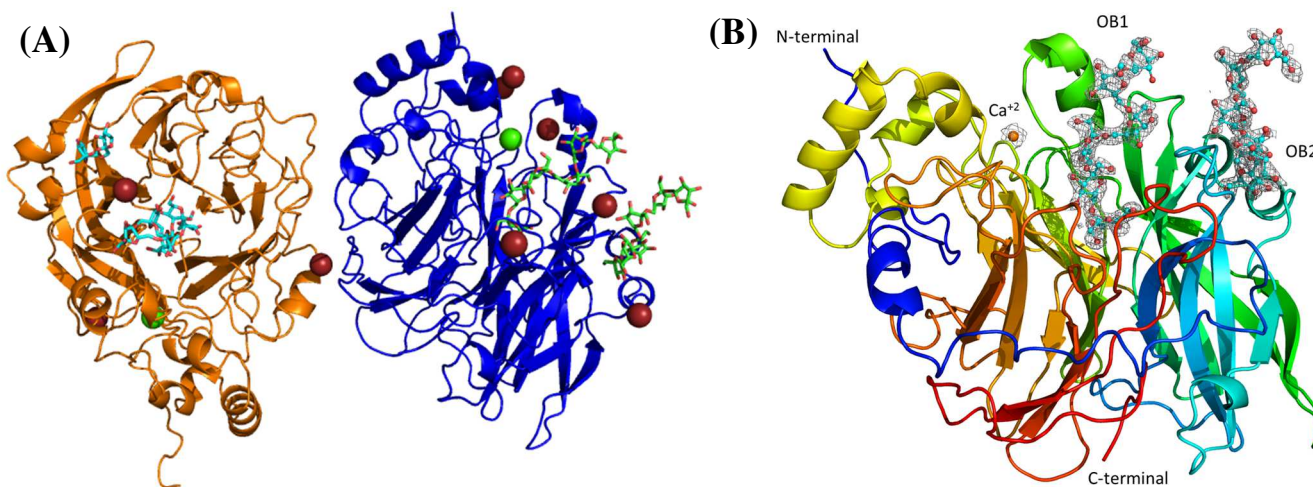


Fig. 6.9 Estructura cristalográfica del complejo SacB-oligosacáridos (PDB: 6N3M). (A) Cadenas A (azul) y B (naranja) presentes en la unidad asimétrica del cristal. Las esferas verdes y rojas corresponden a moléculas de calcio y bromo, respectivamente. (B) Modelo de la cadena A en el que se muestran las densidades electrónicas de los sacáridos presentes en dos sitios de unión de oligosacáridos OB1 y OB2.

6.3.1 Identificación de residuos involucrados en el sitio OB1

Dentro del sitio activo seis unidades de fructosa con enlaces β 2-6 fueron modeladas con densidad electrónica bien definida. El oligosacárido está orientado con su extremo no reductor al interior de la cavidad y el extremo reductor protuberando de la cavidad. No hubo suficientes datos experimentales para incluir en el modelo del octasacárido la unidad de fructosa y de glucosa restantes, lo cual puede deberse a una alta movilidad de estos residuos al estar mayormente expuestos al solvente. El hexasacárido modelado (levanohexaosa) está unido a la enzima por cerca de 20 puentes de hidrógeno, 11 de ellos directos y 9 mediados por moléculas de agua (Fig. 6.10). Adicionalmente la unión del ligando está estabilizada por interacciones no polares tal y como se esquematizan en las Fig. 6.10 y Fig. 6.11.

A la fecha existen reportadas dos estructuras cristalográficas de SacB en complejo con ligandos, que corresponden a la sacarosa y la rafinosa, ambos sustratos con carácter preferencialmente donador (Meng & Fütterer, 2003, 2008). Dichos complejos permitieron la identificación de los subsitios de unión de sustrato -1, +1 y +2, de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Davies, Wilson, & Henrissat (1997). En la estructura SacB, el oligosacárido empleado como ligando, a pesar de no ser un sustrato donador, está colocado con el extremo

no reductor en forma idéntica al grupo fructosilo de la sacarosa y la rafinosa en sus respectivos cristales permitiendo definir los subsitios -1, +1, +2, +3, +4, +5; empezando por la fructosa dentro del sitio activo (-1) y terminando por la fructosa que se extiende hacia el solvente (+5) (Fig. 6.10 y Fig. 6.11).

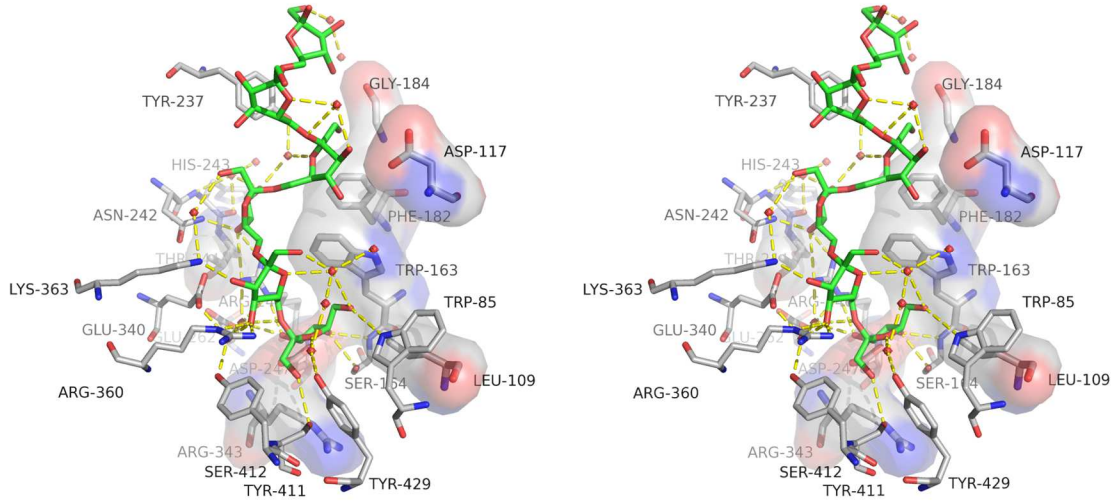


Fig. 6.10 Vista estéreo de las interacciones entre SacB y levanohexaosa (en verde). Los puentes de hidrógeno se presentan como líneas discontinuas amarillas y las moléculas de agua como esferas rojas. Los residuos que interactúan a través de enlaces no polares se muestran envueltos en un halo (PDB: 6N3M).

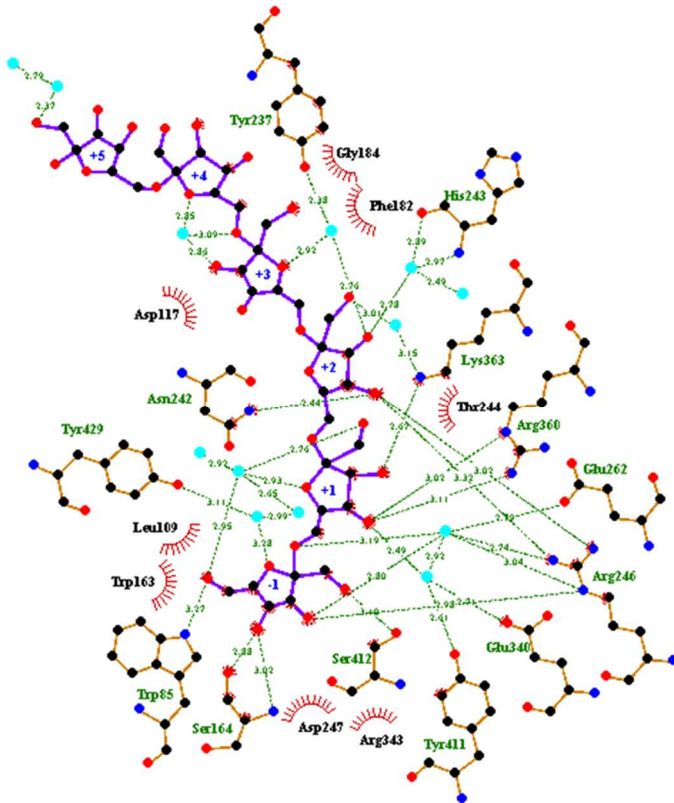


Fig. 6.11 Esquema de las interacciones enzima-ligando presentes en el sitio OB1 del complejo SacB-oligosacárido. Los puentes de hidrógeno están representados por líneas discontinuas sobre las que se señala su longitud en Å y las interacciones no polares están representadas por arcos rojos. Las unidades de fructosa del oligosacárido están etiquetadas señalando el subsitio de unión de sustrato que representan y corresponden desde el -1 (extremo no reductor) al +5 (extremo reductor). Representación obtenida en LigPlot+ (Laskowski & Swindells, 2011).

El complejo SacB-levanohexanosa muestra un subsitio -1 conservado con respecto al reportado en los complejos con sacarosa y rafinosa, en el que los residuos de fructosa de los tres compuestos empalman perfectamente (Fig. 6.12). Este subsitio está compuesto por los residuos W85, S164, E262, R246, Y429, L109, W163, R343 y por supuesto los catalíticos D247, D86 y E342 (los dos últimos mutados por alanina en este trabajo). Muchos de estos residuos poseen un alto grado de conservación dentro de las levansacarosas e inulosacarosas y han sido objeto de estudios de mutagénesis, resultando generalmente en una pérdida de la actividad de la enzima (Homann et al., 2007; S. Li et al., 2011; Mardo, Visnapuu, Vija, Elmi, & Alamäe, 2013; Ortiz-Soto et al., 2008; Ozimek, Kralj, Kaper, van der Maarel, & Dijkhuizen, 2006; Rodríguez-Alegría et al., 2010).

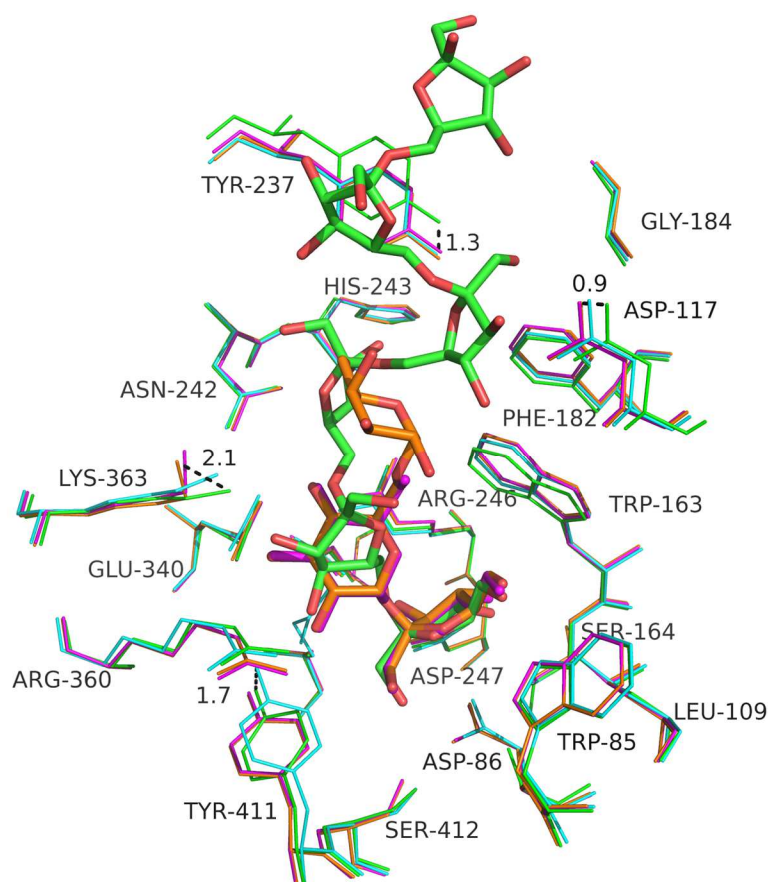


Fig. 6.12 Superposición de los residuos y ligandos localizados en los subsitios -1, +1, +2, +3 y +4 del sitio activo en los complejos SacB-sacarosa (magenta, PDB: 1PT2), SacB-rafinosa (naranja, PDB: 3BYN), SacB-levanohexaosa (verde, PDB: 6N3M) y SacB forma Apo (cian, PDB: 1OYG). Líneas punteadas negras señalan la distancia entre las distintas conformaciones que adopta un residuo en complejo con diferente ligando.

En el subsitio +1, el anillo de la fructosa del hexasacárido está rotado aproximadamente 30° con respecto al anillo de glucosa de la sacarosa y rafinosa. A pesar de ello preserva muchas de las interacciones que ocurren en esos sustratos, entre las que se encuentran las

generadas por los residuos R360 y K363, así como los residuos Y411 y E340 que lo hacen a través de moléculas de aguas. Estos residuos igualmente ya han sido mutagenizados en distintas LSs y en particular R360 o la histidina homóloga en algunas LS de bacterias Gram-negativas han demostrado ser residuos clave en la modulación del tipo de actividad (hidrolítica/polimérica) de este tipo de enzimas (R Chambert & Petit-Glatron, 1991; S. Y. Li et al., 2008). Es de hacer notar que la unión del oligosacárido genera un desplazamiento en las cadenas laterales de Y411 y K363 (Fig. 6.12). En el primero caso, el grupo hidroxilo de Y411 se movió 1.7 Å con respecto a la forma *Apo*, alejándose del ligando. Este movimiento se observa igualmente en los complejos con sacarosa y rafinosa, por lo que debe tratarse de un ajuste estructural común para la unión de cualquier sustrato. En el caso de K363, se observó un desplazamiento de 2.1 Å con respecto a la posición observada en los cristales con sacarosa y rafinosa. Este movimiento en cambio puede ser exclusivo para el acomodo de moléculas aceptoras que ubican una unidad de fructosa en el subsitio +1.

En el subsitio +2 se marcan grandes diferencias en la conformación de los ligandos (donador/aceptor), con posiciones claramente diferenciadas (Fig. 6.12). En el complejo de la rafinosa, la unidad de galactosa esta interaccionando con los residuos N242A, Y237 y A116 pero lo hace a través de moléculas de agua. En el caso de la levanohexaosa el anillo de la fructosa interactúa directamente con los residuos N242 y R246, y al mismo tiempo muestra uniones a través de moléculas de agua con los residuos con K363 y el “backbone” de H243 (Fig. 6.12).

La estructura del complejo SacB-levanohexaosa permite por primera vez analizar la existencia de subsitios de unión superiores que pudieran participar en la unión con sustrato de cadena larga a la salida de la cavidad catalítica. Sin embargo, dado que el ligando está más expuesto al solvente son pocas las interacciones que se identifican (Fig. 6.12). De este modo, puede establecerse que en el subsitio +3 participan los residuos F182 y el D117 a través de interacciones no polares, así como Y237 que interactúa través de una molécula de agua. En el siguiente subsitio, +4, el residuo Y237 parece apilarse con la quinta unidad de fructosa del ligando. En estos últimos subsitios, dos movimientos adquieren notoriedad y son los registrados por los residuos D117 y Y237, los cuales retroceden 0.8 y 1.3 Å en comparación con la forma *Apo* debido a la unión del ligando. Por último, destaca la ausencia de interacciones entre la enzima y la sexta unidad de fructosa del ligando.

Además de ayudar a clarificar las diferencias en la forma de interactuar de una molécula aceptoras y una donadora en la reacción de transferencia de las FTF, el análisis de la estructura cristalográfica en complejo con el hexasacárido tipo levana también puede arrojar información importante con respecto a la formación del tipo de enlace. Tal como se muestra

en la Fig. 6.13, el alineamiento de este ligando con otros ligandos del tipo inulina obtenidos en el estudio de fructosiltransferasas que sintetizan FOS con enlace β 2-1, marca una clara divergencia en el acomodo de los productos, particularmente en los subsitios +2 y +3. Una comparación detallada de los residuos partícipes en la unión de uno y otro tipo de fructanas, podría evidenciar los elementos estructurales relacionados con la diferente especificidad entre levansacarosas e inulosacarosas.

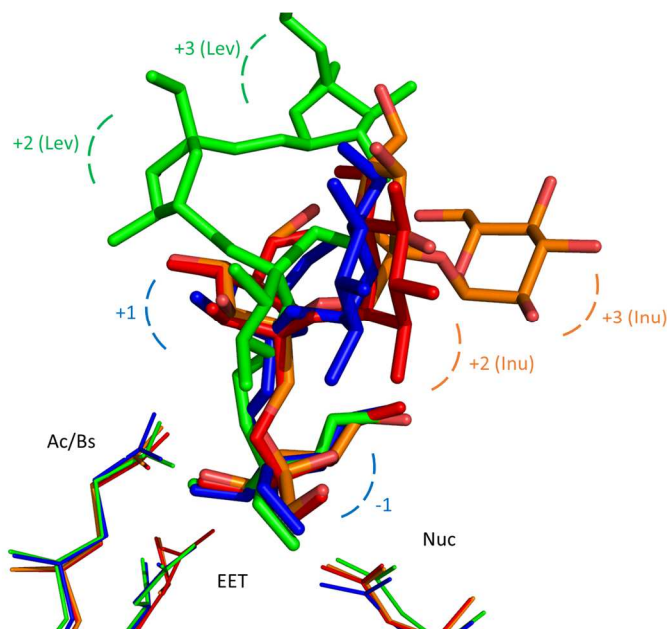


Fig. 6.13 Alineamiento de ligandos encontrados en el sitio activo de distintas fructosiltransferasas. Levanohexaosa en SacB (verde, PDB: 6N3M), 1-kestosa en complejo con la IS de *L. jonsonni* (azul, PDB: 2YFT); 1-kestosa (rojo) y nistosa (naranja) en complejo con la FTF de *A. japonicus* (PDB: 3LDR y 3LEM). La superposición se realizó alineando alguno de los residuos catalíticos (Nuc: nucleófilo, Ac/Bs: catalizador ácido/base, EET: estabilizador del estado de transición).

6.3.2 Identificación de residuos involucrados en el sitio OB2

La cadena A del complejo cristalográfico SacB-oligosacárido contiene una segunda molécula de levanohexaosa indicando un segundo sitio de unión de oligosacáridos (OB2), situado en la superficie de la enzima a 15 Å del sitio activo. La interacción en el sitio OB2 está mediada por seis residuos en contacto directo con las tres unidades de fructosa ubicadas en el extremo no reductor del oligosacárido (Fru1, Fru2 y Fru3, Fig. 6.14-A). El grupo carboxamida de N115 interacciona con el grupo OH-5 de Fru1, mientras que K148 y F149 están en contacto con el grupo OH-4 de Fru3. El mayor número de interacciones enzima-oligosacárido está centrado en Fru2, a través de puentes de hidrógeno con los residuos E162, D145, K148 y Q159. Adicionalmente, la unión enzima-oligosacárido se encuentra soportada por D118, S120 y R141 que interaccionan con Fru2 a través de moléculas de agua, de la misma forma que K157 y K185 lo hacen con Fru3 y Fru5, respectivamente (Fig. 6.14-B).

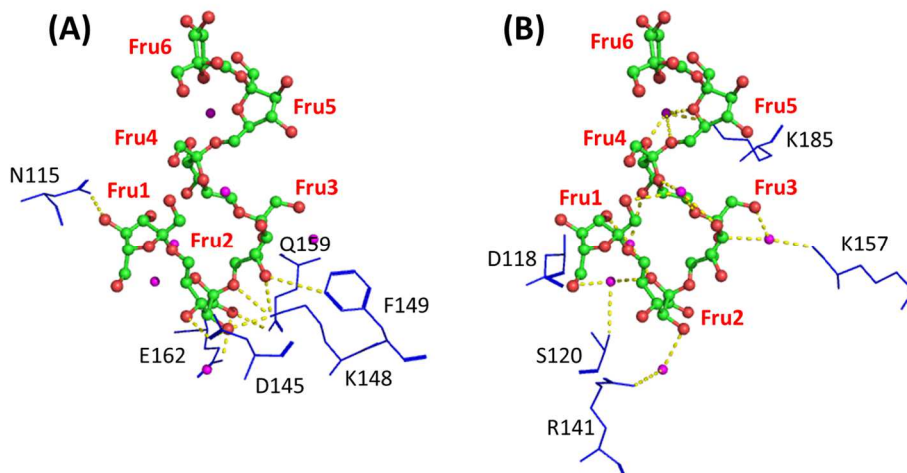


Fig. 6.14 Residuos involucrados en el sitio OB2. Los residuos identificados interactúan con el sacárido levanohexaosa directamente (A) o a través de moléculas de agua (B). Las interacciones se señalan como líneas punteadas amarillas y las moléculas de agua como esferas magenta (PDB: 6N3M).

El presente trabajo destaca al ser el primer reporte en el que se identifica un sitio de unión adicional a la cavidad catalítica en alguna fructosiltransferasa. Actualmente, estudios de mutagénesis destinados a determinar el papel funcional de este segundo sitio de unión están en progreso.

6.4 Implicación de los subsitios de unión de la cavidad catalítica (sitio OB1) en el mecanismo de elongación de levanas

La estructura de SacB en complejo con un aceptor genuino da luz a las interacciones que intervienen durante la elongación de levanas y permite clarificar particularmente los efectos observados en los estudios de mutagénesis sitio dirigida realizados en este trabajo en los subsitios superiores del sitio OB1, integrado por los residuos: N242, R246 y K363 (+2); F182 y D117 (+3) y Y237 (+4) (Fig. 6.15).

En este sentido, se han observados efectos diferentes en la mutación de los residuos que integran el subsitio +2. Por un lado, de acuerdo a Homann et al. (2007), la mutación del residuo R256 en la LS de *B. megaterium* (homólogo a R246 en SacB) genera una variante casi inactiva. Este efecto puede deberse a que este residuo se encuentra enterrado en el sitio activo e interactúa también en el subsitio -1, la anulación de la cadena lateral afecta también a la unión de donadores en este subsitio. Por otro lado, la eliminación de los residuos N242 y K363 (sección 6.2) generó variantes que son incapaces de sintetizar LevanB pero efectivas en la síntesis de productos con DP de hasta 4. Dado que también se anula la síntesis de LevanA con la mutación de N242 por alanina, podría establecerse que la interacción mediada por este residuo en moléculas aceptoras con DP de 2 o mayores, es crucial para cualquier

mecanismo de elongación desarrollado por SacB. En el caso del residuo K363, su interacción mediada por agua en el subsitio +2 parece no ser esencial para la síntesis de LevanA puesto que no la anula completamente, e inclusive se observó el incremento de producción de LevanA al hacer reaccionar la mutante K363A con un aceptor de cadena larga (sección 6.2.1)

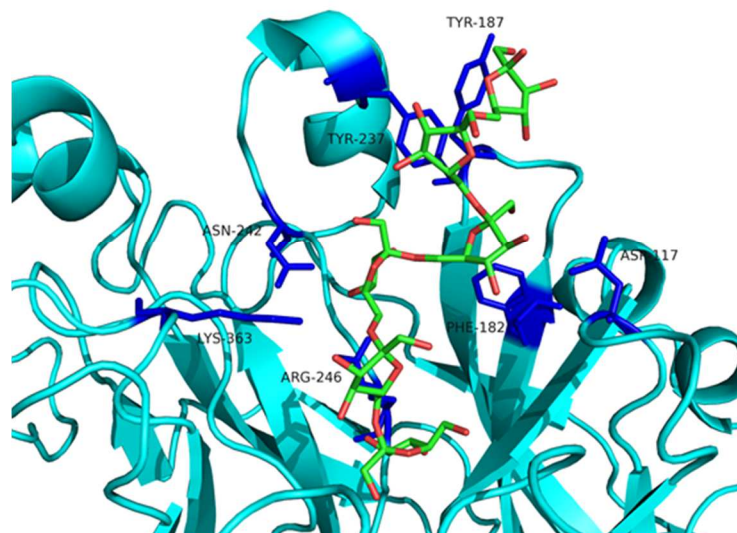


Fig. 6.15 Ubicación superficial de los residuos involucrados en los subsitios de unión de sustrato +2, +3 y +4. En verde se presenta la levanohexaosa (PDB: 6N3M).

Hasta este momento no se han mutado los residuos del subsitio +3 pero si hay reportes de la eliminación de residuos homólogos a Y237 (subsitio +4) en las LSs de *B. megaterium* y *B. licheniformis* RN-01 (Sangmanee, Nakapong, Pichyangkura, & Kuttiyawong, 2016; Strube et al., 2011). En ambos casos se reportó la pérdida de la producción de polímero, preservando la síntesis de oligosacáridos con DP de alrededor de 10. De forma similar, la mutante de SacB Y237A evaluada en secciones anteriores, es incapaz de sintetizar LevanB pero acumula productos con DP un poco mayor a 10. Con respecto a LevanA, este residuo tampoco es esencial para su síntesis. Adicionalmente, en este trabajo se estudió el residuo Y187, un residuo ubicado a un costado de Y237, más allá de la sexta unidad de fructosa en el complejo SacB-levanohexaosa. La anulación de este residuo tampoco afectó la síntesis de LevanA, pero limitó ligeramente la extensión de LevanB. De forma paralela al alargamiento de LevanB, todas estas mutantes presentaron menor actividad específica, misma que fue disminuyendo conforme más cercana al sitio activo fue la ubicación del residuo.

Los resultados de las mutagénesis apuntan a que los subsitios de unión superficiales +2, +3 y +4 señalados en el complejo SacB-oligosacárido corresponden a la línea de ensamblaje seguida para la síntesis de LevanB, presumiblemente de forma independiente a la síntesis de LevanA. De esta forma la interacción de los aceptores durante el mecanismo no procesivo

estaría soportado por al menos 4 subsitios de unión. La anulación de cualquiera de ellos se ha demostrado que limita la extensión de las cadenas sintetizadas no procesivamente y evita incluso la regeneración de la síntesis de LevanB aún a partir de aceptores pre-elongados (sección 6.2.1). Estos subsitios de unión también estarían relacionados al efecto de activación en la síntesis de LevanB observados en las reacciones con aceptores de DP creciente (sección 4.2.1).

La síntesis de levanas de alto peso molecular es una característica propia de todas las levansacarosas bacterianas, aun cuando algunas de ellas, particularmente las de bacterias Gram negativas, acumulan FOS en mayor proporción. En contraste, la síntesis de una distribución de levanas de bajo peso molecular ha sido reportada principalmente en LSs de bacterias del genero *Bacillus*, como los son SacB de *B. subtilis* (cepas Natto y C4) y la LS de *B. licheniformis* (Euzenat et al., 1997; Iizuka et al., 2002; Nakapong et al., 2013; Tanaka et al., 1980). En este grupo también puede incluirse a la LS de *B. megaterium* si consideramos que Strube y col. (2011) reportaron oligosacáridos con DP al menos de hasta 20 entre sus productos, empleando una metodología que podría haber obviado productos de mayor tamaño. La asociación de la síntesis de LevanB con LSs del género *Bacillus* cobra más sentido si observamos el grado de conservación que tienen los residuos de los subsitios de unión +2, +3 y +4 (residuos son esenciales para la síntesis de LevanB) entre LSs de distintos orígenes. Como puede observarse en la Fig. 6.16, con excepción de R246 que está súper-conservado en todas las levansacarosas, todos los demás residuos aparecen conservados principalmente entre las LSs del género *Bacillus*.

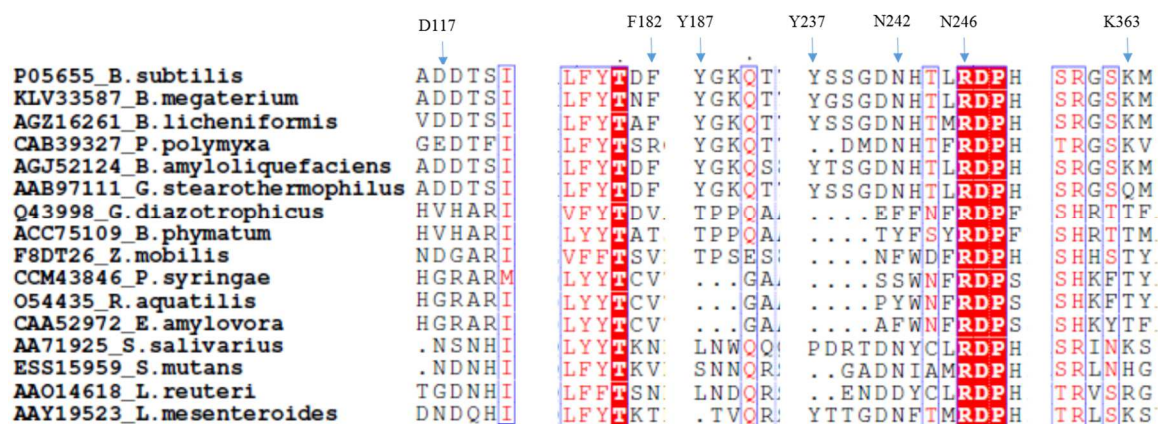


Fig. 6.16 Secciones del multilineamiento de secuencias de levansacarosas (Anexo D). Se indican con flechas, los residuos involucrados en los subsitios +2, +3 y +4 en el complejo SacB-oligosacárido.

Finalmente, la comparación de las superficies de las estructuras cristalográficas de LSs disponibles hasta el momento (dos de ellas de bacterias del género *Bacillus* y dos de bacterias Gram negativas) resulta útil para encontrar los elementos estructurales responsables de las

distintas especificidades de productos (Fig. 6.15). En dicha comparación, puede observarse con claridad que las LSs de *B. subtilis* y *B. megaterium* comparten una topología capaz de unir el oligosacárido de tipo levana en el sitio OB1 a través de los mismos subsitios de unión (en color azul). En contraste, las LSs de *G. diazotrophicus* y *E. amylovora* poseen topologías distintas, especialmente en el subsitio +4 y posterior. Por un lado, la LS de *G. diazotrophicus* posee una protuberancia, mientras que la LS de *E. amylovora* posee un valle. Un análisis similar fue realizado por Wuerges et al. (2015), quienes se enfocaron en la comparación de los loops que rodean la cavidad catalítica de estas mismas enzimas. Estas observaciones permiten sugerir que la topología de la zona situada entre las hojas beta IIB–IIC de la beta-propela es la responsable de permitir la elongación de aceptores hacia LevanB en las LSs de *B. subtilis* y *B. megaterium*, de obstruirla en el caso de la LS de *G. diazotrophicus* y de no soportarla en el caso de la LS de *E. amylovora*.

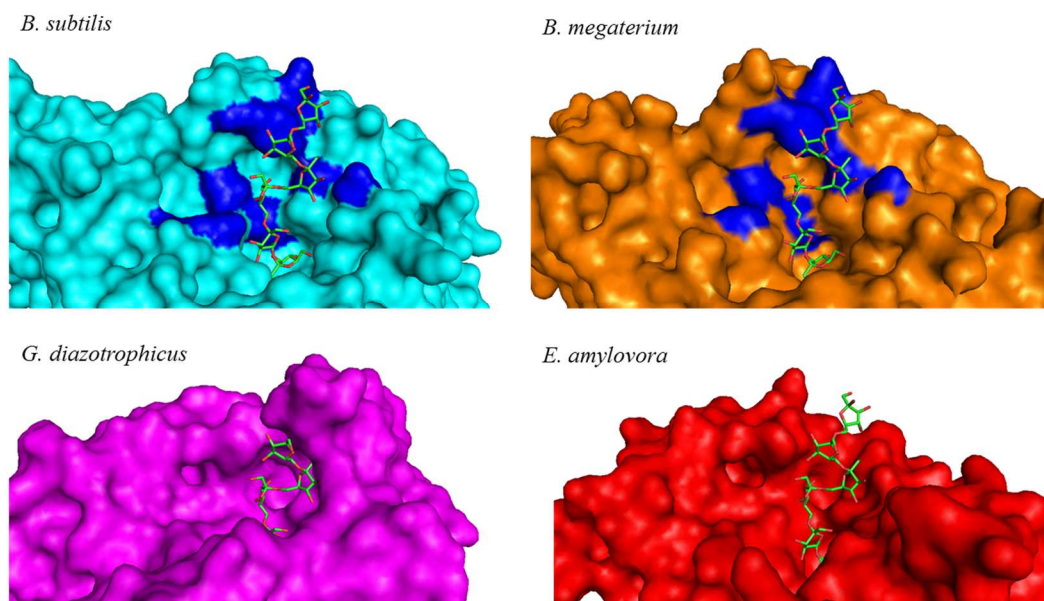


Fig. 6.17 Comparación de la superficie de distintas levansacarasa. Se muestra a la levanohexaosa (en verde) observada en complejo con la levansacarasa de *B. subtilis* (PDB: 6N3M) y superpuesta en la cavidad catalítica de las LSs de *B. megaterium* (PDB: 3OM2), *G. diazotrophicus* (PDB: 1W18) y *E. amylovora* (PDB: 4D47). En azul se señalan los subsitios de unión +2, +3 y +4 homólogos en las LSs del género *Bacillus*.

6.5 CONCLUSIONES

La elucidación estructural del complejo SacB-oligosacárido permitió la identificación de subsitios de unión de sustratos en la cavidad catalítica superiores al subsitio +2, los cuales se plantean son específicos para aceptores del tipo levana. La unión del ligando reveló la existencia de por lo menos 4 subsitios de unión de aceptores entre los que destacan el subsitio +2 (N242, R246 y K363), subsitio +3 (F182 y D117) y subsitio +4 (Y237).

El residuo N242, resulta vital para la actividad polimérica de SacB. La anulación de la interacción que conlleva, limita el tamaño de los oligosacáridos presentes en el medio de reacción hasta DP 3, lo cual elimina completamente la síntesis de cualquier tipo de levana y favorece la acumulación de una mayor cantidad de productos de hidrólisis. Dentro del mismo subsitio +2, el residuo K363A es indispensable para la síntesis de LevanB y en su ausencia se logra la síntesis efectiva de FOS con DP hasta de 4 y en menor medida FOS que alcanzan DP de hasta de 10.

El residuo Y237 participa en el subsitio +4 a través de una interacción de “stacking” y es indispensable para la elongación de cadenas de levan con DP mayor a 10. La mutación de este residuo por alanina limita entonces el tamaño de los intermediarios de la reacción y trunca la síntesis de LevanB. Un efecto menor fue observado al mutar el residuo Y187 por alanina, que se localiza totalmente fuera de la cavidad catalítica y disminuye ligeramente la actividad específica y la extensión de LevanB.

Los subsitios de unión aquí descritos están íntimamente ligados a la síntesis no procesiva de LevanB, a tal grado que la anulación de cualquiera de ellos evita la completa elongación de los productos aún a partir de aceptores pre-elongados.

OBSERVACIONES FINALES

La información obtenida en este trabajo ha fortalecido la hipótesis sobre la existencia de dos procesos distintos involucrados en la síntesis de LevanB y LevanA por SacB. Estos procesos conllevan mecanismos de elongación distintos, moléculas aceptoras distintas y sitios de interacción enzima-aceptor distintos.

A) Síntesis de LevanB: Mecanismo no Procesivo

Los estudios de aceptores permitieron confirmar el carácter no procesivo de esta síntesis. Del mismo modo, permitieron establecer la red de reacciones de transferencia involucradas en este proceso a través de la identificación de los iniciadores e intermediarios que se forman en distintas etapas de la reacción. Los intermediarios primarios, generados en tiempos tempranos de reacción tienen a la 1-kestosa y 6-kestosa como iniciadores. Conforme avanza la reacción ocurre la formación de series de oligolevanas y blastoFOS (intermediarios secundarios) dada la acumulación en el medio de reacción de los iniciadores levanobiosa y blastosa.

En términos estructurales, este mecanismo tiene como base la existencia de subsitios de unión de aceptor dentro de la cavidad catalítica central. Se identificaron cuatro subsitios de unión indispensables para la síntesis de LevanB y dentro de ellos cuatro residuos (N242, K363, Y237, Y187) fueron estudiados a través de mutagénesis sitiodirigida. La mutación por alanina de estos residuos permitió limitar la especificidad del producto hacia productos más pequeños. Los subsitios de unión pueden estar cumpliendo distintas funciones. Por un lado, estos subsitios parecen conformar una vía de ensamblaje requerida para la extensión de LevanB y por otro lado, las interacciones involucradas pueden ayudar a incrementar la afinidad de la enzima por los aceptores, lo que se traduce en un incremento de la velocidad de transferencia. Este incremento está relacionado con el tamaño de los aceptores y su capacidad de ocupar los subsitios. En este sentido, se encontró que los trisacáridos, capaces de los subsitios +1, +2 y +3, constituyen los primeros aceptores de alta eficiencia.

B) Síntesis de LevanA: Mecanismo Procesivo

La capacidad de reconstruir la síntesis de LevanB a partir de intermediarios de distintos tamaños no pudo ser replicada para la síntesis procesiva de LevanA aun cuando se emplearon

enzimas y condiciones de reacción que la favorecen. La dificultad de obtener LevanA a partir de estos aceptores puede explicarse si se considera un mecanismo estrictamente procesivo en el que el iniciador y los intermediarios en crecimiento deben permanecer continuamente unidos a la enzima. Cualquier disociación del intermediario conllevaría la anulación de la vía procesiva y la activación de la elongación no procesiva. En ese sentido cualquier factor que induzca esta disociación sería el detonante del cambio del mecanismo de elongación, tal y como se ha observado con el incremento de la concentración enzimática.

En términos estructurales, los estudios de mutagénesis permiten identificar la línea de ensamblaje observada en el complejo SacB-oligosacárido es exclusiva para la síntesis de LevanB y no es compartida, al menos en su totalidad, con la síntesis procesiva. Desafortunadamente, muchas de las características de este enigmático proceso, tales como la identidad del o los iniciadores y los elementos estructurales puntuales que la soportan quedan aún por revelarse.

PROSPECTIVAS

- Corroborar a través de mutagénesis la participación de los residuos observados en la interacción con el ligando dentro del subsitio +3 (sitio OB1) del complejo SacB-oligosacárido, y extender el estudio a los residuos del sitio exterior OB2.
- Confirmar el efecto deletéreo de las mutaciones realizadas en el sitio OB1 sobre la capacidad de unión de SacB con aceptores, esto a través de estudios calorimétricos o fluorimétricos.
- Optimizar la síntesis de oligosacáridos tipo levana de distintos tamaños empleando algunas de las mutantes estudiadas en este trabajo (N242A, Y237A y H243L), ya sea en su forma soluble o inmovilizada.
- Evaluar las propiedades biológicas (actividad prebiótica, inmuno-moduladora, antioxidante, anticancerígena, tenso-activa) de levanas de distinto DP sintetizadas a partir de las variantes de SacB desarrolladas en este trabajo.

ANEXOS

- A. Secuenciación de DNA**
- B. GC-MS de FOS tipo levana**
- C. Espectros de RMN**
- D. Multi-alineamiento de secuencias de LSs**

Anexo A. Secuenciación de ADN

SacB WT

wwggggattgtgagcggataacaattcccctctagaataatttgtttaactttaagaa
 X G I V S G - Q F P S R N N F V - L - E
 ggagatatacatatgaaagaacgaaccaaagccatataaggaacaacagcatttcc
 G D I H M K E T N Q K P Y K E T Y G I S
 catattacacgcatgatgatgctgcaaattcccgaacagcaaaaaaatgaaaaatcaaa
 H I T R H D M L Q I P E Q Q K N E K Y Q
 gttcctgaattcgattcgtccacaattaaaaatctctctgcaaaggcctggacggt
 V P E F D S S T I K N I S S A K G L D V
 tgggacagctggccattacaaaacgctgacggcactgtcgcaaactatcacggctaccac
 W D S W P L Q N A D G T V A N Y H G Y H
 atcgtctttgcattagccggagatcctaaaaatgccggatgacacatcgatttacatgttc
 I V F A L A G D P K N A D D T S I Y M F
 tatcaaaaagtcggcgaaacttctattgacagctggaaaaacgctggccgcgtctttaa
 Y Q K V G E T S I D S W K N A G R V F K
 gacagcgacaaattcgatgcaaatgattctatcctaaaagaccaaacacaagaatggtca
 D S D K F D A N D S I L K D Q T Q E W S
 ggttcagccacatttacatctgacggaaaaatccggtttattctacactgatttctccggt
 G S A T F T S D G K I R L F Y T D F S G
 aaacattacggcaaaacaaactgacaactgcacaagttaacgtatcagcatcagacagc
 K H Y G K Q T L T T A Q V N V S A S D S
 tctttgaacatcaacgggtgtagaggattataaatcaatccttgacggtgacggaaaaacg
 S L N I N G V E D Y K S I F D G D G K T
 tatcaaaatgtacagcagttcatcgatgaaggcaactacagctcagggcacaacatcag
 Y Q N V Q Q F I D E G N Y S S G D N H T
 ctgagagatcctcactacgtagaagataaaggccacaaatacttagtatttgaagcaaac
 L R D P H Y V E D K G H K Y L V F E A N
 actggaactgaagatggctaccaaggcgaagaatcctttatttaacaaagcactactatggc
 T G T E D G Y Q G E E S L F N K A Y Y G
 aaaagcacatcattcttccgtcaagaaagtcaaaaacttctgcaaagcgataaaaaacgc
 K S T S F F R Q E S Q K L L Q S D K K R
 acggctgagttagcaaacggcgtctcggatgattgagctaaacgatgattacacgctg
 T A E L A N G A L G M I E L N D D Y T L
 aaaaagtgtgaaaccgctgattgcatctaacacagtaacagatgaaattgaaacgcgcg
 K K V M K P L I A S N T V T D E I E R A
 aacgtctttaaataacggcaaatggtacctgttactgactcccgggatcaaaaatg
 N V F K M N G K W Y L F T D S R G S K M
 acgattgacggcattacgtctaacgatatttacatgcttggttatggttctaatctttaa
 T I D G I T S N D I Y M L G Y V S N S L
 actggcccatacaagccgctgaacaaaactggccttgtgttaaaaatggatcttgatcct
 T G P Y K P L N K T G L V L K M D L D P
 aacgatgtaacctttacttactcacacttccgtgtacctcaagcgaaggaacaatgctc
 N D V T F T Y S H F A V P Q A K G N N V
 gtgattacaagctatatgacaaacagaggattctacgcagacaaacaatcaacgtttgcg
 V I T S Y M T N R G F Y A D K Q S T F A
 ccaagcttctgctgaacatcaaaggcaagaaaacatctgtgtgcaaagacagcatcctt
 P S F L L N I K G K K T S V V K D S I L
 gaacaaggacaattaacagttaacaaaacggatccgaattcgagctccgctcgacaagctt
 E Q G Q L T V N K T D P N S S S V D K L
 gcggccgcaactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaagcccga
 A A A L E H H H H H H - D P A A N K A R
 aagatgtcstcga
 K M X S

*En cian se indican los residuos sujetos a mutación en este trabajo.

SacB D87A/E342A

cgwwgggggattgtgagcggataacaattcccctctagaaataattttgtttaactttaa
 X X G I V S G - Q F P S R N N F V - L -
 gaaggagatamcmtatgaaagaaacgaacccaaaagccatataaggaaacatcggcatt
 E G D X X M K E T N Q K P Y K E T Y G I
 tcccatattacacgcatgatatgctgcaaatccctgaacagcaaaaaaatgaaaaatat
 S H I T R H D M L Q I P E Q Q K N E K Y
 caagttcctgaattcgattcgtccacaattaaaaatatctcttctgcaaaaaggcctggac
 Q V P E F D S S T I K N I S S A K G L D
 gtttgggagctggccattacaaaacgctgacggcactgtcgaaactatcacggctac
 V W A S W P L Q N A D G T V A N Y H G Y
 cacatcgtctttgcattagccggagatcctaaaaatgccgatgacacatcgatttcatg
 H I V F A L A G D P K N A D D T S I Y M
 ttctatcaaaaagtcggcgaacttctattgacagctggaaaaacgctggcgcgctcttt
 F Y Q K V G E T S I D S W K N A G R V F
 aaagacagcgacaaattcgatgcaaatgattctatcctaaaagaccaaacacaagaatgg
 K D S D K F D A N D S I L K D Q T Q E W
 tcaggttcagccacatttacatctgacggaaaaatccgtttattctacactgattttctcc
 S G S A T F T S D G K I R L F Y T D F S
 ggtaaacattacggcaaaccaactgacaactgcacaagtaacgtatcagcatcagac
 G K H Y G K Q T L T T A Q V N V S A S D
 agctctttgaacatcaacggtgtagaggattataaatcaatctttgacggtgacggaaaa
 S S L N I N G V E D Y K S I F D G D G K
 acgtatcaaaatgtacagcagttcatcgatgaaggcaactacagctcaggcgacaacctat
 T Y Q N V Q Q F I D E G N Y S S G D N H
 acgctgagagatcctcactacgtagaagataaaggccacaaatacttagtatttgaagca
 T L R D P H Y V E D K G H K Y L V F E A
 aacactggaactgaagatggctaccaaggcgaagaatctttatttaacaaagcatactat
 N T G T E D G Y Q G E E S L F N K A Y Y
 ggcaaaagcacatcattcttcgctcaagaaagtcaaaaacttctgcaaaagcgataaaaaa
 G K S T S F F R Q E S Q K L L Q S D K K
 cgcacggctgagttagcaaacggcgcctctcggatgattgagctaaacgatgattacagc
 R T A E L A N G A L G M I E L N D D Y T
 ctgaaaaaagtgatgaaaccgctgattgcatctaacacagtaacagatgaaattgcccg
 L K K V M K P L I A S N T V T D E I A R
 gcgaacgtctttaaaatgaacggcaaatggtacctgttactgactcccgcggatcaaaa
 A N V F K M N G K W Y L F T D S R G S K
 atgacgattgacggcattacgtctaacgatatttacatgcttggttatgtttctaattct
 M A T I D G I T S N D I Y M L G Y V S N S
 ttaactggccatacaagccgctgaacaaaactggccttgtgttaaaaatggatcttgat
 L T G P Y K P L N K T G L V L K M D L D
 cctaacgatgtaacctttacttactcacacttcgctgtacctcaagcgaaaggaaacaat
 P N D V T F T Y S H F A V P Q A K G N N
 gtcgtgattacaagctatatgacaaacagaggattctacgcagacaaacaatcaacgttt
 V V I T S Y M T N R G F Y A D K Q S T F
 gcgcaagcttctgctgaacatcaaggcaagaaacatctgttgtcaaagacagcatc
 A P S F L L N I K G K K T S V V K D S I
 cttgaacaaggacaattaacagtttaacaaaacggatccgaattcgagctccgtcgacaag
 L E Q G Q L T V N K T D P N S S S V D K
 cttgcccgcactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcc
 L A A A L E H H H H H H - D P A A N K A
 cgaaagaagtcytt
 R K K X

*En amarillo se resaltan las mutaciones.

SacB N242A

wwggggattgtgagcgggataacaattcccctctagaataattttgtttaactttaagaa
 X G I V S G - Q F P S R N N F V - L - E
 ggagatatacatatgaaagaaacgaaccaaagccatataaggaaacatacggcatttcc
 G D I H M K E T N Q K P Y K E T Y G I S
 catattacgcgcatgatgctgcaaattccctgaacagcaaaaaaatgaaaaatcaaa
 H I T R H D M L Q I P E Q Q K N E K Y Q
 gttcctgaattcgattcgtccacaattaaaaatctcttctgcaaaaggcctggacggt
 V P E F D S S T I K N I S S A K G L D V
 tgggacagctggccattacaaaacgctgacggcactgtcgaaactatcacggctaccac
 W D S W P L Q N A D G T V A N Y H G Y H
 atcgtctttgcattagccggagatcctaaaaatgcggatgacacatcgatttacatgttc
 I V F A L A G D P K N A D D T S I Y M F
 tatcaaaaagtgcggcgaacttctattgacagctggaaaaacgctggccgcgtctttaaa
 Y Q K V G E T S I D S W K N A G R V F K
 gacagcgacaaaattcgatgcaaatgattctatcctaaaagaccaaacacaagaatggta
 D S D K F D A N D S I L K D Q T Q E W S
 ggttcagccacatttacatctgacggaaaaatccggtttattctacactgatttctccggt
 G S A T F T S D G K I R L F Y T D F S G
 aacattacggcacaacaaactgacaactgcacaagttaacgtatcagcatcagacagc
 K H Y G K Q T L T T A Q V N V S A S D S
 tctttgaacatcaacgggtgtagaggattataaatcaatctttgacgggtgacggaaaaacg
 S L N I N G V E D Y K S I F D G D G K T
 tatcaaaaatgtacagcagttcatcgatgaaggcaactacagctcaggcgcagcgcatacg
 Y Q N V Q Q F I D E G N Y S S G D A H T
 ctgagagatcctcactacgtagaagataaaggccacaataacttagtattgaaagcaaac
 L R D P H Y V E D K G H K Y L V F E A N
 actggaactgaagatggctaccaaggcgaagaatctttatttaacaaagcatactatggc
 T G T E D G Y Q G E E S L F N K A Y Y G
 aaaagcacatcattctccgtcaagaaagtcaaaaacttctgcaaagcgataaaaaacgc
 K S T S F F R Q E S Q K L L Q S D K K R
 acggctgagtttagcaaacggcgctctcggtatgattgagctaaacgatgattacacgctg
 T A E L A N G A L G M I E L N D D Y T L
 aaaaaagtgatgaaaccgctgattgcatctaacacagtaacagatgaaattgaaacgcgcg
 K K V M K P L I A S N T V T D E I E R A
 aacgtctttaaaatgaacggcaaatggtacctgttactgactcccgcggatcaaaaatg
 N V F K M N G K W Y L F T D S R G S K M
 acgattgacggcattacgtctaacgatatttacatgcttggttatgtttctaattcttta
 T I D G I T S N D I Y M L G Y V S N S L
 actggccatacaagccgctgaacaaaactggccttgtgttaaaaatggatcttgcct
 T G P Y K P L N K T G L V L K M D L D P
 aacgatgtaacctttacttactcacacttcgctgtacctcaagcgaaggaaacaatgta
 N D V T F T Y S H F A V P Q A K G N N V
 gtgattacaagctatatgacaacagaggattctacgcagacaaaacaatcaacgtttgcg
 V I T S Y M T N R G F Y A D K Q S T F A
 ccaagcttctgctgaacatcaaaggcaagaaaacatctgtgtgcaagacagacatcctt
 P S F L L N I K G K K T S V V K D S I L
 gaacaaggacaattaacagttaacaaaacggatccgaattcgagctccgctcgacaagctt
 E Q G Q L T V N K T D P N S S S V D K L
 gcggccgactcgagcaccaccaccaccactgagatccsgctgctaacaagcccga
 A A A L E H H H H H H - D X A A N K A R
 aagaatgctycgtmc
 K N A X X

*En amarillo se resalta la mutación.

SacB Y237A

wwwagggggattgtgagcggataacaattccctctagaaataatthttgtttaactttaa
 X R G I V S G - Q F P S R N N F V - L -
 gaaggagatatacatatgaaagaaacgaacccaaagccatataaggaacatacggcatt
 E G D I H M K E T N Q K P Y K E T Y G I
 tcccatattacagccatgatatgctgcaaactccctgaacagcaaaaaaatgaaaaat
 S H I T R H D M L Q I P E Q Q K N E K Y
 caagttcctgaattcgattcgtccacaattaaaaatctcttctgcaaaaggcctggac
 Q V P E F D S S T I K N I S S A K G L D
 gtttgggacagctggccattacaaaacgctgacggcactgctgcaaaactatcacggctac
 V W D S W P L Q N A D G T V A N Y H G Y
 cacatcgtctttgcattagccggagatcctaaaaatgccgatgacacatcgatttacatg
 H I V F A L A G D P K N A D D T S I Y M
 ttctatcaaaaagtcggcgaacttctattgacagctggaaaaacgctggccgctcttt
 F Y Q K V G E T S I D S W K N A G R V F
 aaagacagcgacaaattcgatgcaaattgattctatcctaaaagaccaaacacaagaatgg
 K D S D K F D A N D S I L K D Q T Q E W
 tcaggttcagccacatttacatctgacggaaaaatccgtttattctacactgatttctcc
 S G S A T F T S D G K I R L F Y T D F S
 ggtaaacattacggcaacaaacactgacaactgcacaagtaacgcatcagcatcagac
 G K H Y G K Q T L T T A Q V N V S A S D
 agctctttgaacatcaacggtgtagaggattataaatcaatctttgacggtgacggaaaa
 S S L N I N G V E D Y K S I F D G D G K
 acgtatcaaaatgtacagcagttcatcgatgaaggcaacgagctcaggcgacaaccat
 T Y Q N V Q Q F I D E G N A S S G D N H
 acgctgagagatcctcactacgtagaagataaaaggccacaaataacttagtatttgaagca
 T L R D P H Y V E D K G H K Y L V F E A
 aacactggaactgaagatggctaccaaggcgaagaatctttatttaacaaagcatactat
 N T G T E D G Y Q G E E S L F N K A Y Y
 ggcaaaagcacatcattcttcgctcaagaaagtcaaaaacttctgcaaaagcgataaaaa
 G K S T S F F R Q E S Q K L L Q S D K K
 cgcaaggctgagttagcaaacggcgctctcggatgattgagctaaacgatgattacacg
 R T A E L A N G A L G M I E L N D D Y T
 ctgaaaaagtgatgaaaccgctgattgcatctaacacagtaacagatgaaattgaacgc
 L K K V M K P L I A S N T V T D E I E R
 gcgaacgtctttaaaatgaacggcaaatggtacctgttctactgactcccgcggatcaaaa
 A N V F K M N G K W Y L F T D S R G S K
 atgacgattgacggcattacgtctaacgatatttacatgcttggttatgtttctaattct
 M T I D G I T S N D I Y M L G Y V S N S
 ttaactggccatacaagcggctgaacaaaactggccttggttataaaatggatcttgat
 L T G P Y K P L N K T G L V L K M D L D
 cctaacgatgtaacctttacttactcacacttcgctgtacctcaagcgaaaggaaacaat
 P N D V T F T Y S H F A V P Q A K G N N
 gtcgtgattacaagctatatgacaacagaggattctacgcagacaaacaatcaacgttt
 V V I T S Y M T N R G F Y A D K Q S T F
 gcgccaagcttctgctgaacatcaaaggcaagaaaacatctgttgtcaaagacagcatc
 A P S F L L N I K G K K T S V V K D S I
 cttgaacaaggacaattaacagtttaacaaaacggatccgaattcgagctccgtcgacaag
 L E Q G Q L T V N K T D P N S S S V D K
 cttgcccggcactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcc
 L A A A L E H H H H H H - D P A A N K A
 cgaaagaagryacmc
 R K K X X

*En amarillo se resalta la mutación.

SacB K363A

cgwwwgggggatgtgagcggataacaattccctctagaaataatgtttaaactttaa
 X X G D V S G - Q F P S R N N F V - L -
 gaaggagatatacatatgaaagaaacgaacccaaagccatataaggaacatacggcatt
 E G D I H M K E T N Q K P Y K E T Y G I
 tcccatattacagccatgatatgctgcaaactccctgaacagcaaaaaatgaaaaat
 S H I T R H D M L Q I P E Q Q K N E K Y
 caagttcctgaattcgattcgtccacaattaaaaatctcttctgcaaaaggcctggac
 Q V P E F D S S T I K N I S S A K G L D
 gtttgggacagctggccattacaaaacgctgacggcactgctgcaaaactatcacggctac
 V W D S W P L Q N A D G T V A N Y H G Y
 cacatcgtctttgcattagccggagatcctaaaaatgccgatgacacatcgatttacatg
 H I V F A L A G D P K N A D D T S I Y M
 ttctatcaaaaagtcggcgaacttctattgacagctggaaaaacgctggccgctcttt
 F Y Q K V G E T S I D S W K N A G R V F
 aaagacagcgacaaaattcgatgcaaattgattctatcctaaaagaccaaacacaagaatgg
 K D S D K F D A N D S I L K D Q T Q E W
 tcaggttcagccacatttacatctgacggaaaaatccgtttattctacactgatttctcc
 S G S A T F T S D G K I R L F Y T D F S
 ggtaaacattacggcaaacacaaactgacaactgacaagttaacgtatcagcatcagac
 G K H Y G K Q T L T T A Q V N V S A S D
 agctctttgaacatcaacggtgtagaggattataaatcaatctttgacggtgacggaaaa
 S S L N I N G V E D Y K S I F D G D G K
 acgtatcaaaatgtacagcagttcatcgatgaaggcaactacagctcaggcgacaaccat
 T Y Q N V Q Q F I D E G N Y S S G D N H
 acgctgagagatcctcactacgtagaagataaaggccacaaatacttagtatttgaagca
 T L R D P H Y V E D K G H K Y L V F E A
 aacactggaactgaagatggctaccaaggcgaagaatctttatttaacaaagcatactat
 N T G T E D G Y Q G E E S L F N K A Y Y
 ggcaaaagcacatcattcttcgctcaagaaagtcaaaaacttctgcaaaagcgataaaaa
 G K S T S F F R Q E S Q K L L Q S D K K
 cgcaaggctgagttagcaaacggcgctctcggatgattgagctaaacgatgattacacg
 R T A E L A N G A L G M I E L N D D Y T
 ctgaaaaagtgatgaaaccgctgattgcatctaacacagtaacagatgaaattgaacgc
 L K K V M K P L I A S N T V T D E I E R
 gcgaacgtctttaaaatgaacggcaaatggtacctgttcaactgactcccgcggatcagcg
 A N V F K M N G K W Y L F T D S R G S A
 atgacgattgacggcattacgctaacgatatttacatgcttggttatgtttctaattct
 M T I D G I T S N D I Y M L G Y V S N S
 ttaactggccatacaagcggctgaacaaaactggccttggttaaaaatggatcttgat
 L T G P Y K P L N K T G L V L K M D L D
 cctaacgatgtaacctttacttactcacacttcgctgtacctcaagcgaaaggaaacaat
 P N D V T F T Y S H F A V P Q A K G N N
 gtcgtgattacaagctatatgacaacagaggattctacgcagacaaacaatcaacgttt
 V V I T S Y M T N R G F Y A D K Q S T F
 gcgccaagcttctgctgaacatcaaaggcaagaaaacatctgttgctcaaagacagcatc
 A P S F L L N I K G K K T S V V K D S I
 cttgaacaaggacaattaacagtttaacaaaacggatccgaattcgagctccgtcgacaag
 L E Q G Q L T V N K T D P N S S S V D K
 cttgcccggcactcgagcaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagcc
 L A A A L E H H H H H H - D P A A N K A
 cgaaagaagtrycga
 R K K X R

*En amarillo se resalta la mutación.

SacB H243L

aatggggattgtgagcggataacaattcccctctagaaataatTTTgtttaactttaagaa
M G I V S G - Q F P S R N N F V - L - E
ggagatatmcmwtgaaagaaacgaaccaaagccatataaggaaacatacggcatttcc
G D X X X K E T N Q K P Y K E T Y G I S
catattacagccatgatatgctgcaaattccctgaacagcaaaaaaatgaaaaatcaa
H I T R H D M L Q I P E Q Q K N E K Y Q
gttcctgaattcgattcgtccacaattaaaaatatctctctgcaaaaggcctggacgtt
V P E F D S S T I K N I S S A K G L D V
tgggacagctggcattacaaaacgctgacggcactgtcgaaactatcacggctaccac
W D S W P L Q N A D G T V A N Y H G Y H
atcgtctttgcattagccggagatcctaaaaatgccggatgacacatcgatttacatgttc
I V F A L A G D P K N A D D T S I Y M F
tatcaaaaagtccggcgaacttctattgacagctggaaaaacgctggccgcgtctttaaa
Y Q K V G E T S I D S W K N A G R V F K
gacagcgacaaattcgatgcaaatgattctatcctaaaagaccaaacacaagaatggta
D S D K F D A N D S I L K D Q T Q E W S
ggttcagccacatttacatctgacggaaaaatccggtttattctacactgatttctccggt
G S A T F T S D G K I R L F Y T D F S G
aaacattacggcaaacaaacactgacaactgcacaagttaacgtatcagcatcagacagc
K H Y G K Q T L T T A Q V N V S A S D S
tctttgaacatcaacgggtgtagaggattataaatcaatctttgacgggtgacggaaaaacg
S L N I N G V E D Y K S I F D G D G K T
tatcaaaaatgtacagcagttcatcgatgaaggcaactacagctcagggcacaacttgacg
Y Q N V Q Q F I D E G N Y S S G D N L T
ctgagagatcctcactacgtagaagataaaggccacaataacttagtattgaaagcaaac
L R D P H Y V E D K G H K Y L V F E A N
actggaactgaagatggctaccaaggcgaagaatctttatttaacaaagcatactatggc
T G T E D G Y Q G E E S L F N K A Y Y G
aaaagcacatcattctccgtcaagaaagtcaaaaacttctgcaaagcgataaaaaacgc
K S T S F F R Q E S Q K L L Q S D K K R
acggctgagttagcaaacggcgtctcgggtatgattgagctaaacgatgattacacgctg
T A E L A N G A L G M I E L N D D Y T L
aaaaaagtgatgaaaccgctgattgcatctaacacagtaacagatgaaattgaacgcgcg
K K V M K P L I A S N T V T D E I E R A
aacgtctttaaaatgaacggcaaatggtacctgttactgactcccgcggatcaaaaatg
N V F K M N G K W Y L F T D S R G S K M
acgattgacggcattacgtctaacgatatttacatgcttggttatgtttctaattcttta
T I D G I T S N D I Y M L G Y V S N S L
actggccatacaagccgctgaacaaaactggccttggttaaaaatggatcttgatcct
T G P Y K P L N K T G L V L K M D L D P
aacgatgtaacctttacttactcacacttcgctgtacctcaagcgaaggaaacaatgta
N D V T F T Y S H F A V P Q A K G N N V
gtgattacaagctatatgacaaacagaggattctacgcagacaaacaatcaacgtttgcg
V I T S Y M T N R G F Y A D K Q S T F A
ccaagcttctgctgaacatcaaaggcaagaaaacatctgtgtgcaagacagcattcctt
P S F L L N I K G K K T S V V K D S I L
gaacaaggacaattaacagttaacaaaacggatccgaattcgagctccgtcgacaagctt
E Q G Q L T V N K T D P N S S S V D K L
gcggccgactcgagcaccaccaccac caccactgagatccggctgctaacaaagcccg
A A A L E H H H H H H - D P A A N K A R
aaagaagctytmt
K K X X

*En amarillo se resalta la mutación.

SacB Y187A

tcccgcgaaattaatacgaactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccctct
S R E I N T T H Y R G I V S G - Q F P S
agaaataatgttgaacttaagaaggagatatacatatgaaagaaacgaacaaaag
R N N F V - L - E G D I H M K E T N Q K
ccatataaggaaacatacggcatttcccatattacacgccatgatatgctgcaaaccct
P Y K E T Y G I S H I T R H D M L Q I P
gaacagcaaaaaatgaaaaatatcaagttcctgaattcgattcgccacaattaaaaat
E Q Q K N E K Y Q V P E F D S S T I K N
atctcttctgcaaaaggcctggacgtttgggacagctggccattacaaaacgctgacggc
I S S A K G L D V W D S W P L Q N A D G
actgtcgaaactatcacggctaccacatcgtctttgcattagccggagatcctaaaaat
T V A N Y H G Y H I V F A L A G D P K N
gcggatgacacatcgatttacatggttctatcaaaaagtcggcgaacttctattgacagc
A D D T S I Y M F Y Q K V G E T S I D S
tggaaaaacgctggccgctctttaaagacagcgacaaaattcgatgcaaatgattctatc
W K N A G R V F K D S D K F D A N D S I
ctaaaagaccaaacacaagaatgggtcaggttcagccacatttacatctgacggaaaaatc
L K D Q T Q E W S G S A T F T S D G K I
cgtttattctacactgatttctcggtaaacatg**cgggg**caaaacaaactgacaactgca
R L F Y T D F S G K H **A** G K Q T L T T A
caagttaacgtatcagcatcagacagctctttgaacatcaacgggtgtagaggattataaa
Q V N V S A S D S S L N I N G V E D Y K
tcaatctttgacggtgacggaaaaacgtatcaaatgtacagcagttcatcgatgaaggc
S I F D G D G K T Y Q N V Q Q F I D E G
aactacagctcagggcacaaccatacgtgagagatcctcactacgtagaagataaaggc
N Y S S G D N H T L R D P H Y V E D K G
cacaataacttagtatttgaagcaaacactggaactgaagatggctaccaaggcgaagaa
H K Y L V F E A N T G T E D G Y Q G E E
tctttatttaacaaagcatactatggcaaaagcacatcattcttccgtcaagaaagtcaa
S L F N K A Y Y G K S T S F F R Q E S Q
aaacttctgcaaaagcgataaaaaacgcacggctgagttagcaaacggcgctctcggtagt
K L L Q S D K K R T A E L A N G A L G M
attgagctaaacgatgattacacgctgaaaaaagtgatgaaaccgctgattgactaac
I E L N D D Y T L K K V M K P L I A S N
acagtaacagatgaaattgaacgcggaacgtctttaaataacgaaatggtacctg
T V T D E I E R A N V F K M N G K W Y L
ttcactgactcccgcggatcaaaaatgacgattgacggcattacgtctaacgatatttac
F T D S R G S K M T I D G I T S N D I Y
atgcttgggtatgtttctaattctttaaactggccatacaagccgctgaacaaaactggc
M L G Y V S N S L T G P Y K P L N K T G
cttggttataaaaatggatcttgatcctaacgatgtaacctttacttactcacacttcgct
L V L K M D L D P N D V T F T Y S H F A
gtacctcaagcgaaggaacaatgtcgtgattacaagctatatgacaaaacagaggattc
V P Q A K G N N V V I T S Y M T N R G F
tacgcagacaacaatcaacgtttgcgccaagcttctgctgaacatcaaaggcaagaaa
Y A D K Q S T F A P S F L L N I K G K K
acatctgttgcaaaagacagcatccttgaacaaggacaattaacagttaacaaaacggat
T S V V K D S I L E Q G Q L T V N K T D
ccgaattcgagctccgtcgacaagcttgcggccgactcgagcaccaccaccaccaccac
P N S S S V D K L A A A L E H H H H H H
tgagatccggctgctaacaaagccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgag
- D P A A N K A R K E A E L A A A T A E
caataactagc
Q - L

*En amarillo se resalta la mutación.

SacB K389A

cgatcccgcgaaattaatacgcactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccc
 R S R E I N T T H Y R G I V S G - Q F P
 tctagaaataatTTTgtttaactTTaagaaggagatatacatatgaaagaacgaaccaa
 S R N N F V - L - E G D I H M K E T N Q
 aagccatataaggaacatacggcatttcccatattacacgcatgatgatgctgcaaac
 K P Y K E T Y G I S H I T R H D M L Q I
 cctgaacagcaaaaaaatgaaaaatcaagttcctgaattcgattcgtccacaattaa
 P E Q Q K N E K Y Q V P E F D S S T I K
 aatatctcttctgcaaaaggcctggacgtttggacagctggcattacaaaacgctgac
 N I S S A K G L D V W D S W P L Q N A D
 ggcactgtcgcgaaactatcacggctaccacatcgtctttgcattagccggagatcctaaa
 G T V A N Y H G Y H I V F A L A G D P K
 aatgcgatgacacatcgatttcatggttctatcaaaaagtcggcgaaacttctattgac
 N A D D T S I Y M F Y Q K V G E T S I D
 agctggaaaaacgctggccgctctttaaagacagcgacaaattcgatgcaaatgattct
 S W K N A G R V F K D S D K F D A N D S
 atcctaaaagaccaaacacaagaatggtcaggttcagccacatttcatctgacggaaaa
 I L K D Q T Q E W S G S A T F T S D G K
 atcggtttattctacactgatttctccgtaaacattacggcaaacaaacactgacaact
 I R L F Y T D F S G K H Y G K Q T L T T
 gcacaagttaacgtatcagcatcagacagctctttgaacatcaacgggtgtagaggattat
 A Q V N V S A S D S S L N I N G V E D Y
 aaatcaatctttgacgggtgacggaaaaacgtatcaaatgtacagcagttcatcgatgaa
 K S I F D G D G K T Y Q N V Q Q F I D E
 ggcaactacagctcaggcgacaaccatacgcctgagagatcctcactacgtagaagataaa
 G N Y S S G D N H T L R D P H Y V E D K
 ggccacaaatacttagtattttgaagcaaacactggaactgaagatggctaccaaggcgaa
 G H K Y L V F E A N T G T E D G Y Q G E
 gaatctttatTTaacaagcataactatggcaaaagcacatcattcttccgtaagaaagt
 E S L F N K A Y Y G K S T S F F R Q E S
 caaaaacttctgcaaaagcgataaaaaacgcacggctgagtttagcaaacggcgctctcggt
 Q K L L Q S D K K R T A E L A N G A L G
 atgattgagctaaacgatgattacacgctgaaaaaagtgatgaaaccgctgattgatct
 M I E L N D D Y T L K K V M K P L I A S
 aacacagtaacagatgaaattgaacgcgcgaacgtctttaaaatgaacggcaaatggtag
 N T V T D E I E R A N V F K M N G K W Y
 ctgttactgactcccgggatcaaaaatgacgattgacggcattacgtctaacgatatt
 L F T D S R G S K M T I D G I T S N D I
 tacatgcttgggtatgTTtctaattctttaactggccatacgcgCGcctgacaaaaact
 Y M L G Y V S N S L T G P Y A P L N K T
 ggcttgtgttaaaaatggatccttgatcctaacgatgtaacctttacttactcacacttc
 G L V L K M D L D P N D V T F T Y S H F
 gctgtacctcaagcgaaaggaaacaatgctgattacaagctatatgacaaacagagga
 A V P Q A K G N N V V I T S Y M T N R G
 ttctacgcagacaaacaatcaacgtttgcccgaagcttctgctgaacatcaaaggcaag
 F Y A D K Q S T F A P S F L L N I K G K
 aaaacatctgtgtcaaagacagcatccttgaacaaggacaattaacagttaacaaaacg
 K T S V V K D S I L E Q G Q L T V N K T
 gatccgaattcgagctccgctgcacaagcttgcggccgactcagcaccaccaccaccac
 D P N S S S V D K L A A A L E H H H H H
 cactgagatccggctgctaacaaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgct
 H - D P A A N K A R K E A E L A A A T A
 gagcaataactagcataacccttggggcctctaacgggtcttgaggggttttttctg
 E Q - L A - P L G A S K R V L R G F L L

*En amarillo se resalta la mutación.

SacB Y37A/Y41A/Y271A (“TM”)

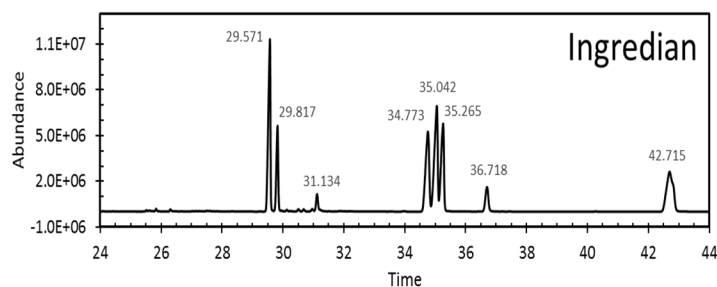
ctcgatcccgcgaaattaatcagactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccc
R S R E I N T T H Y R G I V S G - Q F P
tctagaataatTTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATACATATGAAAGAAACGAACCAA
S R N N F V - L - E G D I H M K E T N Q
aagccagcggaaggaacaGCGGGCATTTCCTATTACACGCCATGATATGCTGCAAATC
K P A K E T A G I S H I T R H D M L Q I
cctgaacagcaaaaaaatgaaaaatcaagttcctgaattcgattcgtccacaattaaa
P E Q Q K N E K Y Q V P E F D S S T I K
aatatctcttctgcaaaaggcctggacgtttggacagctggcattacaaaacgctgac
N I S S A K G L D V W D S W P L Q N A D
ggcactgtcgcgaaactatcacggctaccacatcgtctttgcattagccggagatcctaaa
G T V A N Y H G Y H I V F A L A G D P K
aatgcgatgacacatcgattacatggttctatcaaaaagtcgcgaaacttctattgac
N A D D T S I Y M F Y Q K V G E T S I D
agctggaaaaacgctggccgctctttaagacagcgacaaattcgatgcaaatgattct
S W K N A G R V F K D S D K F D A N D S
atcctaaaagaccaaacacaagaatggtcaggttcagccacatttacatctgacggaaaa
I L K D Q T Q E W S G S A T F T S D G K
atcggtttattctacactgatttctccgtaaacattacggcaaacaaacactgcaact
I R L F Y T D F S G K H Y G K Q T L T T
gcacaagttaacgtatcagcatcagacagctctttgaacatcaacgggtgtagaggattat
A Q V N V S A S D S S L N I N G V E D Y
aaatcaatctttgacgggtgacggaaaaacgtatcaaatgtacagcagttcatcgatgaa
K S I F D G D G K T Y Q N V Q Q F I D E
ggcaactacagctcaggcgacaaccatacagctgagagatcctcactacgtagaagataaa
G N Y S S G D N H T L R D P H Y V E D K
ggccacaaatacttagtattttgaagcaaacactggaactgaagatggcGCGCAAGGCGAA
G H K Y L V F E A N T G T E D G A Q G E
gaatctttatTTAAACAAGCATACTATGGCAAAGCACATCATTCTTCGTCAGAAAGT
E S L F N K A Y Y G K S T S F F R Q E S
caaaaacttctgcaaaagcgtataaaaaacgcacggctgagttagcaaacggcgctctcggt
Q K L L Q S D K K R T A E L A N G A L G
atgattgagctaaacgatgattacacgctgaaaaagtgatgaaaccgctgattgcatct
M I E L N D D Y T L K K V M K P L I A S
aacacagtaacagatgaaattgaacgcgcgaacgtctttaaaatgaacggcaaatggtac
N T V T D E I E R A N V F K M N G K W Y
ctgttactgactcccggatcaaaaatgacgattgacggcattacgtctaacgatatt
L F T D S R G S K M T I D G I T S N D I
tacatgcttgggtatgtttctaattctttaactggccatacaagccgctgaacaaaact
Y M L G Y V S N S L T G P Y K P L N K T
ggccttgtgttaaaaatggatcctgatcctaacgatgtaacctttacttactcacacttc
G L V L K M D L D P N D V T F T Y S H F
gctgtacctcaagcgaaggaacaatgctgattacaagctatatgacaaacagagga
A V P Q A K G N N V V I T S Y M T N R G
ttctacgcagacaacaatcaacgtttgcccgaagcttctgctgaacatcaaaggcaag
F Y A D K Q S T F A P S F L L N I K G K
aaaacatctgtgtcaaagacagcatccttgaacaaggacaattaacagttaacaaaacg
K T S V V K D S I L E Q G Q L T V N K T
gatccgaattcgagctccgctgacaagcttgcggccgactcgagcaccaccaccaccac
D P N S S S V D K L A A A L E H H H H H
cactgagatccggctgtaacaaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgct
H - D P A A N K A R K E A E L A A A T A
gagcaataactagcataacccttggggcctctaaccgggtcttgaggggttttttctg
E Q - L A - P L G A S K R V L R G F L L

*En amarillo se resaltan las mutaciones.

Anexo B. GC-MS de FOS tipo levana

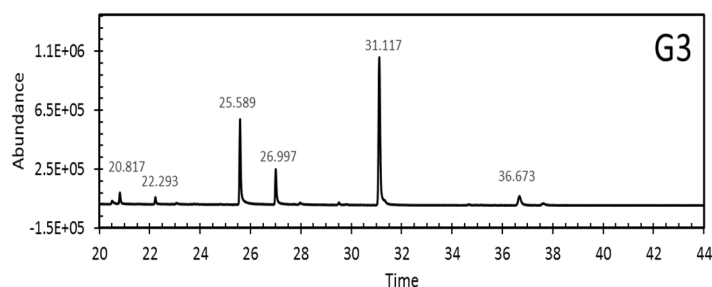
A) Cromatogramas de Ión Total (TIC) de Estándares derivatizados a PMAAs:

➤ Agavina “Ingredientian”



RT (min)	PMAA	Fragmentation Pattern; m/z (Rel. Abund. %)	Linkage Type
29.5	2,5-di-O-acetil-1,3,4,6-tetra-O-metilmanitol	129 (100), 162 (55) , 161 (35) , 87 (20), 101 (13)	6-Linked Fructose
29.8	2,5-di-O-acetil-1,3,4,6-tetra-O-metilglucitol	129 (100), 162 (48) , 161 (40) , 87 (20), 101 (13)	6-Linked Fructose
31.1	1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metilglucitol	102 (100), 129 (64) , 118 (62) , 145 (55) , 162 (36)	1-Linked Glucose
34.7	2,5,6-tri-O-acetil-1,3,4-tri-O-metilmanitol	129 (100), 162 (50) , 87 (26), 189 (19) , 99 (13)	2,6-Linked Fructose
34.9	1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metilmanitol	129 (100), 190 (30) , 161 (30) , 87 (25), 101 (12)	2,1-Linked Fructose
35.1	1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metilglucitol	129 (100), 87 (25), 161 (22) , 162 (17) , 190 (16)	2,6-Linked Fructose
	2,5,6-tri-O-acetil-1,3,4-tri-O-metilglucitol	129 (100), 87 (25), 161 (22) , 162 (17) , 190 (16)	2,1-Linked Fructose
36.7	1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metilglucitol	102 (100), 118 (81) , 129 (63) , 99 (59) , 87 (41)	1,6-Linked Glucose
42.6	1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metilhexitol	129 (100), 87 (30), 190 (27), 189 (17), 99 (12)	2,1,6-Linked Fructose

➤ Isomaltotriosa (G3)



RT (min)	PMAA	Fragmentation Pattern; m/z (Rel. Abund. %)	Linkage Type
20.8	Methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-β-glucoside ¹	88 (100), 101 (53), 75 (46), 73 (17), 71 (15)	6-Linked Glucose
22.2	Methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-glucoside ²	88 (100), 101 (52), 75 (42), 73 (20), 84 (16)	
25.6	Methyl 6-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-α/β-glucoside ³	88 (100), 101 (48), 75 (30), 73 (15), 87 (7)	
27.0	Methyl 6-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-α/β-glucoside ⁴	88 (100), 101 (52), 75 (30), 73 (14), 87 (8)	
31.1	2,5-di-O-acetil-1,3,4,6-tetra-O-methylmannitol	102 (100), 129 (68), 118 (68), 145 (58), 162 (41)	1-Linked Glucose
36.7	1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metilglucitol	102 (100), 118 (79), 99 (62), 129 (57), 87 (40)	1,6-Linked Glucose

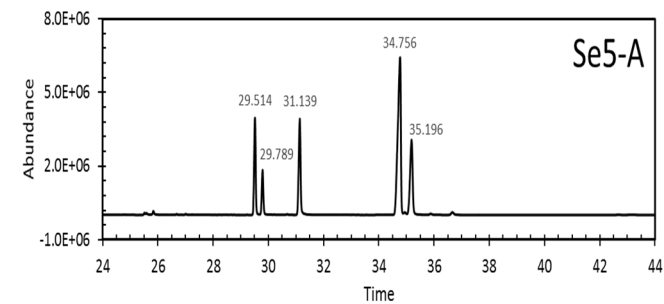
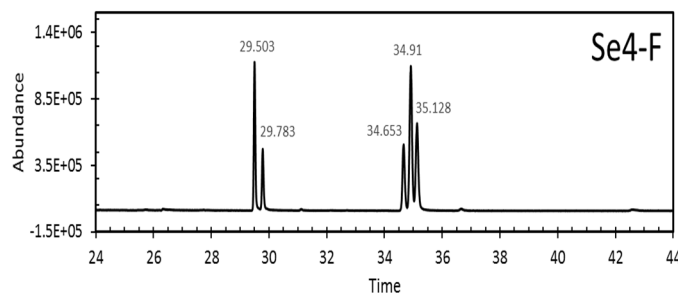
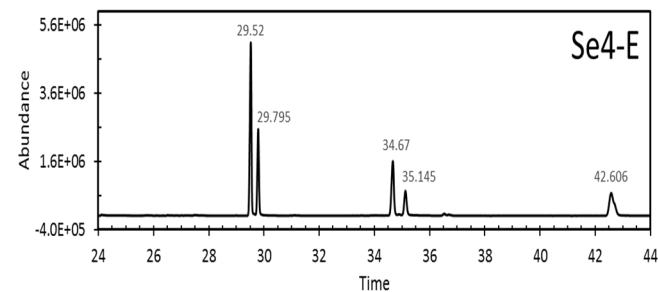
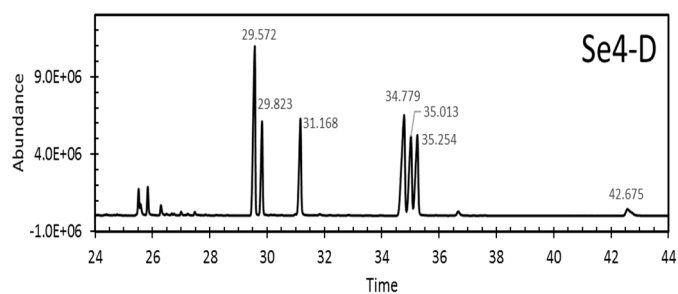
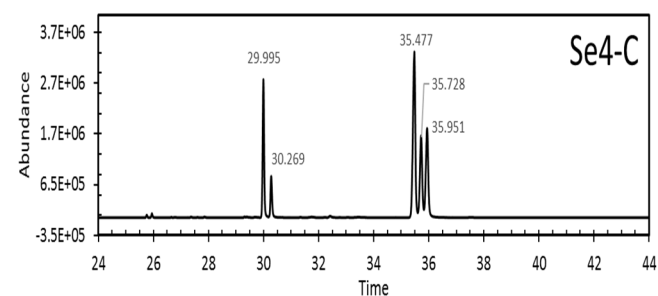
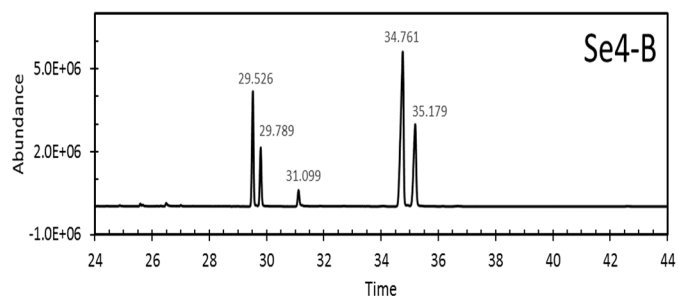
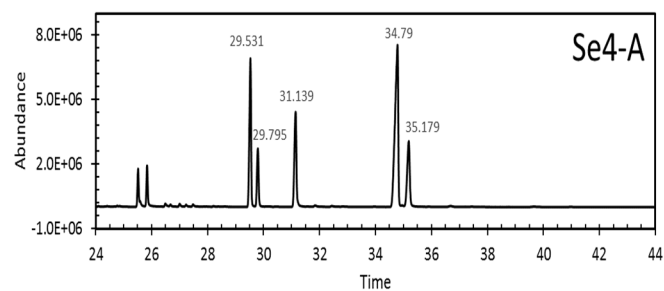
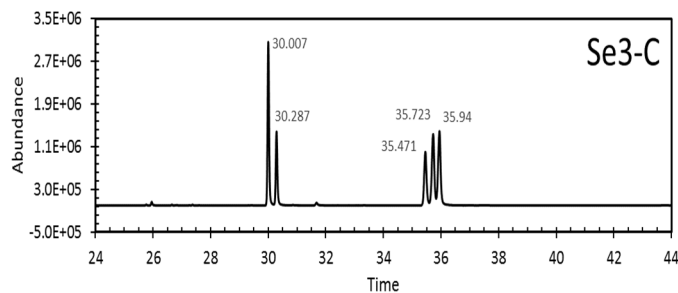
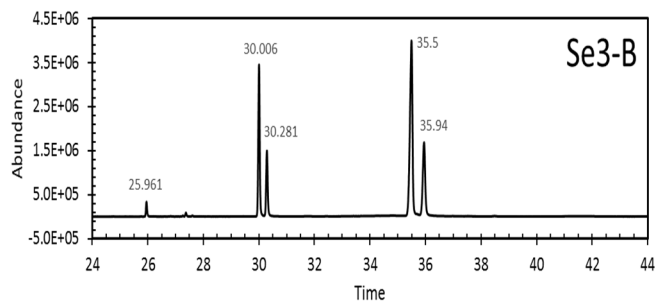
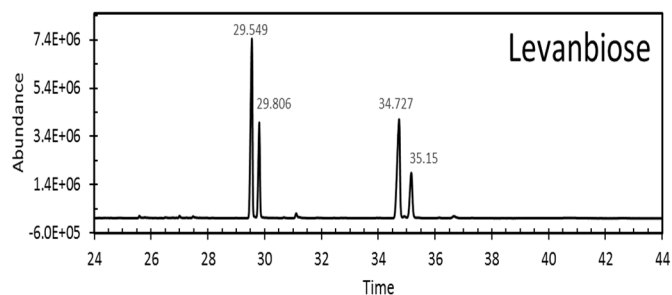
¹Methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-Glucopyranoside, (NIST, Match=801)

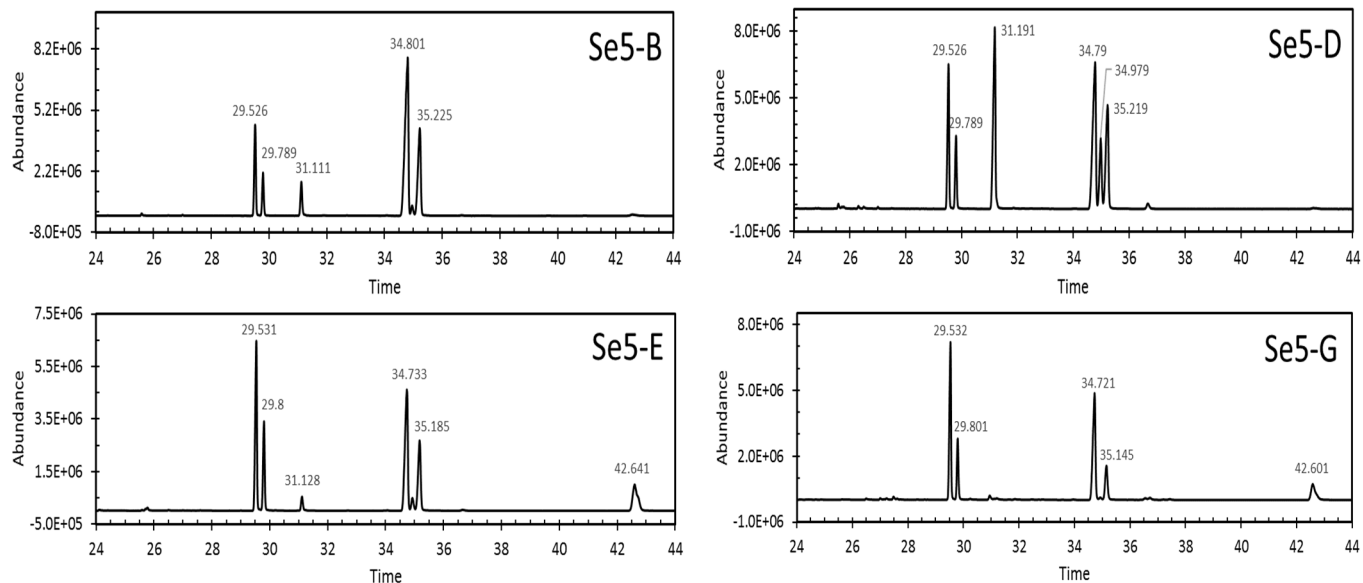
²Methyl 2,3,4,6-tetra-O-methyl-α-D-Glucopyranoside (NIST, Match=773)

³Methyl 6-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-α-D-mannopyranoside (NIST, Match=908)

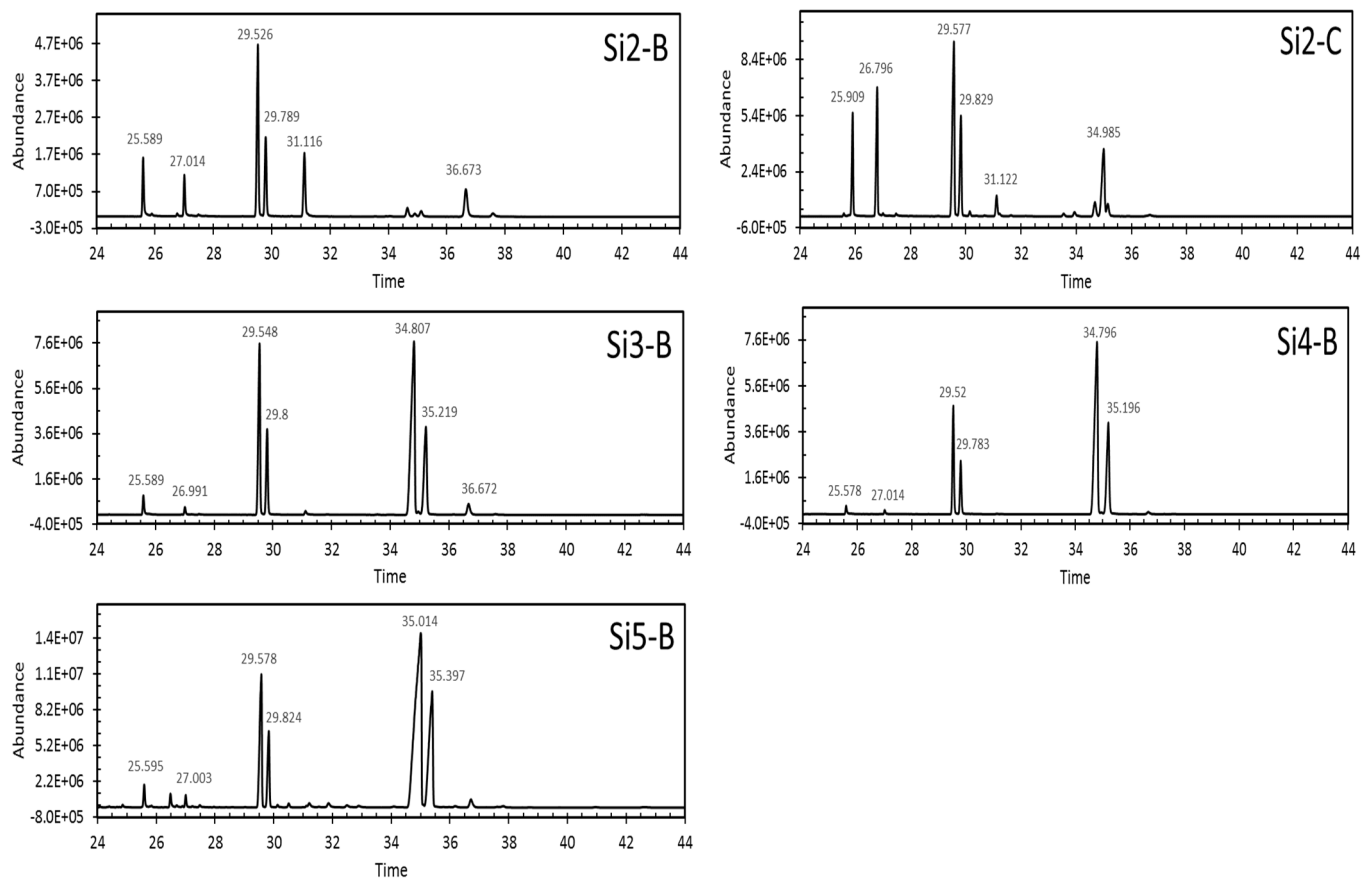
⁴Methyl 6-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-α-D-mannopyranoside (NIST, Match=923)

B) TIC de productos purificados del método bi-enzimático secuencial (Se) derivatizados a PMAAs:





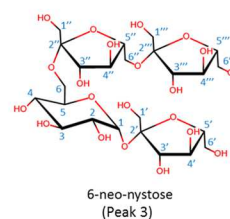
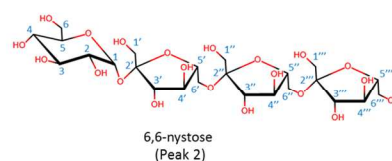
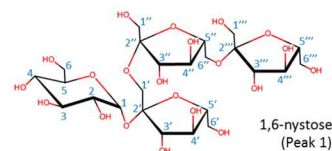
C) TIC de productos purificados del método bi-enzimático simultáneo (Si) derivatizados a PMAAs:



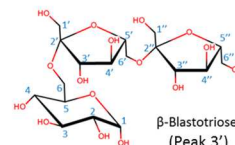
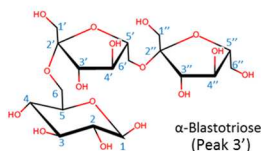
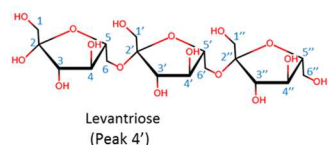
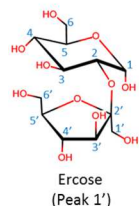
Anexo C. Espectros de RMN

Tablas de asignación de espectros ^1H y ^{13}C

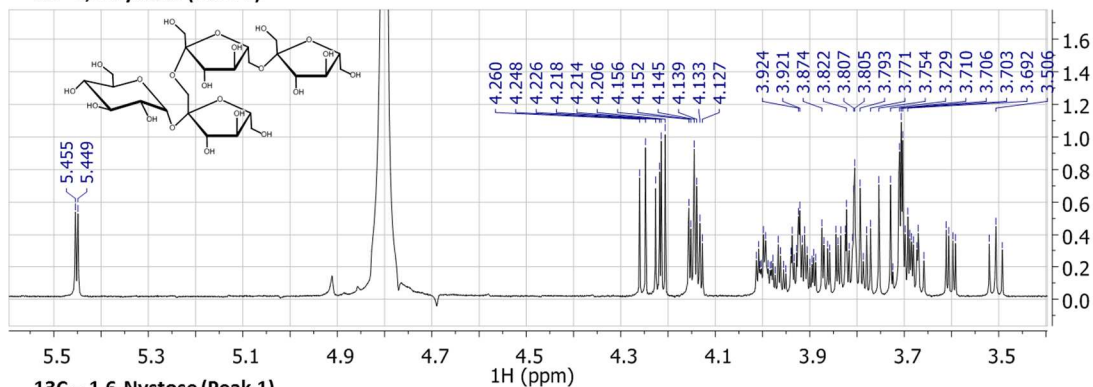
C-atom	6,6-Nystose		1,6-Nystose		6-neo-Nystose	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C-1	94.74	5.42, d (3.5)	94.63	5.45, d (4.2)	94.92	5.46, d (3.83)
C-2	73.69	3.61-3.58, m	73.57	3.60, dd (9.8, 3.5)	73.85	3.61, dd (3.89, 10.00)
C-3	75.23	3.77-3.80, m	74.98	3.79, dd (9.1)	75.25	3.79, m
C-4	71.89	3.49, t (9.1)	72.01	3.50, dd (9.8)	72.27	3.51, t (9.64)
C-5	75.03	3.85-3.87, m	74.31	3.99, m	74.60	4.00, m
C-6	62.94	3.87-3.48, m	63.56	3.93, dd (11.2, 2.1)	63.83	3.93, m
				3.70, m		3.81, m
C-1''	63.88	3.72 d (9.0)	64.13	3.70, m	64.37	3.71, m
				3.80, m		
C-2''	106.39	---	106.62	---	106.62	---
C-3''	79.02	4.20, d (8.4)	79.10	4.22, d (8.4)	79.19	4.26, d (8.80)
C-4''	77.22	4.14, t (8.4)	76.44	4.14, t (8.6)	78.11	4.16, t (8.64)
C-5''	82.98	3.98-4.01, m	83.75	3.91 ddd (4.2, 3.5)	82.92	3.97, m
C-6''	65.66	3.95, dd (10.5, 3.5)	65.17	3.86, d (11.2)	65.94	4.01, m
		3.60-3.59, m		3.67, m		3.68, m
C-1'''	62.34	3.68, m	62.60	3.81, dd (11.2, 2.8)	63.29	3.77, m
		3.84, m		3.72, m		
C-2'''	106.39	---	106.33	---	106.91	---
C-3'''	79.08	4.21, d (8.4)	79.18	4.21, d (8.4)	79.41	4.21, d (8.46)
C-4'''	78.04	4.12, t (8.4)	77.85	4.14, t (8.4)	76.70	4.14, t (8.12)
C-5'''	82.91	3.98-4.01, m	82.63	3.96, ddd (7.7, 3.5)	84.18	3.96, m
C-6'''	66.03	3.95, dd (10.5, 3.5)	65.67	4.00, m	65.01	3.89, m
		3.60-3.59, m		3.67, m		3.84, m
C-1''''	62.58	3.79 d (9.1)	63.04	3.76, d (11.2)	62.83	3.82, m
		3.70 d (10.5)		3.72, d (11.2)		3.72, m
C-2''''	106.76	---	106.41	---	105.70	---
C-3''''	78.65	4.24, d (8.5)	78.94	4.25, d (8.4)	79.35	4.22, d (8.49)
C-4''''	76.80	4.07, t (8.4)	77.28	4.14, t (8.4)	77.54	4.15, t (8.12)
C-5''''	83.75	3.89-3.91, m	83.90	3.91 ddd (4.2, 3.5)	84.04	3.92, m
C-6''''	65.10	3.85 dd (11.9, 3.5)	64.73	3.88, m	65.44	3.86, m
		3.68-3.66, m		3.82, m		



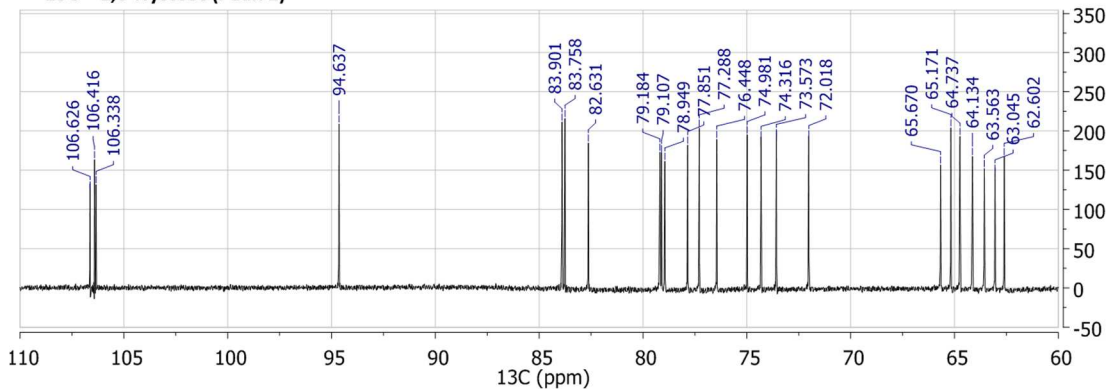
C-atom	Ercose		Levantriose		α -Blastotriose		β -Blastotriose	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C-1	94.57	5.44, d (2.9)	65.17	3.58, d (12.6)	94.72	5.27, d (3.76)	98.56	4.67, d (7.7)
				3.63, d (12.6)				
C-2	73.90	3.80, m	104.39	---	74.07	3.57, m	76.70	3.28 dd (9.1, 7.7)
C-3	73.73	3.87, dd (10.5, 9.8)	77.24	4.16, d (7)	75.23	3.73, t (10.5, 10.5)	78.23	3.52 dd (9.1, 9.1)
C-4	72.05	3.49, dd (9.8)	77.98	4.18, dd (8.4, 7)	72.30	3.47, t (10.5)	72.17	3.49 dd (9.1, 9.1)
								3.86
C-5	75.11	3.81, m	82.05	3.90, m	73.27	3.95, ddd (2.8, 7.7)	77.52	3.58, m
C-6	63.15	3.75, m	65.10	3.65, m	63.38	3.99, m	63.38	3.99, m
		3.73, m				3.85, dd (2.8, 12.2)		3.85, dd (2.8, 12.2)
C-1'	63.36	3.79, m	62.64	3.82, d (11.9)	62.71	3.72, d (11.9)	62.71	3.72, d (11.9)
		3.87, m		3.73, d (11.9)		3.85, d (12.2)		3.85, d (12.2)
C-2'	106.13	---	106.58	---	106.56	---	106.56	---
C-3'	79.86	4.22, d (8.7)	79.40	4.20, d (7.7)	79.10	4.21, d (8.5)	79.10	4.21, d (8.5)
C-4'	76.67	4.11, t (8.5)	77.23	4.14, dd (7.7)	77.87	4.14, m	77.87	4.14, m
C-5'	83.38	3.87, m	83.75	3.91, m	82.80	3.99, m	82.80	3.99, m
C-6'	64.60	3.71, m	65.04	3.86, dd (2.8, 11.9)	65.79	3.99, m	65.79	3.99, m
		3.88, m		3.92, m				
C-1''			62.57	3.79 d (12.6)	62.61	3.82, d (12.6)	62.61	3.82, d (12.6)
				3.7 d (12.6)		3.77, d (12.6)		3.77, d (12.6)
C-2''			106.38	---	106.39	---	106.39	---
C-3''			79.12	4.21, d (7)	79.42	4.20, d (8.5)	79.42	4.20, d (8.5)
C-4''			77.68	4.13, dd (7.7)	77.24	4.14, m	77.24	4.14, m
C-5''			82.89	4.0, dd (8.4, 2.8)	82.90	3.97, m	82.90	3.97, m
C-6''			65.88	3.96, dd (2.8, 10.5)	65.15	3.85, dd (3.5, 11.9)	65.13	3.70, dd (2.8, 12.6)
				3.69, m		3.77, dd (2.8, 12.6)		3.58, m 3.85, 3.69



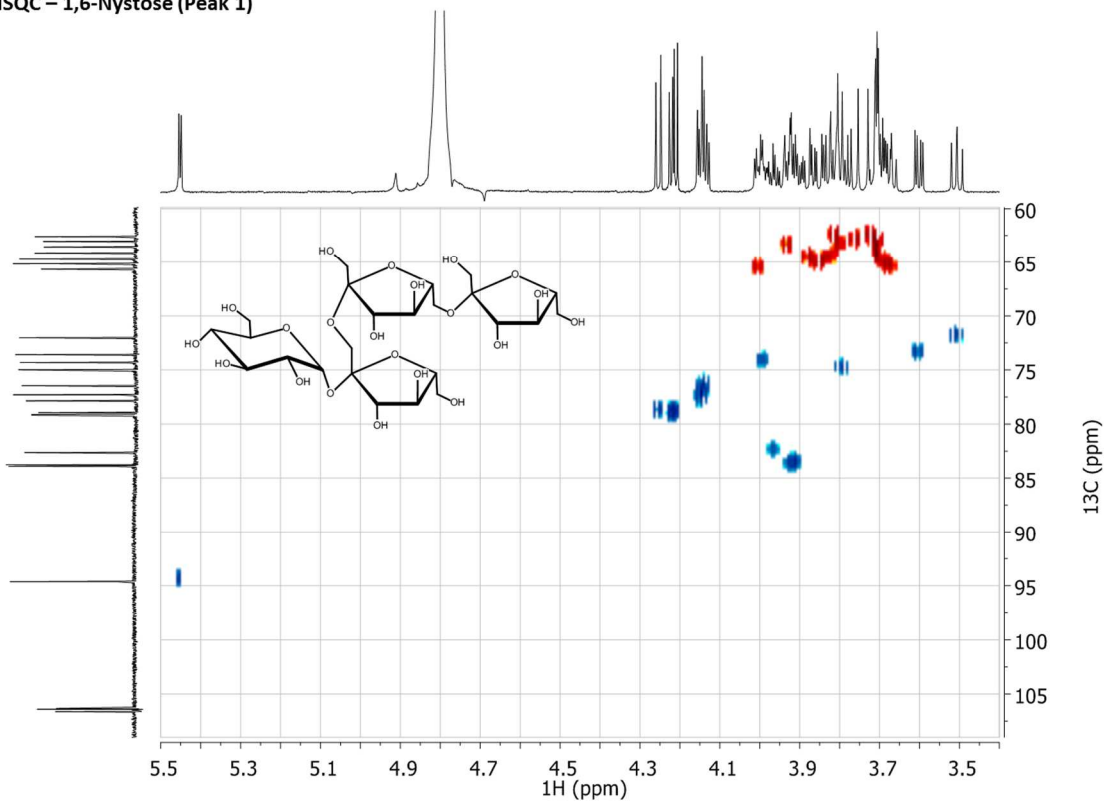
¹H – 1,6-Nystose (Peak 1)



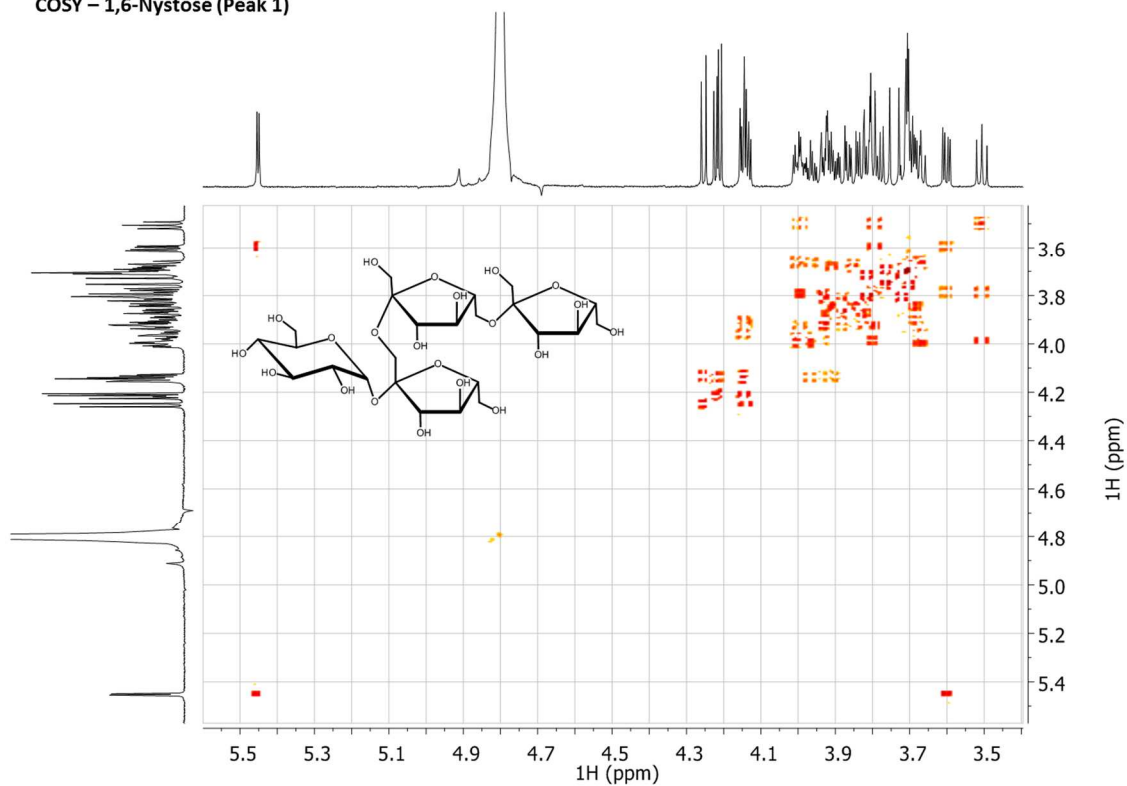
¹³C – 1,6-Nystose (Peak 1)



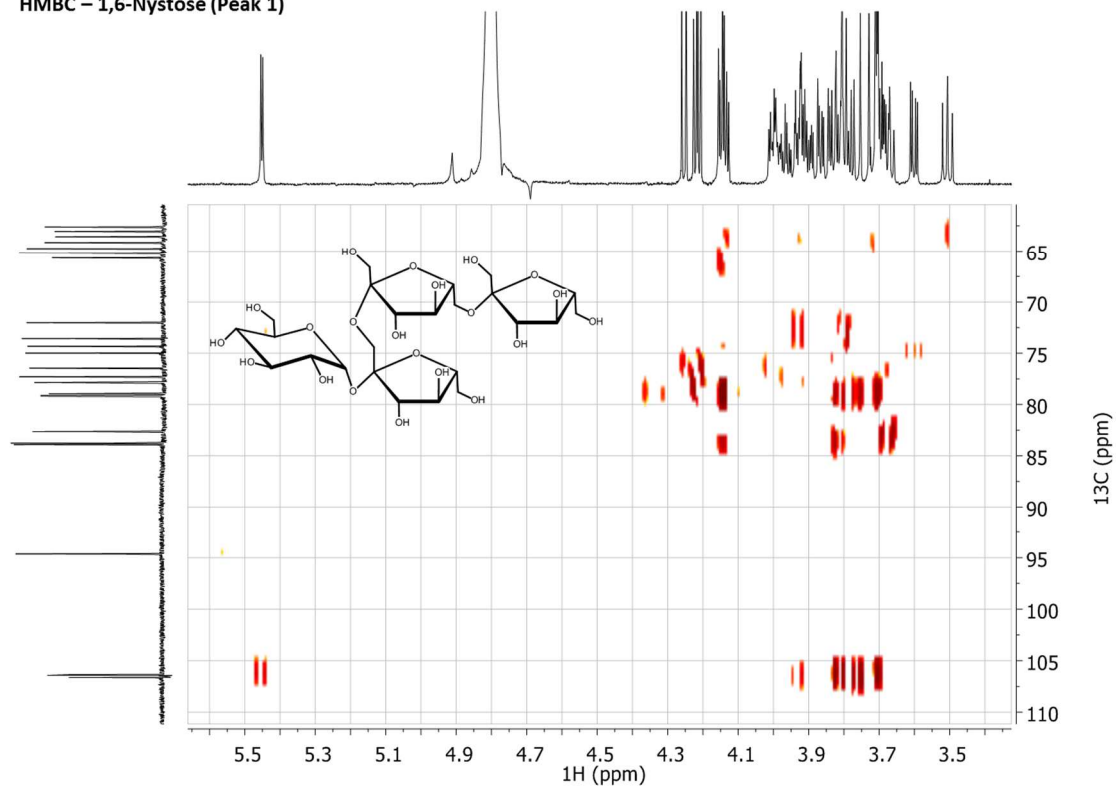
HSQC – 1,6-Nystose (Peak 1)



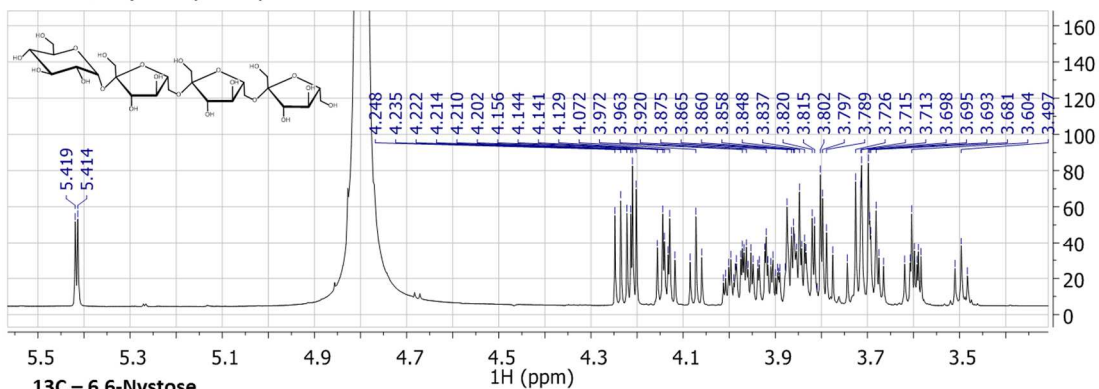
COSY – 1,6-Nystose (Peak 1)



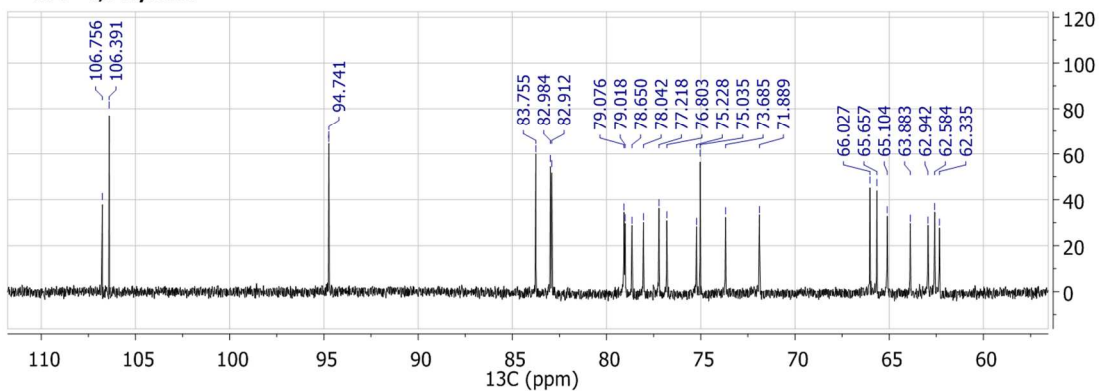
HMBC – 1,6-Nystose (Peak 1)



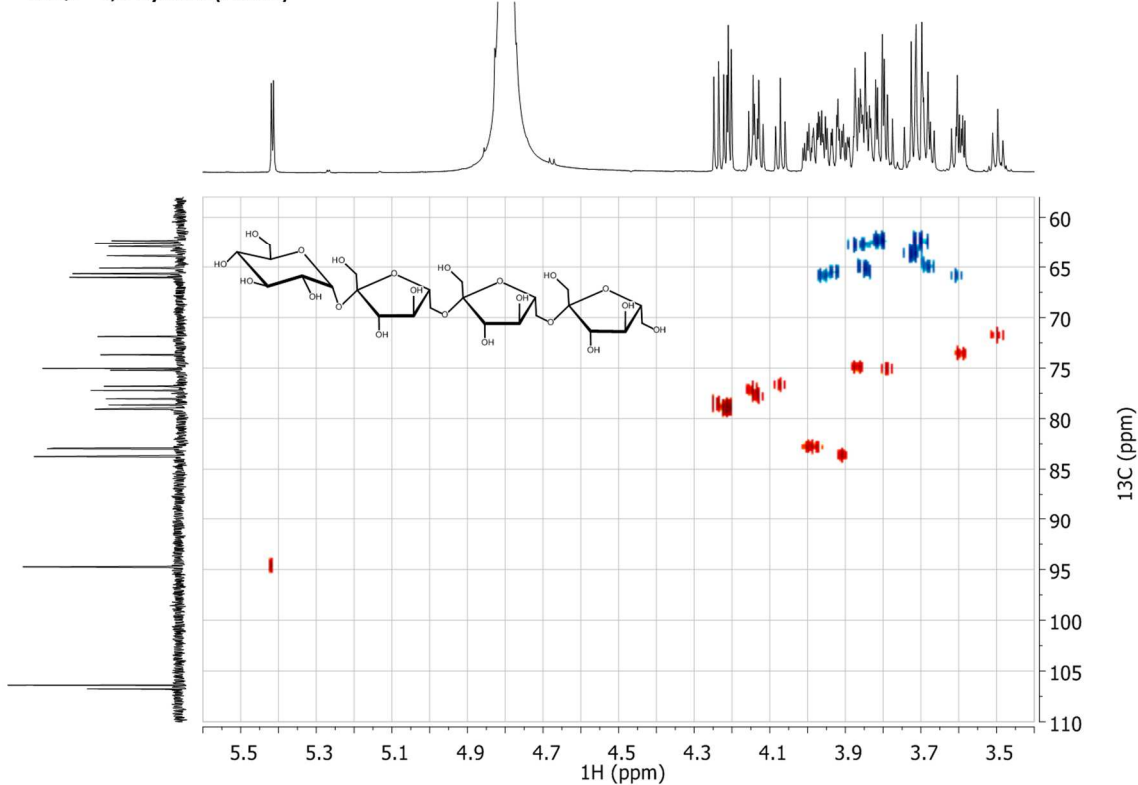
1H – 6,6-Nystose (Peak 2)



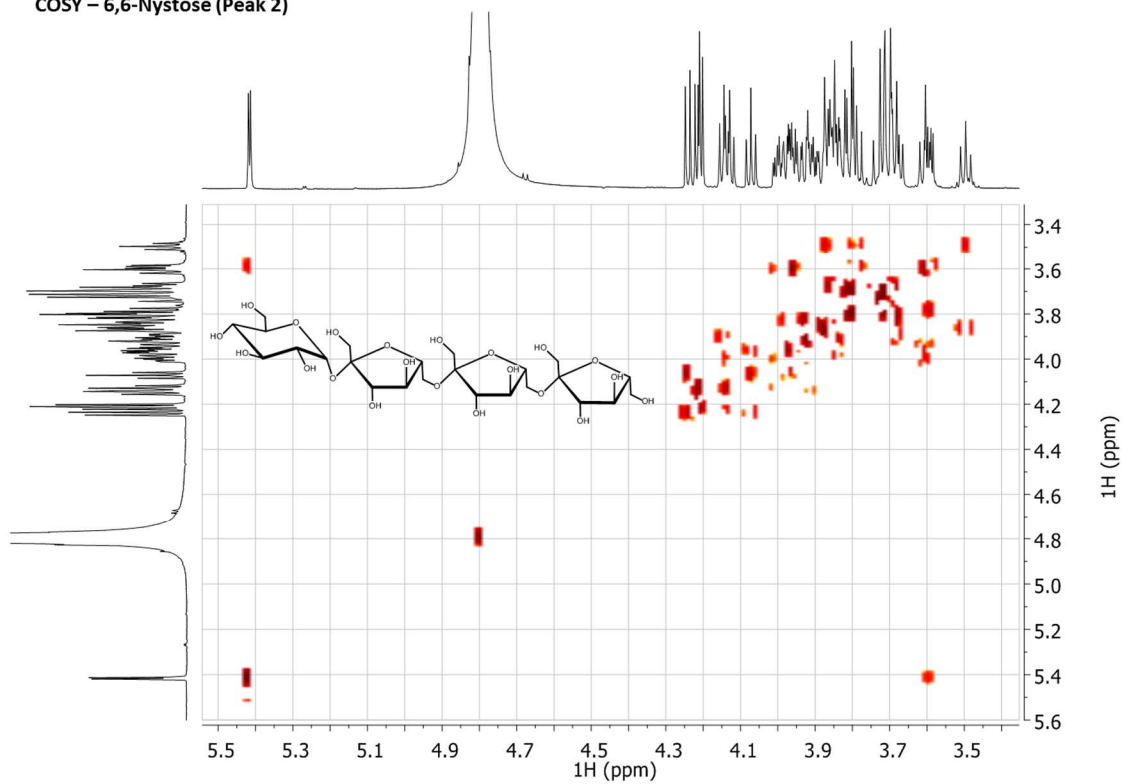
13C – 6,6-Nystose



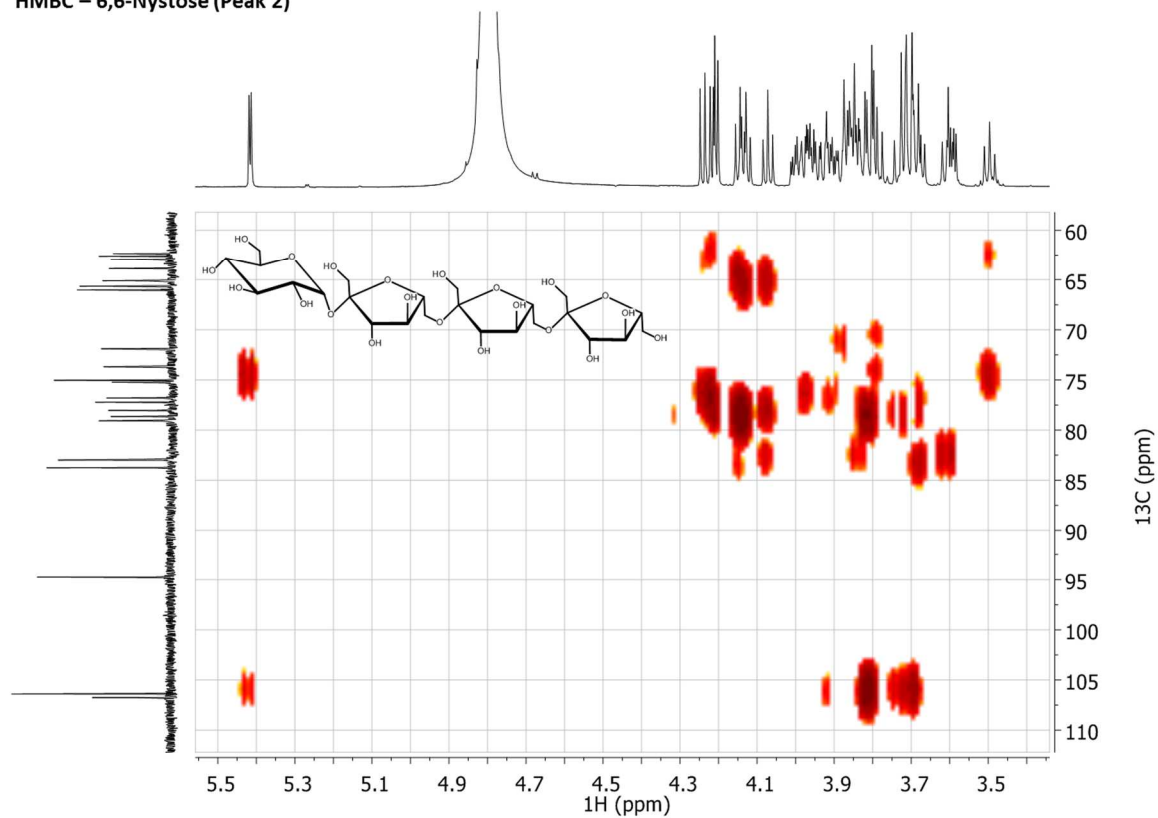
HSQC – 6,6-Nystose (Peak 2)



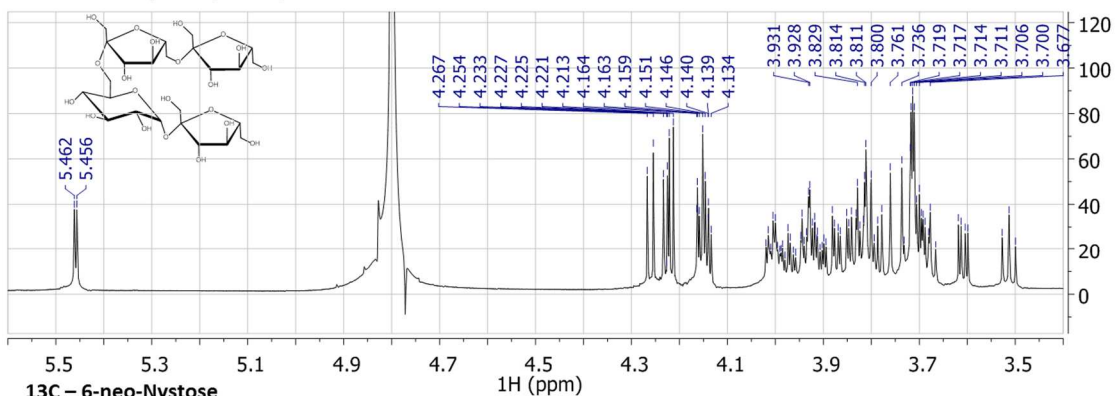
COSY – 6,6-Nystose (Peak 2)



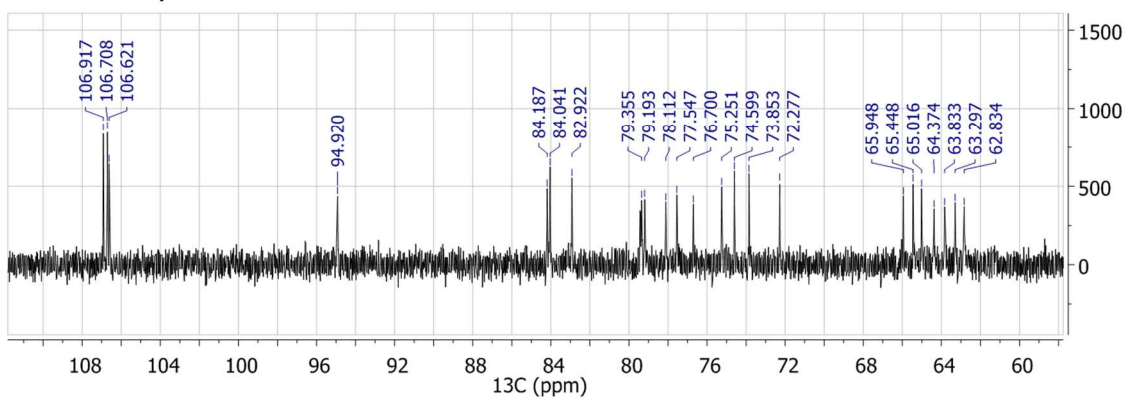
HMBC – 6,6-Nystose (Peak 2)



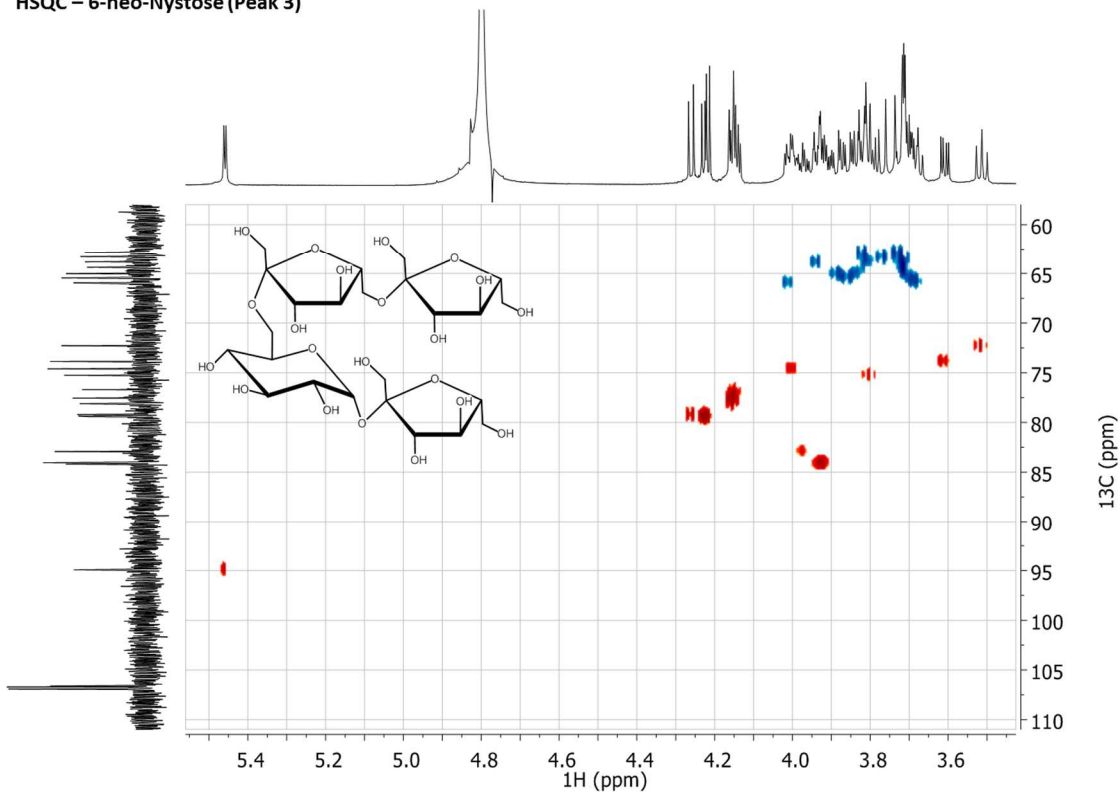
1H – 6-neo-Nystose (Peak 3)



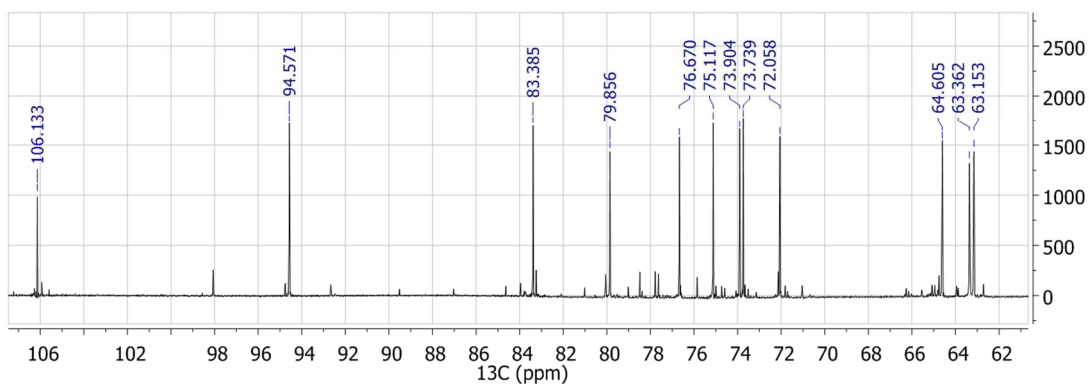
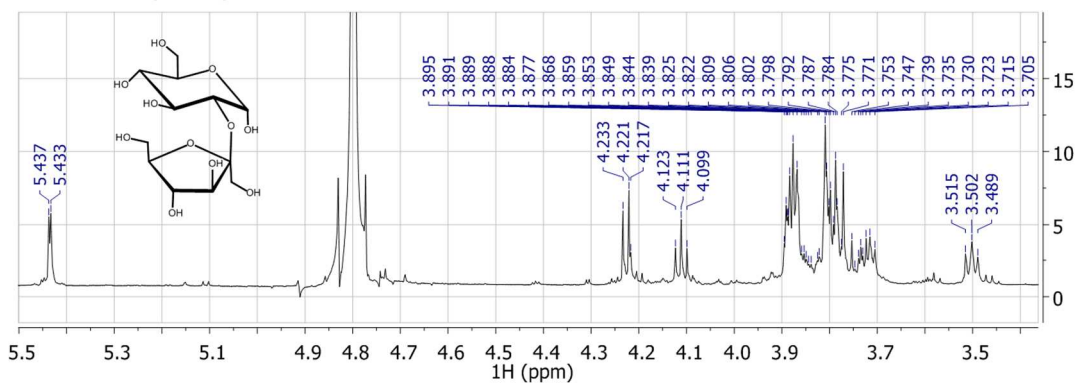
13C – 6-neo-Nystose



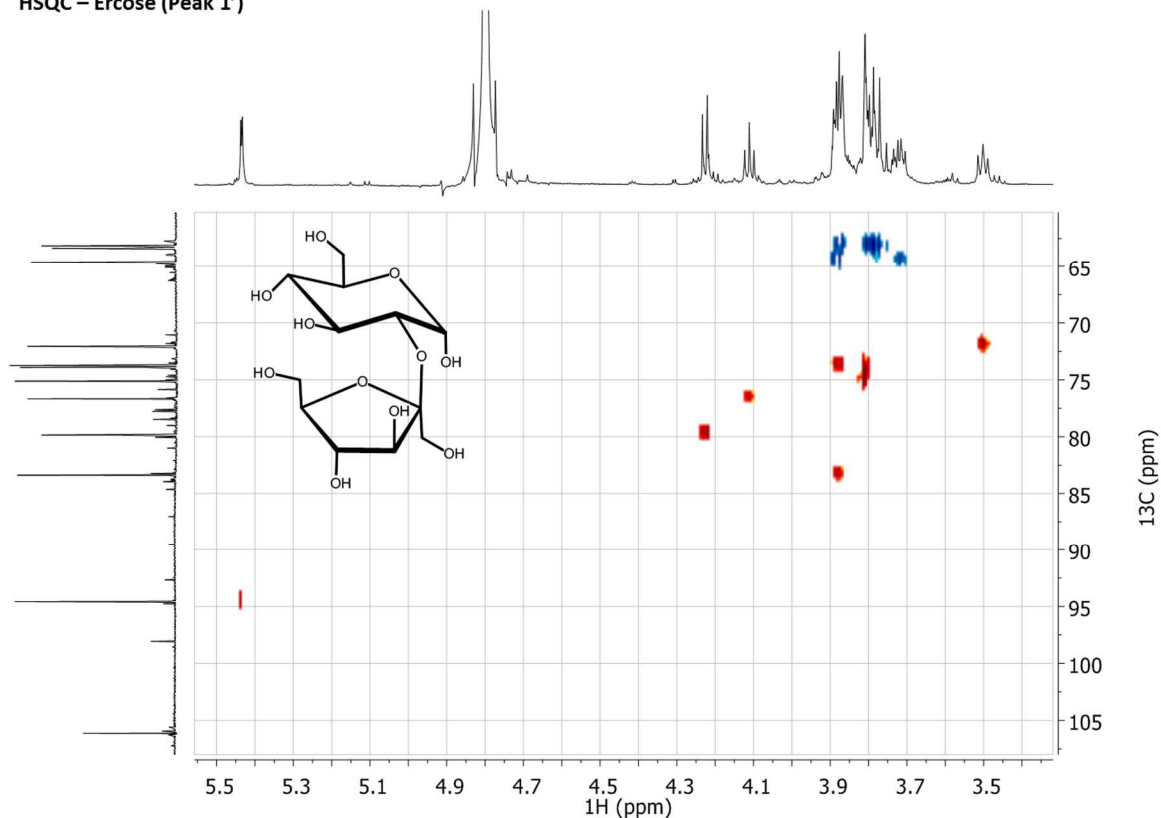
HSQC – 6-neo-Nystose (Peak 3)



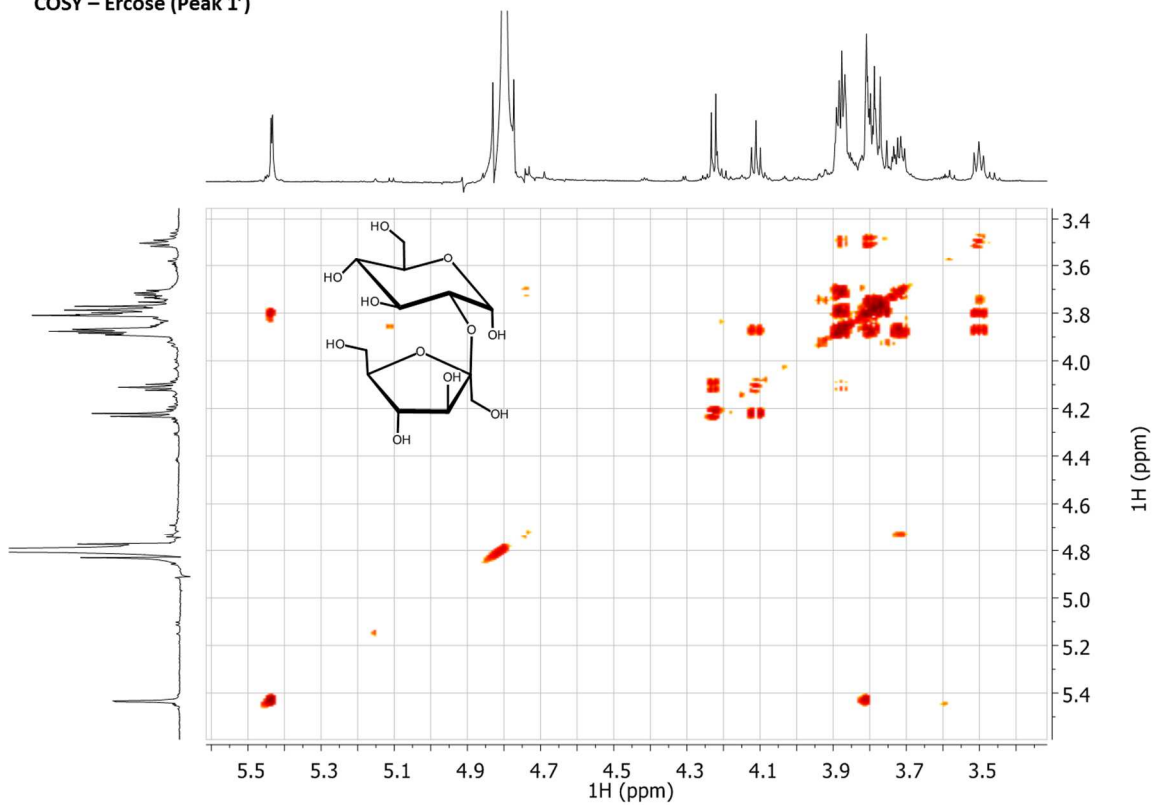
1H – Ercose (Peak 1')



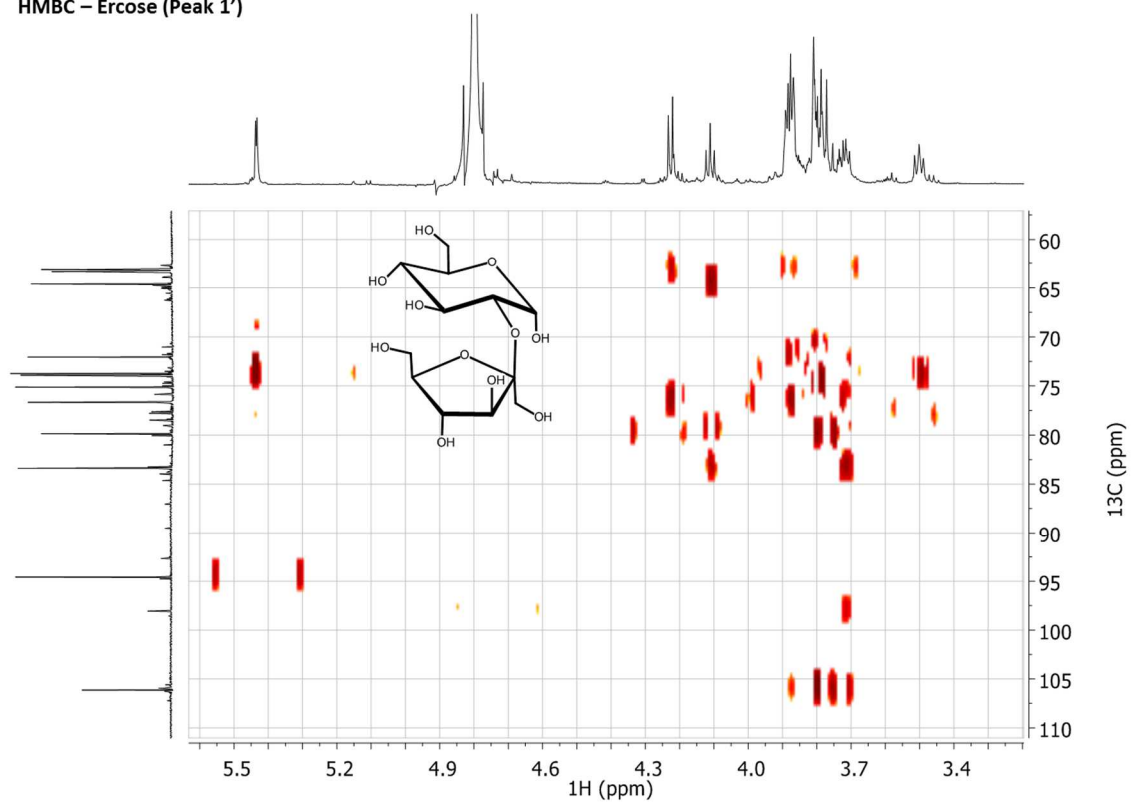
HSQC – Ercose (Peak 1')

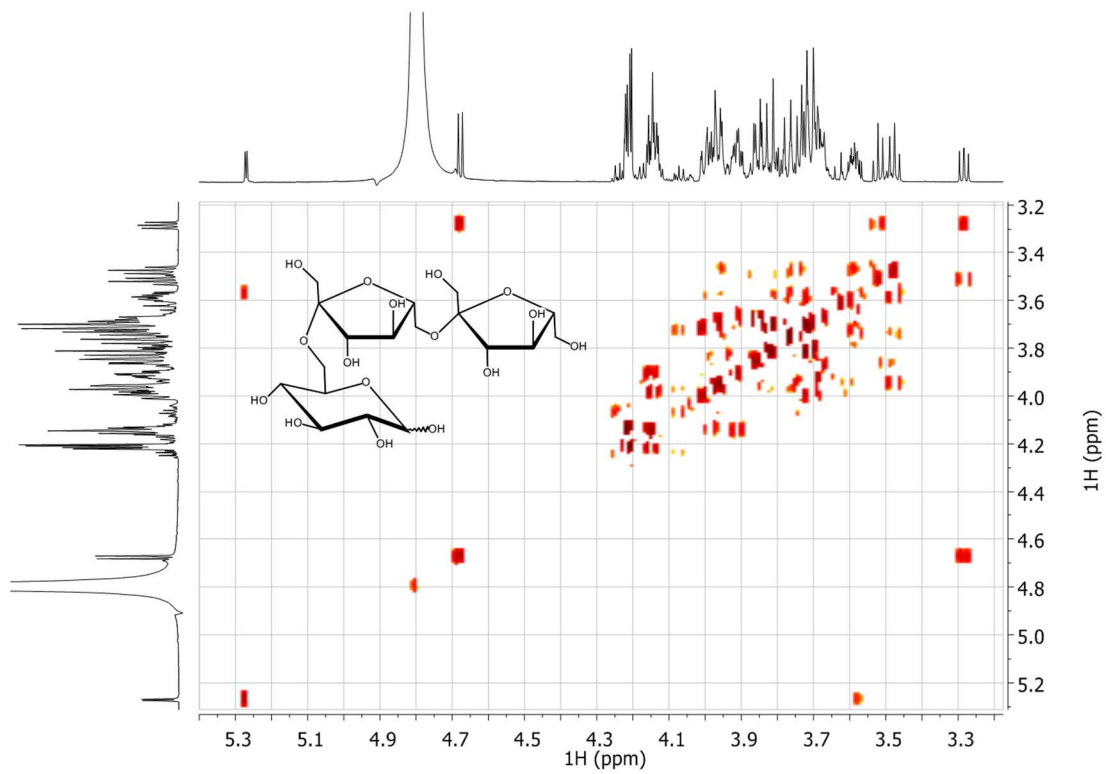
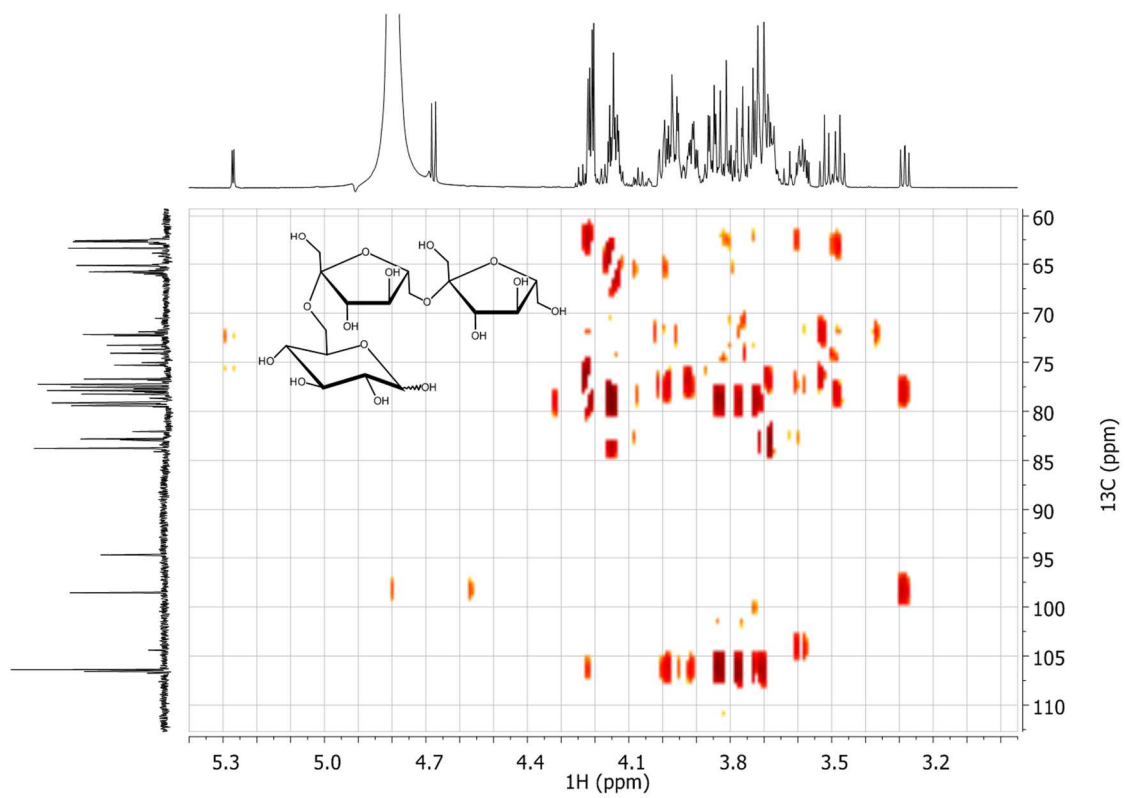


COSY – Ercose (Peak 1')

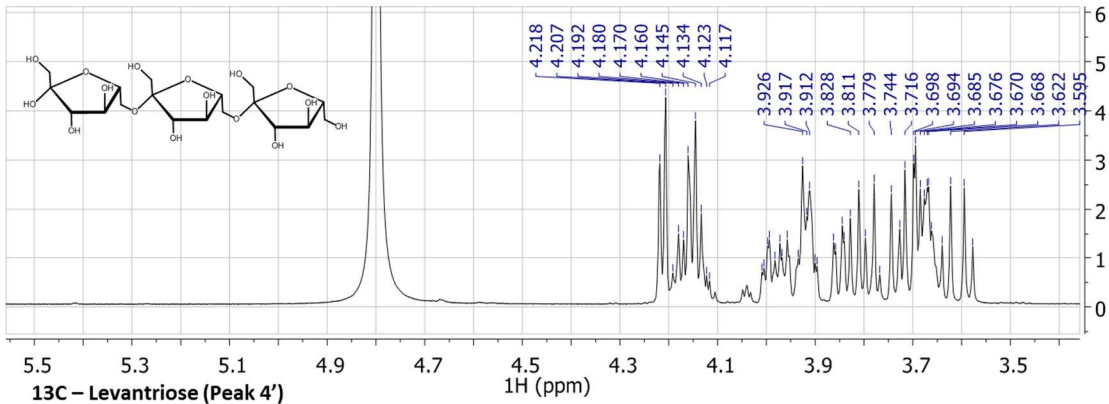


HMBC – Ercose (Peak 1')

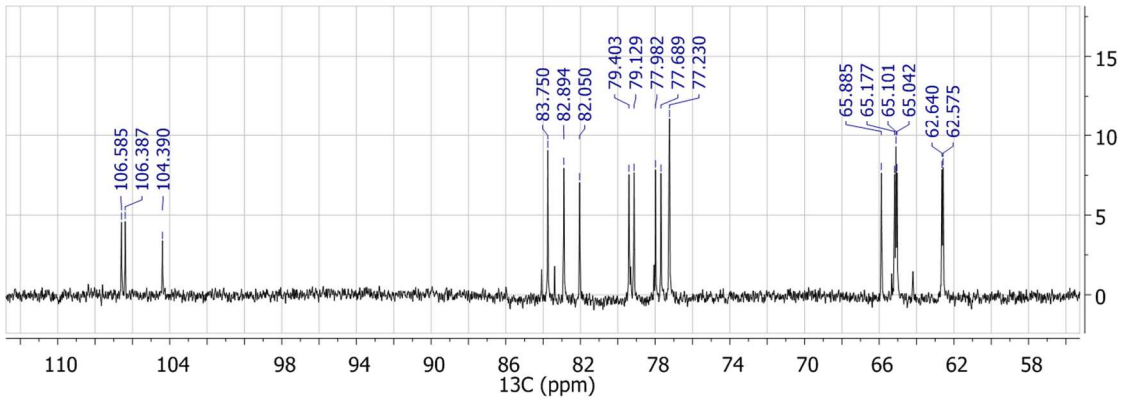


COSY – α/β -Blastotriose (Peak 2')HMBC – α/β -Blastotriose (Peak 2')

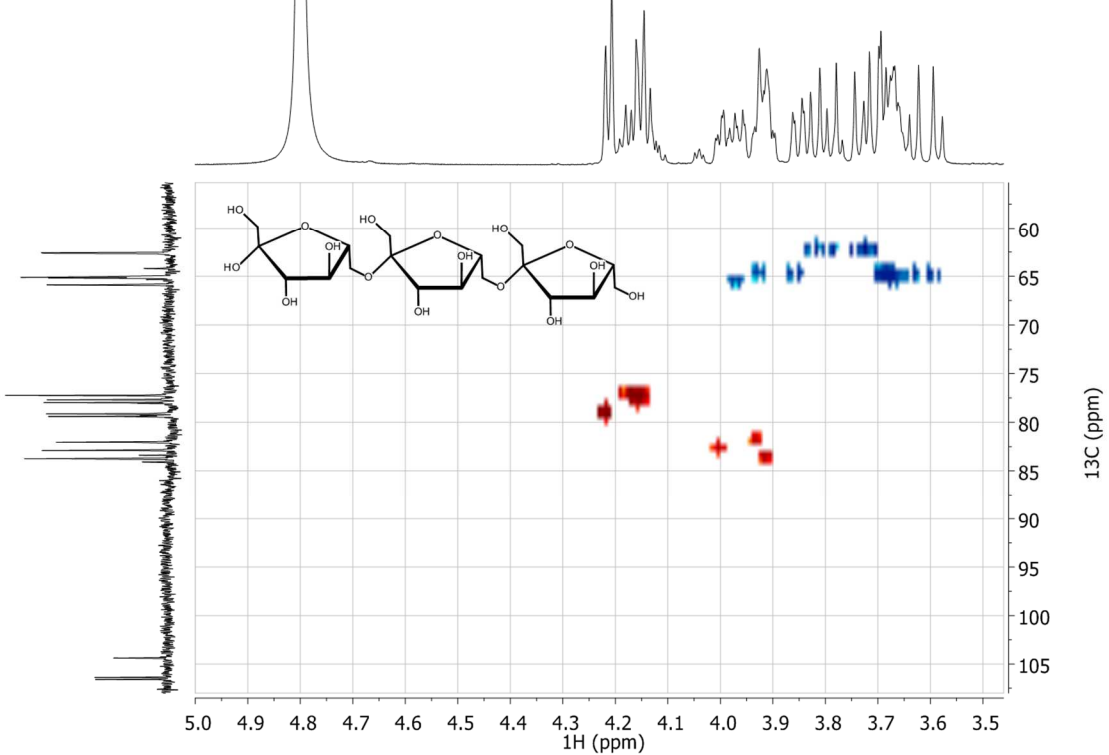
1H – Levantriose (Peak 4')



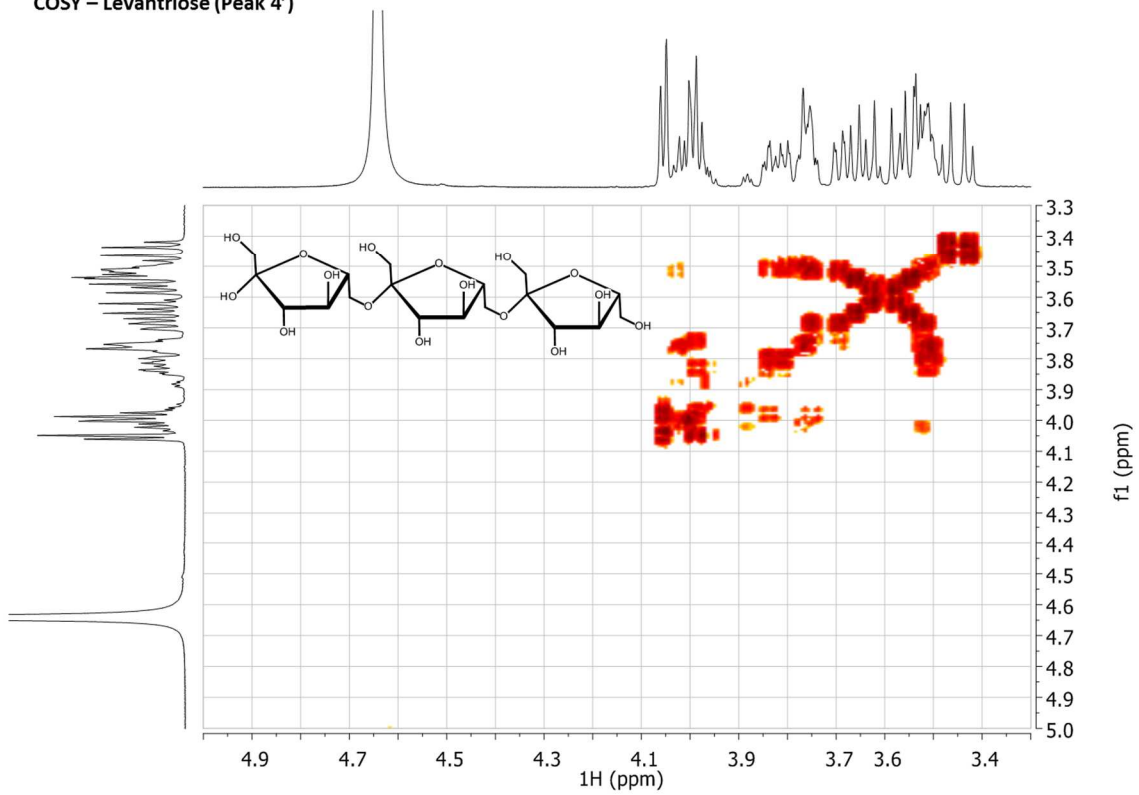
13C – Levantriose (Peak 4')



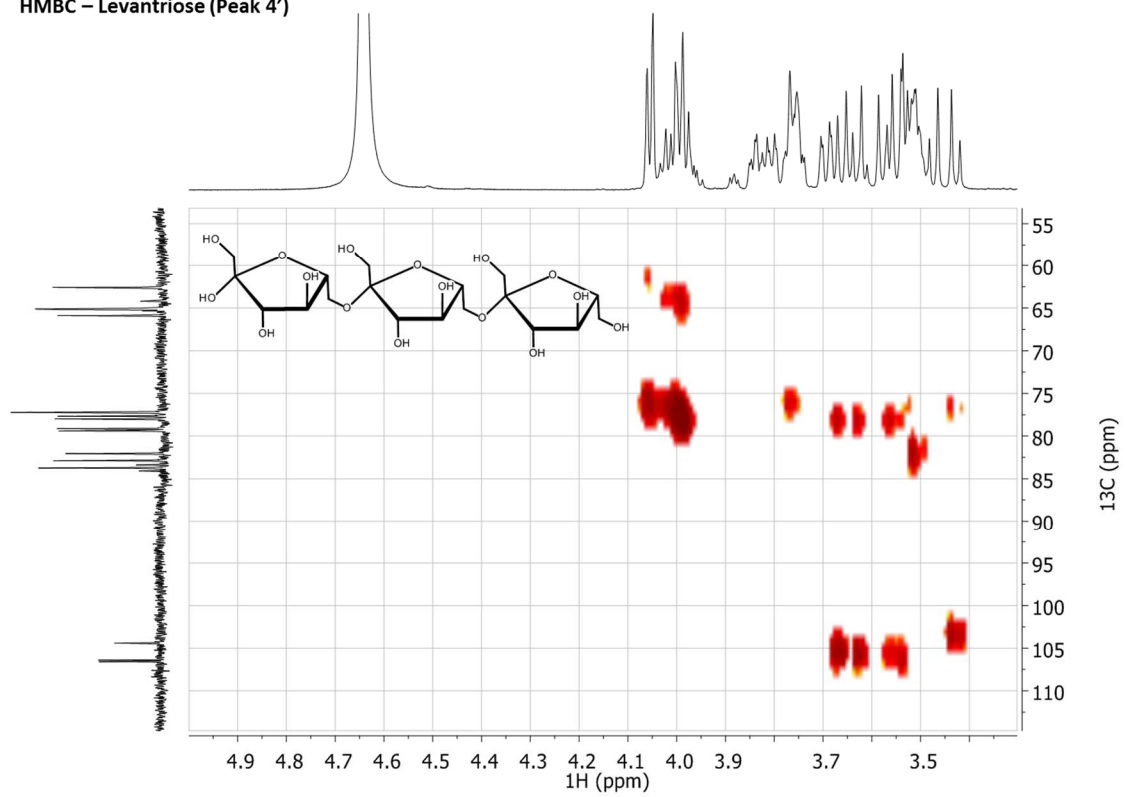
HSQC – Levantriose (Peak 4')



COSY – Levantriose (Peak 4')



HMBC – Levantriose (Peak 4')



Anexo D. Multialineamiento de secuencias de Levansacararas

```

P05655_B.subtilis
KLV33587_B.megaterium
AGZ16261_B.licheniformis
CAB39327_P.polymyxa
AGJ52124_B.amyloliquefaciens
AAB97111_G.stearothermophilus
Q43998_G.diazotrophicus
ACC75109_B.phymatum
F8DT26_Z.mobilis
CCM43846_P.syringae
O54435_R.aquatilis
CAA52972_E.amylovora
AA71925_S.salivarius
ESS15959_S.mutans
AAO14618_L.reuteri
AAI19523_L.mesenteroides
1 MDITVNSQSNTVAPKQAECKKMRYSIRKVVAT.VGA...TSAL.VGTLAFLGATQVKADQV
1 .....METKVRKKMYKKGKFWVVATITAMLTGIGLSSVQADEA
1 .....MEYKEHKKMYKVGKNWAVATLVSASILMGGVVTAHADQV
1 .....MRKKLYKAGKLWVAGAAVRLQSWA..PNIVSADTT
    
```

```

P05655_B.subtilis
KLV33587_B.megaterium
AGZ16261_B.licheniformis
CAB39327_P.polymyxa
AGJ52124_B.amyloliquefaciens
AAB97111_G.stearothermophilus
Q43998_G.diazotrophicus
ACC75109_B.phymatum
F8DT26_Z.mobilis
CCM43846_P.syringae
O54435_R.aquatilis
CAA52972_E.amylovora
AA71925_S.salivarius
ESS15959_S.mutans
AAO14618_L.reuteri
AAI19523_L.mesenteroides
56 TETAPAVATATATPETSTASLTVASETATS VATSEAVESSVAHSEVATKPVTTETQPSNIT
40 NSTQVSSE..LA...ERSQVQEN..TTASSSAAE.....NQAKTEVQETPSTNPA
40 ESNNYNGVAE VENTERQANGQIGVD..GKIISANSN.....TTSGSTNQESSATNNT
34 NSTTTADATTTSSA..T.....ESSISSTESD..DNKVDTSNTDAVTVTTN..SDDS
    
```

```

P05655_B.subtilis
KLV33587_B.megaterium
AGZ16261_B.licheniformis
CAB39327_P.polymyxa
AGJ52124_B.amyloliquefaciens
AAB97111_G.stearothermophilus
Q43998_G.diazotrophicus
ACC75109_B.phymatum
F8DT26_Z.mobilis
CCM43846_P.syringae
O54435_R.aquatilis
CAA52972_E.amylovora
AA71925_S.salivarius
ESS15959_S.mutans
AAO14618_L.reuteri
AAI19523_L.mesenteroides
1 .....MNIKKFAKQAT.....VLTFTTAL.....LAGGAT
1 .....MNIKKIAKQTT.....ALSFATAL.....LVGAGS
1 .....MNIKNIAKKAS.....ALTVAAL.....LAGGAP
1 .....MKFNKWFSSKAA.....TATVATTL.....LLGGGV
1 .....MNIKKIVKRAT.....VLTFTTAL.....LAGGAT
1 .....MNIKKFAKQAT.....VLTFTTAL.....LAGGAT
1 .....MAHVRRK.....VATLNMALAGSLLMLVLAGH
1 .....MNVGHH
116 PSVVEEKA.SSTVVTTSSSDATTPSATVAAV.SAPAHTSE.AAVEAPTSTASSEAADTHTE
83 AATVENTDQTTKVIDT.....NAAVESK.ASK.TKDQ.AATVTKTAASTPEVGQT..N
89 ENAVVNESKNTN.NTE.....NAVVNEN.KNT.NNTE.NAVVNE.NKNTNNTEND..N
80 NSNSAETSNSDAKVTSNNTAQKDEAIKAETTNNQDITSTTAVAEKTKAVNTSESESGSN
    
```

```

P05655_B.subtilis
KLV33587_B.megaterium
AGZ16261_B.licheniformis
CAB39327_P.polymyxa
AGJ52124_B.amyloliquefaciens
AAB97111_G.stearothermophilus
Q43998_G.diazotrophicus
ACC75109_B.phymatum
F8DT26_Z.mobilis
CCM43846_P.syringae
O54435_R.aquatilis
CAA52972_E.amylovora
AA71925_S.salivarius
ESS15959_S.mutans
AAO14618_L.reuteri
AAI19523_L.mesenteroides
26 QA.....FAK.....ETNQKPYK
26 QT.....WAA.....ESNHKDTN
26 QT.....FAK.....ET..QDYK
26 QA.....FAE.....ENDASDLK
26 QA.....FAK.....ENTQKPYK
26 QA.....FAK.....ETNQKPYK
27 SALAQGNFSRQ.EAARMHRPGVMRGGPLFPGRSLAGVP...GFPLPSIHTQ.....
7 PRVP.....RI.TPRLRAHFLSAAVLSAVALPALAQATATP...GFPAPTFSQ.....
1 .....MLNKA.....
1 .....MYN..SNSAVS...QLQNSPLVDN.....
1 .....MTN.....
1 .....MSD.....
173 VDLKVSE...NSAANANL.....SKLNGRIKSIVEENMTSDQIVALTEEEIKALN
131 EKAKATKADITTPKNTIDE.....YGLTEQARKIATEA..GINLSSLTQKQVEALN
135 SQLKLTNN.EQPSAATQANL.....KKLNPQAAKAVQNA..KIDAGSLTDDQINELN
140 EQ.....LAETATDN.....AKVNDAS...SQKQSTPSVEKLLDSDSVSKDLN
    
```


P05655_B.subtilis 39ETYG..ISHITRHDMLQIP..EQ.....QKNEYQVDFEFSSTIKNISS
 KLV33587_B.megaterium 39NNYG..VSHITRHDMLKIP..QQ.....QKSEQFKVPDFDKSTIKNIAS
 AGZ16261_B.licheniformis 37KSYG..FSHITRHDMLKIP..EQ.....QKSEQFKVPDFDKSTIKNIAS
 CAB39327_P.polymyxa 39TDNA..FTQITRNDMLNIF..KQ.....QKSEQFKVPDFDKSTIKNIAS
 AGJ52124_B.amyloliquefaciens 39ETYG..VSHITRHDMLQIP..KQ.....QKSEQFKVPDFDKSTIKNIAS
 AAB97111_G.steartothermophilus 39ETYG..ISHITRHDMLQIP..EQ.....QKNEYQVDFEFSSTIKNISS
 Q43998_G.diazotrophicus 76QAYDPQSDFTARWTRADALQIKAHSDATVAAGQNSLPAQLTMPNIPAD....FPV
 ACC75109_B.phymatum 51QAYDPQSDFTARWTRADALQIKAHSDATVAAGQNSLPAQLTMPNIPAD....FPV
 F8DT26_Z.mobilis 6GIA.....EPLWTRADAMKVHTDD.....PTATMPITIDYD....FPV
 CCM43846_P.syringae 20IKY.....PPTVWRRADALQVNNEND.....PTTTPPLVSDAD....FPV
 O54435_R.aquatilis 4LNY.....TPTLWTRADALQVNNEND.....PTTTPPLVSDAD....FPV
 CAA52972_E.amylovora 4YNY.....KPTLWTRADALQVHEDD.....PTTTPPLVIDIA....FPV
 AA71925_S.salivarius 220 KV..DFSDDAIKGTGTSLYRNLKDLVASFL.....KQDSKLAVPYFKADTIINMPA
 ESS15959_S.mutans 181 KV..KLTSDAQT..GHQMTYQEFDKIAQTLI.....AQDERYATPYFNAKAIKNMKA
 AA014618_L.reuteri 184 KI..NFSKSAEK..GAKLTFKDLLEGIGNAIV.....KQDPQYATPYFNAKAIKNMKA
 AAY19523_L.mesenteroides 178 SKTTVVTKNADGTSNTMNTYANLKDVAADNIA.....SLNDPDTSPYFNADAIKNLP

P05655_B.subtilis 79 AKG.....LDVWDSWPLQNA.DGTVANYHGYHIVFALLAGDPKN.....
 KLV33587_B.megaterium 79 AKGY.DKSGNLDLDVWDSWPLQNA.DGTVANYHGYQVVFALLAGDPKD.....
 AGZ16261_B.licheniformis 77 AKGY.NKNGELIDLVDVWDSWPLQNA.DGTVATYHGYNLVVFALLAGDPKD.....
 CAB39327_P.polymyxa 79 AMGR.DSSGKLDLDVWDSWPLQNA.DGTVANYKGYNIVFGLAGDPKR.....
 AGJ52124_B.amyloliquefaciens 79 AKG.....LDVWDSWPLQNA.DGTVAEYNGYHVVFFALLAGSPKD.....
 AAB97111_G.steartothermophilus 79 AKG.....LDVWDSWPLQNA.DGTVANYHGYHIVFALLAGDPKN.....
 Q43998_G.diazotrophicus 127INPDVWVWDTWTPLIDK.HADQFVSYNGWVIFCLTADPNA.....
 ACC75109_B.phymatum 102INPNVWVWDTWTPLIADM.RANQALAYKGWVIFSLTADPHA.....
 F8DT26_Z.mobilis 40MTDKYVWVWDTWTPLIRI.NGQVVSFGWVSVIFALLVADRT.....
 CCM43846_P.syringae 58MSDVFVWDTWTPLIREL.DGTVVSVDGWVSVIFALLVADRT.....
 O54435_R.aquatilis 34MSDEVFVWDTWTPLIREL.DGTVVSVDGWVSVIFALLVADRT.....
 CAA52972_E.amylovora 38MSEEVFVWDTWTPLIRDF.DGEIISVNGWVSVIFALLVADRT.....
 AA71925_S.salivarius 270 FNTVDAQTMKKEEIDVWDSWPLQNA.DGTVAEYNGYHVVFFALLAGSPKN.....
 ESS15959_S.mutans 229 ATTRDAQTIGQIADLDVWDSWPLQNA.DGTVAEYNGYHVVFFALLAGSPKN.....
 AA014618_L.reuteri 232 TTVTDAQTIGKMAHLVDVWDSWPLQNA.DGTVAEYNGYHVVFFALLAGSPKN.....
 AAY19523_L.mesenteroides 230 MTTADAQTGQIQDLDVWDSWPLQNA.DGTVAEYNGYHVVFFALLAGSPKN.....

P05655_B.subtilis 116ADDTSIYMFYQKVGSETS....IDSWKNAQGRVFKDSDKFPANDSILKQDTQ
 KLV33587_B.megaterium 125ADDTSIYMFYQKIGEDS....IDSWKNAQGRVFKDSDKFPVNDPPLHKQDTQ
 AGZ16261_B.licheniformis 123VDDTSIYLFYQKIGETS....IDSWKNAQGRVFKDSDKFPVNDPPLHKQDTQ
 CAB39327_P.polymyxa 125GEDTFIYLFYQKIGETS....IDSWKNAQGRVFKDSDKFPVNDPPLHKQDTQ
 AGJ52124_B.amyloliquefaciens 116ADDTSIYMFYQKVGDNSS....IDSWKNAQGRVFKDSDKFPVNDPPLHKQDTQ
 AAB97111_G.steartothermophilus 116ADDTSIYMFYQKVGSETS....IDSWKNAQGRVFKDSDKFPVNDPPLHKQDTQ
 Q43998_G.diazotrophicus 165GYGFDDRRHVHARIGFFYRRAGIPASRRPVNGGWTCGHLLFPDGASVQVYAGOTYTNOA
 ACC75109_B.phymatum 140GYTFDDRRHVHARIGFFYRRAGIPASRRPVNGGWTCGHLLFPDGASVQVYAGOTYTNOA
 F8DT26_Z.mobilis 77KYGWHRNRDNGARIGYFYSRGG.....SNWIFGHLKDGANPR....SW
 CCM43846_P.syringae 104 DIKRDWEDRRHGARRMCMYYSRTG.....KDWIFGGRVMAEGVSPPT....TR
 O54435_R.aquatilis 88 DITSDWNNRRHGARRMCMYYSRTG.....KDWIFGGRVMAEGVSPPT....TR
 CAA52972_E.amylovora 88 DITRDWEDRRHGARRMCMYYSRTG.....KDWIFGGRVMAEGVSPPT....TR
 AA71925_S.salivarius 318NSNHLYLLRKYKGDND....FTHWKNAGPFIIFYNALE....DDQ
 ESS15959_S.mutans 277DNHLYLLRKYKGDND....FTHWKNAGPFIIFYNALE....DDQ
 AA014618_L.reuteri 280PTGDNHLYLLRKYKGDND....FTHWKNAGPFIIFYNALE....DDQ
 AAY19523_L.mesenteroides 278DNQHLIYMLYKYGDTA....LNNWKNAGPFIIFYNALE....DDQ

P05655_B.subtilis 162 EWSGSATFT...SDGKIRLFYVDF....SGKH...YGKQTLTTAQVNVASD.SSLNINING
 KLV33587_B.megaterium 171 EWSGSATLT...SDGKIRLFYVDF....SGTN...YGKQTLTTAQVNVASD.SSLNINING
 AGZ16261_B.licheniformis 169 EWSGSATLT...KDGKIRLFYVDF....SGTQ...YGKQTLTTAQVNVASD.SSLNINING
 CAB39327_P.polymyxa 171 EWSGSATLT...SDGQVRLFYVDF....SGKH...YGKQTLTTAQVNVASD.SSLNINING
 AGJ52124_B.amyloliquefaciens 162 EWSGSATLT...SDGKIRLFYVDF....SGKH...YGKQTLTTAQVNVASD.SSLNINING
 AAB97111_G.steartothermophilus 162 EWSGSATFT...SDGKIRLFYVDF....SGKH...YGKQTLTTAQVNVASD.SSLNINING
 Q43998_G.diazotrophicus 223 EWSGSRLMQIHGNTVSVVYDVAFNRDANANNITPPQAIITQTLGRHADFHNWVFTG
 ACC75109_B.phymatum 198 EWSGSARLT...HGDNVSLEYVATSFNRSAPGGADITPPQAIITQTLGRHADFHNWVFTG
 F8DT26_Z.mobilis 117 EWSGCTIMAPGTANSVVFVTSVN....DTPSESVPAQCKGYIYADDKSVWVFDG
 CCM43846_P.syringae 146 EWAGTPIILLNDK.GDIDLYYTCVPT....P...GATIAKVRGRVLTSEEGVTLAG
 O54435_R.aquatilis 130 EWAGTPIILLNDK.GDIDLYYTCVPT....P...GATIAKVRGRVLTSEEGVTLAG
 CAA52972_E.amylovora 130 EWAGTPIILLNDK.GDIDLYYTCVPT....P...GATIAKVRGRVLTSEEGVTLAG
 AA71925_S.salivarius 354 QWSGSATVN...SDGSIQLFYVKNNDT...SGGK...LNWQLASATLNLAVEN.DEVVYKS
 ESS15959_S.mutans 313 EWSGSATVN...EDGSIQLFYVKNVD...SDKN...SNQRLATATLNLVDD.QDVRILS
 AA014618_L.reuteri 318 EWSGSATVN...DDGSIQLFYVKNVD...SDYK...LNDQRLATATLNLVDD.NGVYIKS
 AAY19523_L.mesenteroides 315 QWSGSATVN...DDDSIQLFYVKNVD...SDYK...LNDQRLATATLNLVDD.NGVYIKS

P05655_B.subtilis 211 VEDYKSIFF.DG.DGKTYQNVQVDFIDE.....GNYSSGDNHTRDPHYVE.D.KGHK
 KLV33587_B.megaterium 221 VEDHKSIF.DG.DGKTYQNVQVDFIDE.....GAYGSGDNHTRDPHYVE.D.KGHK
 AGZ16261_B.licheniformis 219 VEDHKSIF.DG.DGKTYQNVQVDFIDE.....GNYSSGDNHTRDPHYVE.D.KGHK
 CAB39327_P.polymyxa 226 VEDLKSIF.DG.DGKTYQNVQVDFIDE.....DMDNHTFTRDPHYVE.D.KGHK
 AGJ52124_B.amyloliquefaciens 211 VEDHKTIF.DG.DGKTYQNVQVDFIDE.....GNYSSGDNHTRDPHYVE.D.KGHK
 AAB97111_G.steartothermophilus 211 VEDYKSIFF.DG.DGKTYQNVQVDFIDE.....GNYSSGDNHTRDPHYVE.D.KGHK
 Q43998_G.diazotrophicus 282 FTAHTPLL...QPDGVLVYQNGAQN.....EFFNTRDPHYVE.D.KGHK
 ACC75109_B.phymatum 256 FDDHQAALL...KPDGTYVYQNGAQN.....TYFVTRDPHYVE.D.KGHK
 F8DT26_Z.mobilis 167 FDKVTDLF...EADGTYVYQNGAQN.....NFWDTRDPHYVE.D.KGHK
 CCM43846_P.syringae 192 FTQVKKLF...EADGTYVYQNGAQN.....SSWTRDPHYVE.D.KGHK
 O54435_R.aquatilis 176 FNEVKSIF...EADGTYVYQNGAQN.....PYWTRDPHYVE.D.KGHK
 CAA52972_E.amylovora 176 FQQVTSIF...EADGTYVYQNGAQN.....AFWTRDPHYVE.D.KGHK
 AA71925_S.salivarius 405 VENDHILF...GDNHYVYQNGAQN...FMSTFDDHNDGPNDRDNYCIRDPHYVE.D.KGHK
 ESS15959_S.mutans 364 VENDKVLTP...GEGYVYQNGAQN...WRSTF.T.....GADNIAMTRDPHYVE.D.KGHK
 AA014618_L.reuteri 369 VDNVQLF...EADGTYVYQNGAQN...FANGKDR.....ENDDYCIRDPHYVE.D.KGHK
 AAY19523_L.mesenteroides 363 VNDHVLFF...AG.DGTYVYQNGAQN...QVDA.....GYTTGDNTRDPHYVE.D.KGHK

P05655_B.subtilis	258	YLVFEANTGTEGGYQGEESLNFNKAYY	GKS.TSFFRQESQKLLQSDKK.RTAE	LANGALGM
KLV33587_B.megaterium	268	YLVFEANTGTEGGYQGEDSLNFRAYY	GN.NPFFQSEKELKLLQSSNK.KKAS	LANGALGI
AGZ16261_B.licheniformis	267	YLVFEANTGTTKGYQGEDSLNFRAYY	GGS.KKFFKEESSKLLQGAN.KNAS	LANGALGI
CAB39327_P.polymyxa	270	YLVFEANTGTEGGYQGEDSIQNPAYY	GN.KKFFTEEQNLLQSPKK.KGAE	LANGALGI
AGJ52124_B.amyloliquefaciens	258	YLVFEANTGTEGGYQGEESLNFNKAYY	GGS.TNFFRKESQKLLQSAKK.RD	LANGALGM
AAB97111_G.stearothermophilus	258	YLVFEANTGTEGGYQGEESLNFNKAYY	GKS.TSFFRQESQKLLQSDKN.RT	LANGALGM
Q43998_G.diazotrophicus	323	YLVFEANTAGQRGVANCTE...ADL	GFRPNPNAETLQEVLL...DSC	AYYQKANG
ACC75109_B.phymatum	297	YLVFEANTGGPRGARTCE...ADL	GYPNDPQREDLNAV...NS	GAAYQKANG
F8DT26_Z.mobilis	207	YLVFEANTGTVAVGE...BEI	GPVPPKT.ET...PD	GARYCAA
CCM43846_P.syringae	232	YLVFEANTGSHVGV...AEL	GPVPPGH.ED...VGA	RFQVGC
O54435_R.aquatilis	216	YLVFEANTGSHVIGK...QEM	GLPPGH.RD...VGN	ARYQAG
CAA52972_E.amylovora	216	YLVFEANTGSHVIGK...AEM	GNVPPGY.ED...VGA	AYYQKANG
AA71925_S.salivarius	460	YLVFEANTGDE.NYQGEKQIYKWSNY	GD.DAFNLKSLFNIVNKHLYNL	ASWANGS
ESS15959_S.mutans	412	YLVFEANTGTE.NYQGEDQIYNFTNY	GGS.SAYNVKSLFRFLDDQDMY	NRASWANAA
AAO14618_L.reuteri	416	YLVFEANTGTE.DYQSDQDIYNWANY	GD.DAFNIKSFKLLNKKDREL	AGLANGAL
AA19523_L.mesenteroides	410	YLVFEANTGTN.NYQSDDAVNDDTY	GGT.EEFNQAKVDTLQNPDKL	KLSKKNANG

P05655_B.subtilis	316	TELND...YTLKKVMPDLIASNTVT	DEITERANVFKMNGKWLFTD	SRGSKMTIDG...
KLV33587_B.megaterium	326	VELNND...YTLKKVMPDLIASNTVT	DEITERANVFKKDKWLFTD	SRGSKMTIDG...
AGZ16261_B.licheniformis	325	IELNND...YTLKKVMPDLIASNTVT	DEITERANVFKMNGKWLFTD	SRGSKMTIDG...
CAB39327_P.polymyxa	326	VELNND...YTLKKVMPDLIASNLVT	DEITERANVFKMNGLWYLF	TRGSKVTVDA...
AGJ52124_B.amyloliquefaciens	316	IELNND...YTLKKVMPDLIASNTVT	DEITERANVFKMNGKWLFTD	SRGSKMTIDG...
AAB97111_G.stearothermophilus	316	IELNDD...YTLKKVMPDLIASNTVT	DEITERANVFKMNGKWLST	SRGSKMTIDG...
Q43998_G.diazotrophicus	374	AIATDST...LSKWKFLSPLISANC	VNDQTERPQVYLHNKGYLFT	ISHRITFAAG...
ACC75109_B.phymatum	348	AVATNPQ...LLEWKFPLSANC	VNDQTERPQVYLHNKGYLFT	ISHRITFAAG...
F8DT26_Z.mobilis	251	AQALNEA...RTEWKLPLVAFGVND	QTERPHVVFQNGLYLFT	ISHSITYADG...
CCM43846_P.syringae	276	AVAKDLS...GEWEILPLVAVGVND	QTERPHVVFQNGKYLFT	ISHKFTYADG...
O54435_R.aquatilis	260	AVAKDLS...GDEWEILPLVAVGVND	QTERPHVVFQNGKYLFT	ISHKFTYADG...
CAA52972_E.amylovora	260	AVAKDLS...GSEWQILPLVAVGVND	QTERPHVVFQNGKYLFT	ISHKFTYADG...
AA71925_S.salivarius	518	LKLLDDNEKNPVAELYLPLVST	HMTDEVERPSVVKMGKYLFT	ASRNKSTDAEGTVA
ESS15959_S.mutans	470	LKLLKDKKTPVEDQFYPLVST	MTVSEDELRPNVVKLGDKYLFT	ASRNKSTDAEGTVA
AAO14618_L.reuteri	474	LKLLTNNQSKPKVEEYVSP	LVSTLMSDEVERPNVVKLGD	KYLFTSVTRVSRGSDRELTAK
AA19523_L.mesenteroides	468	LKLLTKDQNNPTVAQVYSP	LLAANGITDEITERANV	VPLNGKYLFTDTRLSKSVVPT...

P05655_B.subtilis	369	..IT.SNDIYMLGYVSN.SLTF	GPYKPPN.KTGLVLKMDLDPNDVT
KLV33587_B.megaterium	379	..IG.QDDVYMLGYVSN.TLTF	GKYKPPN.DTGLVLHMDLDPNDKT
AGZ16261_B.licheniformis	378	..IG.SKDIYMLGYVSG.SLTF	GFKPPN.KSGLVLHMDQDYNDIT
CAB39327_P.polymyxa	381	..IG.DDDIYMLGYVST.SLTF	GPYKPPN.GTGLVLHQDLDRDDVT
AGJ52124_B.amyloliquefaciens	369	..IN.SNDIYMLGYVSN.SLTF	GPYKPPN.KTGLVLQMGDLPNDVT
AAB97111_G.stearothermophilus	369	..IT.SNDIYMLGYVSN.SLTF	GPYKPPN.KTGLVLKMDLDPNDVT
Q43998_G.diazotrophicus	427	...VDPGPDGVYGFVGD.GIRSD	FOPMNYGSGLTMGNPTDLN	TAAAGTDFDPSDQNPRAF
ACC75109_B.phymatum	401	...VDPGPDGVYGFVGN.GIRSD	FLPNNGSGGLVGNPTDF	SAPAGAPYAQDPNQPREF
F8DT26_Z.mobilis	304	...LSGPDGVYGFVSENGIF	GPYKPPN.GSGLVLGNPSSQPY
CCM43846_P.syringae	329	...VTPGPDGVYGFVGE.HLFG	PYRPPN.ASGLVLGNPPEQPF
O54435_R.aquatilis	313	...LTGPDGVYGFVLS.DNLTF	GPYKPPN.GSGLVLGNPSSQPF
CAA52972_E.amylovora	313	...LTGPDGVYGFVSD.KLTF	GPYKPPN.SSGLVLGNPSSQPF
AA71925_S.salivarius	578	AREAVGDDVYMLGYVSD.SLRF	GKYPN.NSGVVLTA	SVVPAD...WRT
ESS15959_S.mutans	530	ANEVVGDDVYMLGYVSD.QLT	NGYKPPN.NSGVVLTA	SVVPAD...WRT
AAO14618_L.reuteri	534	DNTIVGDDVYMLGYVSD.SLM	GKYPN.NSGVVLTA	SVVPAN...WRT
AA19523_L.mesenteroides	524	..ADFNINVMGYVSD.SLTF	GPYKPPN.GSGSVV	TGTQLFT.....SRT

P05655_B.subtilis	409	FTYSHFAVPA.KGNVVITSYMTNR	GFYA...DKQSTFAP	SFLNLIKGGKTS.VV...
KLV33587_B.megaterium	419	FTYSHFAVPA.KGNVVITSYMTNR	GFYS...EHSSTFAP	SFLNLIKGGKTS.VV...
AGZ16261_B.licheniformis	418	FTYSHFAVPA.KGDEVVITSYMTNR	GISN...EHSSTFAP	SFLNLIKGGKTS.VV...
CAB39327_P.polymyxa	421	WTYAHFAVPA.KGNVVITSYMTNR	GLFP...DHKSTFAP	SFLNLIKGGKTS.VV...
AGJ52124_B.amyloliquefaciens	409	FTYSHFAVPA.KGNVVITSYMTNR	GFFE...DKKATFAP	SFLNLIKGGKTS.VV...
AAB97111_G.stearothermophilus	409	FTYSHFAVPA.KGNVVITSYMTNR	GFYA...DKQSTFAP	SFLNLIKGGKTS.VV...
Q43998_G.diazotrophicus	482	QSYSHYVMPG...LVESFIDTVE	...NRRGCTLAP	VVRVRIQNASAVDLRYG
ACC75109_B.phymatum	456	QSYSHYVMPG...LVESFIDAIG	...SRRGCTLAP	VKININNGDITVDRITYG
F8DT26_Z.mobilis	342	QYSHYVMTNG...LVTSPIDTIP	SSDPNRYRGGT	LAPVILKLVGRHSFVTEVKG
CCM43846_P.syringae	366	QYSHYVMTNG...LVTSPIDSV	PTTGE.DYRIGG	TEAPVIRILKLVGRHSFVTEVKG
O54435_R.aquatilis	350	QYSHYVMTNG...LVTSPIDN	VPVSDG.NYRIGG	TEAPVIRILKLVGRHSFVTEVKG
CAA52972_E.amylovora	350	QYSHYVMTNG...LVTSPIDSV	VPWKGK.DYRIGG	TEAPVIRILKLVGRHSFVTEVKG
AA71925_S.salivarius	621	STYSYAVPVEGSSDITLMTAYM	TNRGGIAG.AENKST	WAPFLIKMNAADDTT.EV...
ESS15959_S.mutans	573	ATYSYAVPVAGSSDITLMTAYM	TNRNEVAG.KGKNS	WAPFLIQVLEDDTT.KV...
AAO14618_L.reuteri	577	ATYSYAVPVAGHPDQVLTISYM	NKDFASG.EGNYA	WAPFLVQINDDTT.TV...
AA19523_L.mesenteroides	565	DYSYAVPVAGRSDDLVTISYM	NRNEKAG.TGMNA	WAPFLIQISADGMSTKV...

P05655_B.subtilis	460	KDSILEQGQLTVNK.....			
KLV33587_B.megaterium	470	KNSILPQGQLSTDK.....			
AGZ16261_B.licheniformis	469	KNSILEQGQLTVNK.....			
CAB39327_P.polymyxa	472	KNGILEQGQITVDP	TNDKESPNYEGK.....		
AGJ52124_B.amyloliquefaciens	460	KNSILEQGQITAVNQ.....			
AAB97111_G.stearothermophilus	460	KASILDQGQLTVNQ.....			
Q43998_G.diazotrophicus	530	NGGLGGYDIPANRADVNI	AGFIO.....DLFGQPT	SGLAAQASTNNAQVLAQVRQ	
ACC75109_B.phymatum	504	KGGLGGYDIPANQ	SAPGNGNQ.....GGN.....	SQ.....	
F8DT26_Z.mobilis	396	YGYIPPOQIEWLA	EDSSNSAAALS.....LL.NK.....		
CCM43846_P.syringae	419	YGYIPAMKDVQLS.....			
O54435_R.aquatilis	403	YGYIPPMKNIILN.....			
CAA52972_E.amylovora	403	YGYIPAMKIDITL.....			
AA71925_S.salivarius	675	LPKMTNQGDWIWDKSS	ESLTVHVGDO.....NSAKLP	NEEDF.NVD.....	
ESS15959_S.mutans	627	LAEMTQGDWIWDESS	RTDVTGTL.....DTAYL	PGENDYID.....	
AAO14618_L.reuteri	631	LARATNQGDWVWD	SSRNNDMLGLKEGAANS	AALPGEWGPVD.....	
AA19523_L.mesenteroides	620	LDTVLAQGTWTYD	GKSASVEE..LVGNK..	ATSELTDMKIGVWDN	KFYVDNELANGVYD

```

P05655 B. subtilis .....
KLV33587 B. megaterium .....
AGZ16261 B. licheniformis .....
CAB39327 P. polymyxa .....
AGJ52124 B. amyloliquefaciens .....
AAB97111 G. stearothermophilus .....
Q43998 G. diazotrophicus 581 FLNQ.....
ACC75109 B. phymatum .....
F8DT26 Z. mobilis .....
CCM43846 P. syringae .....
O54435 R. aquatilis .....
CAA52972 E. amylovora .....
AA71925 S. salivarius 713 .....YYAV.....SGYGLKPHTYPTVDGSGVSEAHGVLT.VTVKDGKDK
ESS15959 S. mutans 666 .....WNVI.....GGYGLKPHTPGQYQPTVPSTPIHTDDI.ISFEVDFDG
AAO14618 L. reuteri 675 .....WSLINR...S.....SGLGLKPHQPVPQPKIDQPDQQPSGQNT.KNVTPG.NG
AAI19523 L. mesenteroides 676 YINTSYLFLKNGVRLSGVQTYANSYYFDPVITYKRVVNE.....IHQDNTGKKYYFGNDG

P05655 B. subtilis .....
KLV33587 B. megaterium .....
AGZ16261 B. licheniformis .....
CAB39327 P. polymyxa .....
AGJ52124 B. amyloliquefaciens .....
AAB97111 G. stearothermophilus .....
Q43998 G. diazotrophicus .....
ACC75109 B. phymatum .....
F8DT26 Z. mobilis .....
CCM43846 P. syringae .....
O54435 R. aquatilis .....
CAA52972 E. amylovora .....
AA71925 S. salivarius 753 KADKPETPVSPTEGNHSDVDDKTNKPGTSKPADNNQPSADKEDKPTNPTNPDSPARTPPFY
ESS15959 S. mutans 706 .....HLVIKPVKVNNDSSAGRIDQSRNS.....GW..
AAO14618 L. reuteri 717 .....D...KPAKATPDNTNIDPSA.....
AAI19523 L. mesenteroides 731 RVKQGQFAVNGVAYNFGNDKTYERGFA..SGYLQDV...TDNNQWYWFESGKKYTGFRY

P05655 B. subtilis .....
KLV33587 B. megaterium .....
AGZ16261 B. licheniformis .....
CAB39327 P. polymyxa .....
AGJ52124 B. amyloliquefaciens .....
AAB97111 G. stearothermophilus .....
Q43998 G. diazotrophicus .....
ACC75109 B. phymatum .....
F8DT26 Z. mobilis .....
CCM43846 P. syringae .....
O54435 R. aquatilis .....
CAA52972 E. amylovora .....
AA71925 S. salivarius 813 YGDHSDNDDNSS...NDHHVAVPVKPSGTGDSVGDRRPVAQAAEIATPVPKTIVATGPTVP
ESS15959 S. mutans 731 .....SLNVAFNVSAGGNIS.VKPSQK.....
AAO14618 L. reuteri 735 .....QPSGQNTN.IDPSAQ.....
AAI19523 L. mesenteroides 786 YMGTYFFETGQRQESKWETAWGMKYVYVGTDG...RA.VQGVQII.....DGQAY.
    
```


REFERENCIAS

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., ... Zwart, P. H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(2), 213–221. <https://doi.org/10.1107/S09074444909052925>
- Ahmad, S., Gromiha, M., Fawareh, H., & Sarai, A. (2004). ASAVIEW: Database and tool for solvent accessibility representation in proteins. *BMC Bioinformatics*, 5, 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-51>
- Albenne, C., Skov, L. K., Mirza, O., Gajhede, M., Feller, G., D'Amico, S., ... Remaud-Simeon, M. (2004). Molecular Basis of the Amylose-like Polymer Formation Catalyzed by *Neisseria polysaccharea* Amylosucrase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 726–734. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309891200>
- Albenne, C., Skov, L., & Tran, V. (2007). Towards the molecular understanding of glycogen elongation by amylosucrase. *Proteins: Structure*, 126(April 2006), 118–126. <https://doi.org/10.1002/prot>
- Asensio, J. L., Ardá, A., Cañada, F. J., & Jiménez-Barbero, J. (2013). Carbohydrate–Aromatic Interactions. *Accounts of Chemical Research*, 46(4), 946–954. <https://doi.org/10.1021/ar300024d>
- Banguela, A., & Hernandez, L. E. (2006). Fructans : from natural sources to transgenic plants. Retrieved from <https://www.semanticscholar.org/paper/Fructans-%3A-from-natural-sources-to-transgenic-Banguela-Hernandez/4a3a184112b125f7a26d88e37eae211dd4835e1>
- Barrett, D., Wang, T. S. A., Yuan, Y., Zhang, Y., Kahne, D., & Walker, S. (2007). Analysis of glycan polymers produced by peptidoglycan glycosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), 31964–31971. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705440200>
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2004, September 15). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *The Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
- Capitán-Cañadas, F., Ortega-González, M., Guadix, E., Zarzuelo, A., Suárez, M. D., de Medina, F. S., & Martínez-Augustín, O. (2014). Prebiotic oligosaccharides directly modulate proinflammatory cytokine production in monocytes via activation of TLR4. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(5), 1098–1110. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300497>
- Castillo, E., & López-Munguía, a. (2004). Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. *Journal of Biotechnology*, 114(1–2), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.003>
- Celniker, G., Nimrod, G., Ashkenazy, H., Glaser, F., Martz, E., Mayrose, I., ... Ben-Tal, N. (2013). ConSurf: Using Evolutionary Data to Raise Testable Hypotheses about Protein Function. *Israel Journal of Chemistry*, 53(3–4), 199–206. <https://doi.org/10.1002/ijch.201200096>
- Chambert, R., & Petit-Glatron, M.-F. (1989). Study of the effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Carbohydrate Research*, 191(1), 117–123. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(89\)85051-7](https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)85051-7)
- Chambert, R., & Petit-Glatron, M. F. (1991). Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *The Biochemical Journal*, 279 (Pt 1), 35–41. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1151543&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chambert, R., Treboul, G., & Dedonder, R. (1974). Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 41(2), 285–300.

- Chayen, N. E., & Saridakis, E. (2008). Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature Methods*, 5(2), 147–153. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.203>
- Chuankhayan, P., Hsieh, C.-Y., Huang, Y.-C., Hsieh, Y.-Y., Guan, H.-H., Hsieh, Y.-C., ... 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), 23251–23264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.113027>
- Ciucanu, I., & Caprita, R. (2007). Per-O-methylation of neutral carbohydrates directly from aqueous samples for gas chromatography and mass spectrometry analysis. *Analytica Chimica Acta*, 585(1), 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.12.015>
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131(2), 209–217. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85242-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85242-8)
- Cuyvers, S., Dornez, E., Delcour, J. a., & Courtin, C. M. (2012). Occurrence and functional significance of secondary carbohydrate binding sites in glycoside hydrolases. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2), 93–107. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.561537>
- Davies, G. L., Wilson, K. S., & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321, 557–559.
- Dedonder, R. (1966). Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods in Enzymology*, 8, 500–505. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(66\)08091-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(66)08091-1)
- Di Bartolomeo, F., & Van den Ende, W. (2015). Fructose and Fructans: Opposite Effects on Health? *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(3), 227–237. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0485-6>
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4), 486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
- Ernst, M., Chatterton, N. J., & Harrison, P. A. (1996). Purification and characterization of a new fructan series from species of Asteraceae. *New Phytologist*, 132(1), 63–66. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04509.x>
- Euzenat, O., Guilbert, A., & Combes, D. (1997). Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochem*, 32(3), 237–243.
- Feingold, D. S., Avigad, G., & Hestrin, S. (1956). The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 4. Isolation and probable structures of oligosaccharides formed from sucrose by a levansucrase system. *The Biochemical Journal*, 64(2), 351–361. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1199738&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Forsee, W. T., Cartee, R. T., & Yother, J. (2006). Role of the carbohydrate binding site of the *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide type 3 synthase in the transition from oligosaccharide to polysaccharide synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6283–6289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511124200>
- Freiberger, F., Claus, H., Günzel, A., Oltmann-Norden, I., Vionnet, J., Mühlenhoff, M., ... Stummeyer, K. (2007). Biochemical characterization of a *Neisseria meningitidis* polysialyltransferase reveals novel functional motifs in bacterial sialyltransferases. *Molecular Microbiology*, 65(5), 1258–1275. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05862.x>
- Guillén, D., Sánchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2010). Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1241–1249. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2331-y>
- Hestrin, S., Feingold, D. S., & Avigad, G. (1956). The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 3. Donor-acceptor specificity of levansucrase from *Aerobacter levanicum*. *The Biochemical Journal*, 64(2), 340–351. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1199737&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Hijum, S. Van, Kralj, S., & Ozimek, L. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology And*, 70(1), 157–176. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.157>
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D., & Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *The Biochemical Journal*, 407(2), 189–198. <https://doi.org/10.1042/BJ20070600>
- Hudson, K. L., Bartlett, G. J., Diehl, R. C., Agirre, J., Gallagher, T., Kiessling, L. L., & Woolfson, D. N. (2015). Carbohydrate-Aromatic Interactions in Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 137(48), 15152–15160. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b08424>
- Iizuka, M., Mima, T., Ammar, Y. Ben, Ito, K., & Minamiura, N. (2002). Mechanism of Synthesis of Levan by *Bacillus natto* Levansucrase. *Journal of Applied Glycoscience*, 49(2), 229–237. <https://doi.org/10.5458/jag.49.229>
- Ito, H., Takemura, N., Sonoyama, K., Kawagishi, H., Topping, D. L., Conlon, M. A., & Morita, T. (2011). Degree of polymerization of inulin-type fructans differentially affects number of lactic acid bacteria, intestinal immune functions, and immunoglobulin a secretion in the rat cecum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5771–5778. <https://doi.org/10.1021/jf200859z>
- Jing, W., & DeAngelis, P. L. (2003). Analysis of the two active sites of the hyaluronan synthase and the chondroitin synthase of *Pasteurella multocida*. *Glycobiology*, 13(10), 661–671. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg085>
- Kang, S., Jang, K., Seo, J., & Kim, K. (2009). Levan: applications and perspectives. *Of Biopolymers And*. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=Vu9kc0-uSJYC&oi=fnd&pg=PA145&dq=Levan:+Applications+and+Perspectives&ots=8dJgIA4IAf&sig=djTfzAzQzrjAlzZZBJuflDa5i9M>
- Kelly, G. (2009). Inulin-type prebiotics: A review (Part 2). *Alternative Medicine Review*. <https://doi.org/10.1519/SSC.0b013e318281f689>
- Kim, K. H., Chung, C. B., Kim, Y. H., Kim, K. S., Han, C. S., & Kim, C. H. (2005). Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Cosmetic Science*, 56(6), 395–406. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16538295>
- Kim, S.-J., Bae, P. K., Chung, B. H., Yamazaki, N., Kojima, S., Bovin, N. V., ... Chung, B. H. (2015). Self-assembled levan nanoparticles for targeted breast cancer imaging. *Chem. Commun.*, 51(1), 107–110. <https://doi.org/10.1039/C4CC07679F>
- Kozakov, D., Grove, L. E., Hall, D. R., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Luo, L., ... Vajda, S. (2015). The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. *Nature Protocols*, 10(5), 733–755. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.043>
- 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. <https://doi.org/10.1080/10242420701789478>
- Laskowski, R. A., & Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51(10), 2778–2786. <https://doi.org/10.1021/ci200227u>
- Lewis, D. H. (1993a). Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans - a paper for discussion. *New Phytologist*, 124(4), 583–594. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03848.x>
- Lewis, D. H. (1993b). Nomenclature and Diagrammatic Representation of Oligomeric Fructans - a Paper for Discussion. *New Phytologist*, 124(4), 583–594. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03848.x>
- Li, S. Y., Chen, M., Li, G., Yan, Y. L., Yu, H. Y., Zhan, Y. H., ... Lin, M. (2008). Amino acid substitutions of His296 alter the catalytic properties of *Zymomonas mobilis* 10232 levansucrase. *Acta Biochimica Polonica*, 55(1), 201–206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18324341>
- Li, S., Yan, Y., Zhou, Z., Yu, H., Zhan, Y., Zhang, W., ... Lin, M. (2011). Single amino acid residue changes in subsite -1 of levansucrase from *Zymomonas mobilis* 10232 strongly influence the enzyme activities

- and products. *Molecular Biology Reports*, 38(4), 2437–2443. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0379-5>
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., ... Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W580-4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv279>
- Lindberg, B., Lönngrén, J., & Thompson, J. L. (1973). Methylation studies on levans. *Acta Chem. Scand.*, 27(5), 1819–1821. Retrieved from http://actachemscand.dk/pdf/acta_vol_27_p1819-1821.pdf
- Mancilla-Margalli, N. A., & Lopez, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasyliro species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7832–7839. <https://doi.org/10.1021/jf060354v>
- Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Elmi, T., & Alamäe, T. (2013). Mutational analysis of conserved regions harboring catalytic triad residues of the levansucrase protein encoded by the *lsc-3* gene (*lsc3*) of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61(1), 11–22. <https://doi.org/10.1002/bab.1129>
- Martínez-Fleites, C., Ortíz-Lombardía, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E. J., Arrieta, J. G., ... Davies, G. J. (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *The Biochemical Journal*, 390(Pt 1), 19–27. <https://doi.org/10.1042/BJ20050324>
- May, J. F., Splain, R. a, Brotschi, C., & Kiessling, L. L. (2009). A tethering mechanism for length control in a processive carbohydrate polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(29), 11851–11856. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901407106>
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., Read, R. J., & IUCr. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(4), 658–674. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>
- Mellado-Mojica, E., & López, M. G. (2012). Fructan metabolism in *A. tequilana* Weber blue variety along its developmental cycle in the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(47), 11704–11713. <https://doi.org/10.1021/jf303332n>
- Méndez-Lorenzo, L., Porrás-Domínguez, J. R., Raga-Carbajal, E., Olvera, C., Rodríguez-Alegría, M. E., Carrillo-Nava, E., ... López Munguía, A. (2015). Intrinsic Levansucrase Activity of *Bacillus subtilis* 168 Levansucrase (SacB). *PLoS ONE*, 10(11), e0143394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143394>
- Meng, G., & Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural Biology*, 10(11), 935–941. <https://doi.org/10.1038/nsb974>
- Meng, G., & Fütterer, K. (2008). Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Structural Biology*, 8, 16. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-8-16>
- Mensink, M. A., Frijlink, H. W., Van Der Voort Maarschalk, K., & Hinrichs, W. L. J. (2015). Inulin, a flexible oligosaccharide. II: Review of its pharmaceutical applications. *Carbohydrate Polymers*, 134, 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.022>
- Minor, W., Cymborowski, M., Otwinowski, Z., & Chruszcz, M. (2006). HKL-3000: the integration of data reduction and structure solution – from diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 62(8), 859–866. <https://doi.org/10.1107/S0907444906019949>
- Mueller, M., Reiner, J., Fleischhacker, L., Viernstein, H., Loeppert, R., & Praznik, W. (2016). Growth of selected probiotic strains with fructans from different sources relating to degree of polymerization and structure. *Journal of Functional Foods*, 24(May), 264–275. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.010>
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J., & IUCr. (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 53(3), 240–255. <https://doi.org/10.1107/S0907444996012255>
- Nakapong, S., Pichyangkura, R., Ito, K., Iizuka, M., & Pongsawasdi, P. (2013). High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *International*

- Journal of Biological Macromolecules*, 54(1), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.jbmac.2012.11.017>
- Öner, E. T., Hernández, L., & Combie, J. (2016). Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*, 34(5), 827–844. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.002>
- Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñera, E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering, Design & Selection : PEDS*, 21(10), 589–595. <https://doi.org/10.1093/protein/gzn036>
- Ozimek, L. K., Kralj, S., Kaper, T., van der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2006). Single amino acid residue changes in subsite -1 of inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 strongly influence the size of products synthesized. *The FEBS Journal*, 273(17), 4104–4113. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05411.x>
- Ozimek, L. K., Kralj, S., van der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology (Reading, England)*, 152, 1187–1196. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28484-0>
- Peshev, D., Vergauwen, R., Moglia, A., Hideg, É., & Van Den Ende, W. (2013). Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: A role for fructans? *Journal of Experimental Botany*, 64(4), 1025–1038. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers377>
- Pijning, T., Anwar, M. a, Böger, M., Dobruchowska, J. M., Leemhuis, H., Kralj, S., ... Dijkstra, B. W. (2011). Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *Journal of Molecular Biology*, 412(1), 80–93. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.031>
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Miranda-Molina, A., Rodríguez-Alegría, M. E., & López Munguía, A. (2015). *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 132, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.056>
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Escalante, A., González-Cervantes, R., ... López Munguía, A. (2014). Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochemistry*, 49(5), 783–790. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.02.005>
- Porras Domínguez, J. R. (2012). *Obtención de Fructo-oligosacáridos a partir de levanas bacterianas mediante el uso de endolevanasas*. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Porras Domínguez, J. R. (2018). *Estudio de la levansacarasa SacB y la endolevanasa LevB1 para el diseño de un sistema simultáneo de producción de fructooligosacáridos a partir de sacarosa*. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Raga-Carbajal, E., Carrillo-Nava, E., Costas, M., Porras-Dominguez, J., López-Munguía, A., & Olvera, C. (2016). Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Glycobiology*, 26(4), 377–385. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv112>
- Rapoport, G., Dionne, R., Toulouse, E., & Dedonder, R. (1966). [Initiation of levan chains in *Bacillus subtilis*]. *Bulletin de La Société de Chimie Biologique*, 48(12), 1323–1348. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4963894>
- Reis, S. A. dos, Conceição, L. L. da, Rosa, D. D., Dias, M. M. dos S., & Peluzio, M. do C. G. (2014). Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile. *Nutricion Hospitalaria*, 31(2), 528–534. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.2.7706>
- Roberfroid, M. B. (2007). Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. *The Journal of Nutrition*, 137(11 supp), 2493S–2502S. Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17951492
- Robyt, J. F., Yoon, S.-H., & Mukerjea, R. (2008). Dextranase and the mechanism for dextran biosynthesis. *Carbohydrate Research*, 343(18), 3039–3048. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.09.012>
- Rodríguez-Alegría, M. E., Enciso-Rodríguez, A., Ortiz-Soto, M. E., Cassani, J., Olvera, C., & López-Munguía,

- A. (2010, January 5). Fructooligosaccharide production by a truncated *Leuconostoc citreum* inulosucrase mutant. *Biocatalysis and Biotransformation*. Taylor & Francis. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10242420903388819?journalCode=ibab20#.Vps5wfnhDIU>
- Sangmanee, S., Nakapong, S., Pichyangkura, R., & Kuttiyawong, K. (2016). Levan-type fructooligosaccharide production using *Bacillus licheniformis* RN-01 levansucrase Y246S immobilized on chitosan beads. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 38(3), 295–303.
- Santos-Moriano, P., Fernandez-Arrojo, L., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A. O., & Plou, F. J. (2015). Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of reaction conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 119, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.011>
- Seibel, J., Moraru, R., & Götze, S. (2005). Biocatalytic and chemical investigations in the synthesis of sucrose analogues. *Tetrahedron*, 61(30), 7081–7086. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.05.063>
- Seibel, J., Moraru, R., Götze, S., Buchholz, K., Na'annieh, S., Pawlowski, A., & Hecht, H.-J. (2006). Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydrate Research*, 341(14), 2335–2349. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.07.001>
- Singh, R. S., Singh, R. P., & Kennedy, J. F. (2016). Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.026>
- Sobhany, M., Kakuta, Y., Sugiura, N., Kimata, K., & Negishi, M. (2008). The chondroitin polymerase K4CP and the molecular mechanism of selective bindings of donor substrates to two active sites. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32328–32333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804332200>
- Strube, C. P., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J., & Heinz, D. W. (2011). Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 17593–17600. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.203166>
- Tabernero, A., Gonzalez-Garcinuno, A., Sanchez-Alvarez, J. M., Galan, M. A., & Martin Del Valle, E. M. (2017). Development of a nanoparticle system based on a fructose polymer: Stability and drug release studies. *Carbohydr. Polym.*, 160(1879–1344 (Electronic)), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.025>
- 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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/104989>
- Tanaka, T., Oi, S., & Yamamoto, T. (1980). The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase. *Journal of Biochemistry*, 87(1), 297–303.
- Timmermans, J. W., Slaghek, T. M., Iizuka, M., Van den Ende, W., De Roover, J., & van Laere, A. (2001). Isolation and Structural Analysis of New Fructans Produced By Chicory. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 20(5), 375–395. <https://doi.org/10.1081/CAR-100105711>
- Troutman, J. M., & Imperiali, B. (2010). *Campylobacter* Jejuni PglH is a Single Active Site Processive Polymerase that Utilizes Product Inhibition to Limit Sequential Glycosyl Transfer Reactions. *Biochemistry*, 48(12), 2807–2816. <https://doi.org/10.1021/bi802284d.Campylobacter>
- Van De Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., & Verstraete, W. (2007). Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 452–460. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03084.x>
- Velázquez-Hernández, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Bravo-Patiño, a, Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M. P., & Valdez-Alarcón, J. J. (2009). Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 1763–1778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04120.x>
- Vijn, I., & Smeekens, S. (1999). Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology*, 120(June), 351–359. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/120/2/351.short>

- Vionnet, J., & Vann, W. F. (2007). Successive glycosyltransfer of sialic acid by *Escherichia coli* K92 polysialyltransferase in elongation of oligosialic acceptors. *Glycobiology*, *17*(7), 735–743. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm032>
- Visnapuu, T., Mardo, K., & Alamäe, T. (2015). Levansucrases of a *Pseudomonas syringae* pathovar as catalysts for the synthesis of potentially prebiotic oligo- and polysaccharides. *New Biotechnology*, *32*(6), 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.01.009>
- Vogt, L., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M., Smelt, M., Venema, K., ... De Vos, P. (2015). Immunological Properties of Inulin-Type Fructans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(3), 414–436. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.656772>
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., ... Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP 4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *67*(4), 235–242. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
- Wuerges, J., Caputi, L., Cianci, M., Boivin, S., Meijers, R., & Benini, S. (2015). The crystal structure of *Erwinia amylovora* levansucrase provides a snapshot of the products of sucrose hydrolysis trapped into the active site. *Journal of Structural Biology*, *191*(3), 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.07.010>
- Yoon, E. J., Yoo, S.-H., Cha, J., & Gyu Lee, H. (2004). Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, *34*(3), 191–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2004.04.001>
- Yuan, S., Le Roy, K., Venken, T., Lammens, W., van den Ende, W., & de Maeyer, M. (2012). PKa modulation of the Acid/Base catalyst within GH32 and GH68: A role in substrate/inhibitor specificity? *PLoS ONE*, *7*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037453>
- Żary-Sikorska, E., & Juśkiewicz, J. (2008). Effect of Fructans With Different Degrees of Polymerization on Bacterial Enzymes Activity, Lipid Profile and Antioxidant Status in Rats, *58*(2), 269–272.
- Zhang, Z., Li, Y., Lin, B., Schroeder, M., & Huang, B. (2011). Identification of cavities on protein surface using multiple computational approaches for drug binding site prediction. *Bioinformatics*, *27*(15), 2083–2088. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTR331>

Publicaciones

Raga-Carbajal E., Carrillo-Nava E., Costas M., Porrás-Dominguez J., Lopez-Munguia A., Olvera C. (2016) Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* Levansucrase. *Glycobiology*, 26, 377-385.

Raga-Carbajal E., Lopez-Munguía A., Alvarez L., Olvera C. (2018) Understanding the transfer reaction network behind the non-processive synthesis of low molecular weight levan catalyzed by *Bacillus subtilis* Levansucrase. *Scientific Reports*, 8, 15035.

Presentación en Congresos

2017 19th European Carbohydrate Symposium *EuroCarb*, **Spain**. “Structure of levan-type FOS synthesized by a bi-enzymatic process”. E. Raga-Carbajal, E. Mellado-Mojica, J. R. Porrás-Domínguez, A. López-Munguía, M. G. López, C. Olvera. **Póster**.

2016 8th International Fructan Symposium, **Mexico**. “Insights Into the Non-Processive Polymer Synthesis Catalyzed by *Bacillus subtilis* Levansucrase: Initiators and Intermediates”. E. Raga-Carbajal, A. López-Munguía and C. Olvera. **Presentación Oral**.

2015 16th Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería SMBB, **Mexico**. “Síntesis No Procesiva de Levanas por SacB de *Bacillus subtilis*”. E. Raga-Carbajal, A. López-Munguía and C. Olvera. **Presentación Oral**.

2014 7th International Congress on Biocatalysis *Biocat*, **Germany**. “Modulation of *Bacillus subtilis* levansucrase elongation mechanism by reaction conditions”. E. Raga-Carbajal, A. López-Munguía and C. Olvera. **Póster**.

Glycan Synthesis

Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase

Enrique Raga-Carbajal², Ernesto Carrillo-Nava³, Miguel Costas³, Jaime Porras-Dominguez², Agustín López-Munguía², and Clarita Olvera^{1,2}

²Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico, and ³Laboratorio de Biofísicoquímica, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

¹To whom correspondence should be addressed: Tel: +52-777-329-1609; Fax: +52-777-311-4903; e-mail: clarita@ibt.unam.mx

Received 19 June 2015; Revised 7 November 2015; Accepted 25 November 2015

Abstract

Two levan distributions are produced typically by *Bacillus subtilis* levansucrase (SacB): a high-molecular weight (HMW) levan with an average molecular weight of 2300 kDa, and a low-molecular weight (LMW) levan with 7.2 kDa. Previous results have demonstrated how reaction conditions modulate levan molecular weight distribution. Here we demonstrate that the SacB enzyme is able to perform two mechanisms: a processive mechanism for the synthesis of HMW levan and a non-processive mechanism for the synthesis of LMW levan. Furthermore, the effect of enzyme and substrate concentration on the elongation mechanism was studied. While a negligible effect of substrate concentration was observed, we found that SacB elongation mechanism is determined by enzyme concentration. A high concentration of enzyme is required to synthesize LMW levan, involving the sequential formation of a wide variety of intermediate size levan oligosaccharides with a degree of polymerization (DP) up to ~70. In contrast, an HMW levan distribution is synthesized through a processive mechanism producing oligosaccharides with DP <20, in reactions occurring at low enzyme concentration. Additionally, reactions where levansucrase concentration was varied while the total enzyme activity was kept constant (using a combination of active SacB and an inactive SacB E342A/D86A) allowed us to demonstrate that enzyme concentration and not enzyme activity affects the final levan molecular weight distribution. The effect of enzyme concentration on the elongation mechanism is discussed in detail, finding that protein–product interactions are responsible for the mechanism shift.

Key words: enzyme concentration, levansucrase, non-processivity, processivity, substrate concentration

Introduction

Fructansucrases (FSs; EC 2.4.1.–) are members of the GH 68 glycoside hydrolase family synthesizing fructose polymers from sucrose by transfructosylation reactions. In these reactions, a transfer of a fructosyl moiety from sucrose to an acceptor molecule (another sucrose

molecule or the growing fructose chain) takes place. These enzymes can also hydrolyze sucrose when a water molecule acts as acceptor. Depending on the main type of linkage in the synthesized polymer, FSs are classified as levansucrases (LSs; EC 2.4.1.10) when the polymer contains mainly β 2–6 fructose linkages (levan) or inulosucrases

(ISs; EC 2.4.1.9) that produce inulin, a fructose polymer with β 2–1 linkages. According to the available crystallographic structures, FSs contain a single-domain folded as a five-bladed β -propeller enclosing a funnel-like central cavity where the active site is located (Meng and Fütterer 2003; Martínez-Fleites et al. 2005; Pijning et al. 2011; Strube et al. 2011). In LS from *Bacillus subtilis*, the catalytic residues have been identified as D86 and E342, which act as nucleophile and acid/base residues, respectively, and D247, which is the transition state stabilizer in the double displacement reaction mechanism of fructosyl transfer (Meng and Fütterer 2003). In the process to build up fructans, the first transfructosylation steps are associated to acceptor substrate binding at sites identified as +1 and +2 on the enzyme structure (Meng and Fütterer 2008). However, reports dealing with the process involved in the subsequent elongation of the products differ significantly depending on the enzyme origin and structure. In general, proposals of levan elongation mechanisms include either a *processive* or a *non-processive* mechanism (Figure 1). In the former, the monomer units are successively incorporated to a single chain until the elongation process is finished when the enzyme releases the polymer into the solution while in the latter, the monomer units are added to molecules taken up from the solution according to their affinity for the enzyme. In the particular case in which the products are released from the enzyme after each fructosyl transfer, the intermediates accumulate and can be observed in the reaction medium as the synthesis takes place (Kralj et al. 2008).

In this context, and in spite of the abundant literature concerning levan synthesis by LSs, no conclusions can yet be drawn regarding the

question of whether levan is synthesized by either of the two mechanisms. For instance, there is a group of LSs in which the accumulation of intermediates, an obvious step of the *non-processive* mechanism, is not observed. This is the case of the enzymes from *B. subtilis* (Ortiz-Soto et al. 2008), *Lactobacillus reuteri* 121 (Ozimek et al. 2006) and *Bacillus megaterium* (Homann et al. 2007), for which a *processive* elongation mechanism has been proposed, inferring that the polymer chain interacts with the enzyme during its synthesis, and that it is released to the reaction medium only when a given degree of polymerization (DP) is reached. In contrast, for LSs from *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Hernandez et al. 1995) and *Zymomonas mobilis* (Doelle et al. 1993), as well as for IS from *L. reuteri* 121 (Ozimek et al. 2006), which synthesize mainly fructooligosaccharides, a *non-processive* mechanism has been proposed. In the case of *B. subtilis* levansucrase (SacB), the analysis of enzyme specificity is further complicated by the fact that, depending on reaction conditions, levan may be found in a bimodal molecular weight distribution of high- (2300 kDa) and low (7.2 kDa)-molecular weight (HMW and LMW) polymers. It is known that the presence of ethanol, polyethylene glycol or acetonitrile favors the synthesis of HMW levan, while an increase in the ionic force results in a shift from the bimodal type to a single LMW levan (Tanaka et al. 1980; Yamamoto et al. 1985; Chambert and Petit-Glatron 1989). The same effect is also observed in the bimodal distribution (612 and 11 kDa) produced by LS from *Bacillus licheniformis*, in which a single LMW distribution is favored when the ionic strength is increased (Nakapong et al. 2013). More recently, the effect of enzyme activity in the reaction medium on the

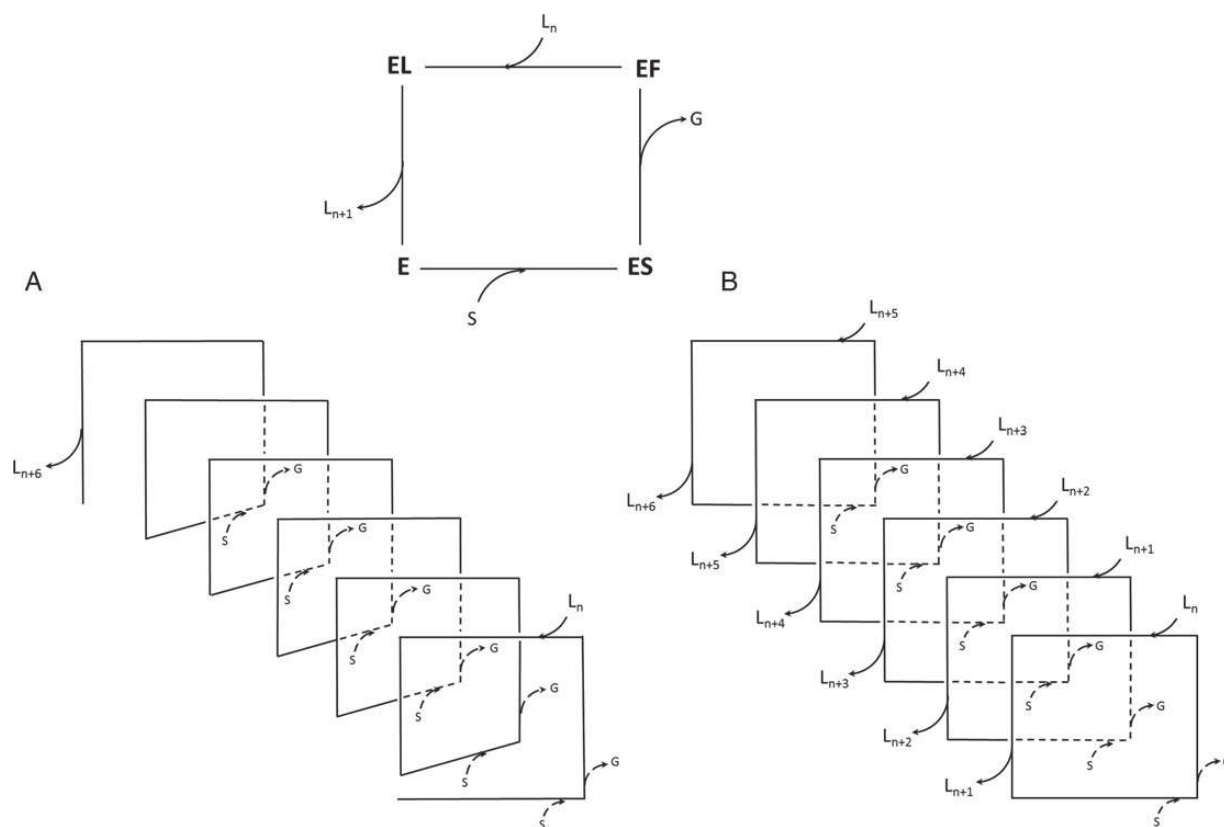


Fig. 1. Processive (A) and non-processive (B) elongation mechanisms proposed for FTFs. The upper square represents an overall single-fructose transfer process through a double displacement reaction mechanism. The *non-processive* mechanism (B) involves the dissociation of the product resulting from each fructosyl residue transferred, while the *processive* mechanism (A) involves product dissociation after multiple fructose transfer reactions (S, sucrose; G, glucose; L, acceptor).

type of levan distribution was demonstrated (Porrás-Domínguez et al. 2015).

Despite the large amount of information available concerning SacB structure, reaction specificity (hydrolysis or transfructosylation), levan production yields, as well as structure function relationship studies, little attention has been paid to factors affecting levan polymerization mechanism and final levan molecular weight distributions. In particular, the elongation mechanisms by which the different distributions are obtained still remain unclear. In this work, the evolution of levan molecules synthesized by SacB is followed during the reaction as a function of substrate and enzyme concentration. Based on these results, the elongation mechanism is discussed, pointing out that protein–product interactions are responsible for the mechanism shift.

Results

SacB concentration determines levan distribution and elongation mechanism

Two parameters are essential when describing the evolution of levan synthesis during SacB reactions: substrate and enzyme concentrations, already reported to be involved in reaction specificity (Euzenat et al. 1997; Porrás-Domínguez et al. 2015). Low and high sucrose concentration reactions (100 and 400 g/L) were performed and monitored employing very low, medium and high SacB concentrations (0.1, 1 and 10 U/mL equivalent to 0.55, 5.5 and 55 µg/mL of enzyme, respectively). The first results included the evaluation of reaction specificity reported as the hydrolysis–transfructosylation (H/T) ratio, once conversions >80% were reached (data not shown). Under standard reaction conditions as the use of 1 U/mL, 100 g/L sucrose and 37°C, SacB behaves equally as hydrolase (H) and transferase (T) as almost half of the substrate is hydrolyzed, while the other half is used for the transferase reaction (H/T = 49/51). A direct effect of enzyme concentration on reaction specificity was observed as total hydrolysis increases to 59% when enzyme concentration is increased to 10 U/mL (H/T = 59/41), while only 27% of hydrolysis is found when 0.1 U/mL of activity (H/T = 27/73) is used. Total hydrolysis of ~25% is obtained in all reactions studied when 400 g/L of initial sucrose concentration is used. As already reported, for a given enzyme concentration, higher substrate concentrations are always associated to lower hydrolytic rates (Chambert et al. 1974; Tanaka et al. 1979; Song and Jacques 1999; Chuankhayan et al. 2010).

The evolution of levan synthesis and distribution profile under different reaction conditions was studied by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) and high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). In Figure 2B, the elution profile of levan obtained under standard reaction conditions shows two levan distributions: an HMW Levan with an average MW of 2300 kDa, eluting from 13.5 to 16 min, and a second distribution that elutes from 21.5 to 24.5 min corresponding to the LMW Levan, with an average MW of 7.2 kDa. It is important to point out that both distributions are simultaneously synthesized, as observed when the levan profiles are followed through the reaction, and that no detectable intermediate size levans accumulate between the two distributions. When SacB concentration is increased one order of magnitude (10 U/mL) from the standard value (1 U/mL), the product profile is drastically modified, shifting the synthesis to exclusively LMW levan (Figure 2C), and the accumulation of intermediate size levans during the reaction is observed. In contrast, the synthesis shifts to HMW levan in reactions 100 times slower (0.1 U/mL, Figure 2A). Therefore, a radical shift is induced in

levan synthesis from HMW to LMW levan in going from 0.1 to 10 U/mL of enzyme activity. Following the evolution of the HMW levan synthesis in Figure 2A, it is clear that LMW levan is not an intermediate product of the synthesis, as nicely demonstrated by Tanaka et al. (1980) employing radioactive assays.

In order to further explore this interesting divergence in levan synthesis, the formation of fructooligosaccharide was followed by HPAEC-PAD in the three enzyme concentration reaction conditions. These analyses revealed the presence of a wide variety of compounds during SacB levan synthesis, as shown in Figure 2A', B' and C'. In all cases, signals corresponding to residual sucrose, glucose, fructose, levanbiose (β 2,6 Fru α -Fru α) as well as the sucrose isomer blastose (β 2,6 Fru α -Glc α) and the trisaccharides: 1-kestose [β -D-Fru α -(2 \rightarrow 1)- β -D-Fru α -(2 \rightarrow 1)- α -D-Glc α], 6-kestose [β -D-Fru α -(2 \rightarrow 6)- β -D-Fru α -(2 \rightarrow 1)- α -D-Glc α] and neokestose [β -D-Fru α -(2 \rightarrow 1)- α -D-Glc α -(6 \rightarrow 2)- β -D-Fru α] could be identified. In particular, Figure 2B' and C' describe reactions in which LMW levan is formed with accumulation of levan molecules with a DP of up to ~70 fructose molecules. In contrast, in Figure 2A'—where HMW levan is exclusively formed—only a few oligosaccharides with a DP <20 are observed.

It is then concluded that the oligosaccharides shown in Figure 2B' and C' are the sequential intermediates and final compounds formed during LMW levan synthesis and constitute clear evidence that LMW levan synthesis takes place through a *non-processive* mechanism. In contrast, when an extremely low enzyme concentration is used in the reaction (0.1 U/mL), HMW levan synthesis takes place through a *processive* mechanism, as only a small number of free intermediates with DP up to 18 are observed.

Substrate concentration does not affect the elongation mechanism

The effect of substrate concentration on the above described shift in levan elongation mechanism observed at extreme enzyme activities was studied increasing sucrose concentration to 400 g/L. In Figure 3A–C, it is observed that a similar shift in the final Levan distribution synthesis is produced when comparing the HPSEC analysis at high (400 g/L) and low (100 g/L) sucrose concentration. An exception exists in the case of the low enzyme concentration reaction (0.1 U/mL) where, although HMW levan is still favored, there is an incipient LMW levan formed resembling the bimodal distribution (Figure 3A).

Furthermore, the detailed fructooligosaccharides analysis made by HPAEC-PAD, revealed similar profiles at both substrate concentrations in reactions using enzyme activities of 1 and 10 U/mL (Figure 3B' and C'), confirming the already described *non-processive* mechanism of LMW levan synthesis observed in the HPSEC analysis. However, intermediate molecular weight levans (up to DP 40) are observed in the low enzyme activity reaction at high substrate concentration (Figure 3A'), which contrasts with the few oligosaccharides observed in the low sucrose concentration reaction (Figure 2A'). When considering the evolution of products during reaction, it is observed that at early reaction times (40 h) in the reaction at 400 g/L and 0.1 U/mL of enzyme activity (Figure 3A and A') HMW levan is fully formed including a fructooligosaccharides profile similar to the final profile obtained at 100 g/L and 0.1 U/mL. Nevertheless, as the high substrate concentration reaction proceeds, the size of the oligosaccharides increase up to DP 40, which may correspond to the intermediate levan molecules of the LMW distribution. Therefore, levans observed in Figure 3A' may correspond to a second synthesis step after the HMW levan synthesis is completed, and may correspond to the LMW levan synthesis process.

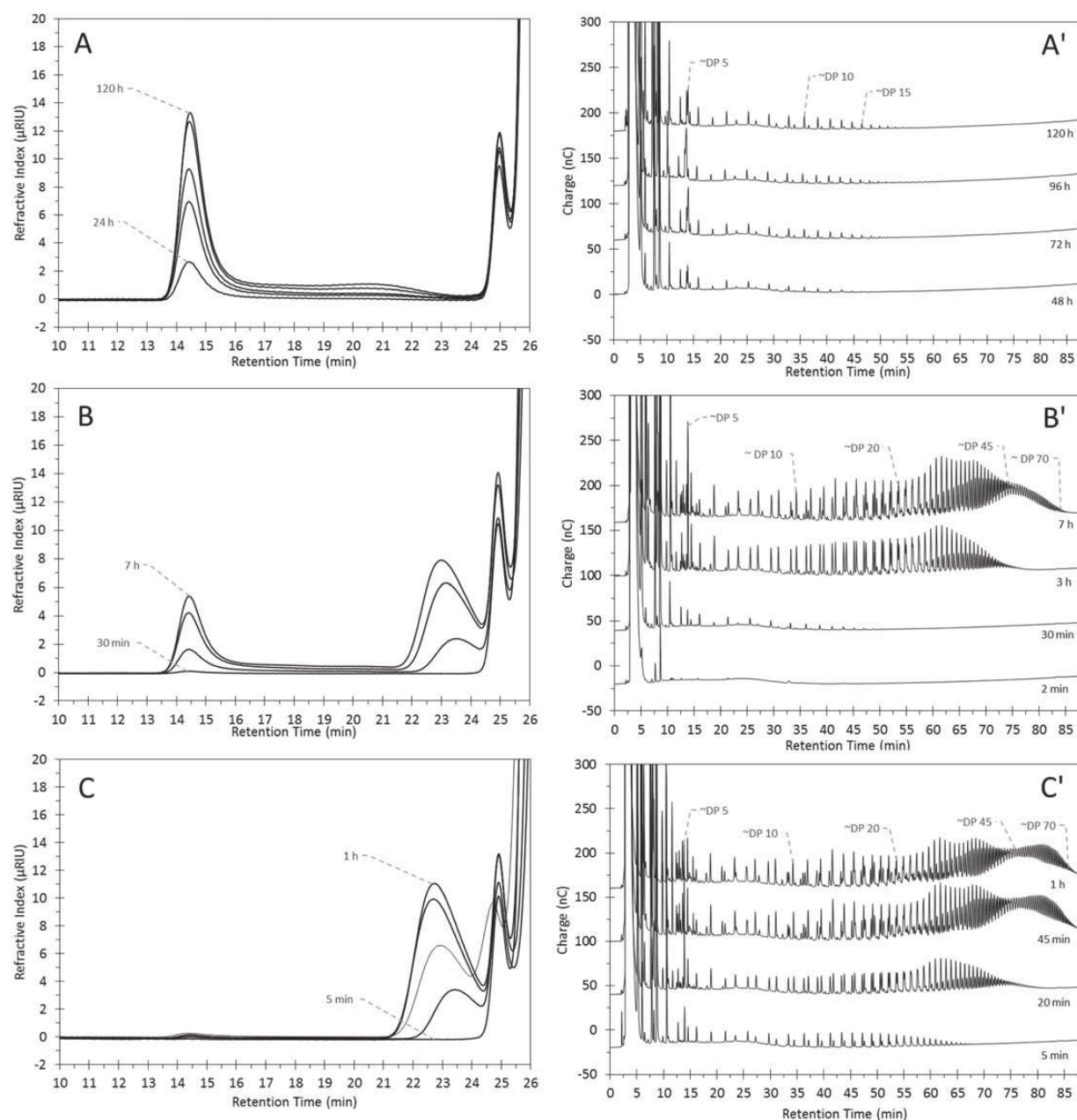


Fig. 2. Product profiles evolution in SacB reactions observed as a function of enzyme concentration. (A–C) Levan profiles by HPSEC and (A')–(C') fructooligosaccharides profiles by HPAEC-PAD in SacB reactions employing as enzyme concentrations: 0.1 U/mL (A, A'), 1 U/mL (B, B') and 10 U/mL (C, C'). Reaction conditions: 100 g/L sucrose, 37°C, pH 6.

The effect of SacB concentration on levan polymerization mechanisms

In order to discriminate between the effect of enzyme activity and enzyme concentration associated to the already described changes in product profile, we performed experiments combining active and inactive SacB in order to increase protein concentration without affecting enzyme activity. In these experiments, the product profile was determined in reactions with similar enzymatic activity (0.1 U/mL equivalent to 0.55 µg/mL of active SacB), but different total SacB concentrations (5.5 and 55 µg/mL), which correspond to the SacB concentrations in 1 and 10 U/mL reactions, respectively. SacB was therefore complemented with an inactive SacB double-mutant affected in two

catalytic residues (D86A/E342A). All reactions were carried out with 100 g/L of sucrose. The HPSEC product profiles are shown in Figure 4.

As shown above (Figure 2A), reactions with 0.1 U/mL of SacB preferentially synthesize HMW levan. However, when the inactive double-mutant is added to reach a final protein concentration of 5.5 µg/mL (Figure 4A) equivalent to the SacB concentration that would result in a 1 U/mL reaction, the bimodal distribution is obtained. Moreover, the addition of the inactive double mutant to reach an enzyme concentration of 55 µg/mL results in the exclusive synthesis of LMW levan, typical of the 10 U/mL reaction, but obtained in this case with only 0.1 U/mL of activity (Figure 4B). In order to neglect a nonspecific

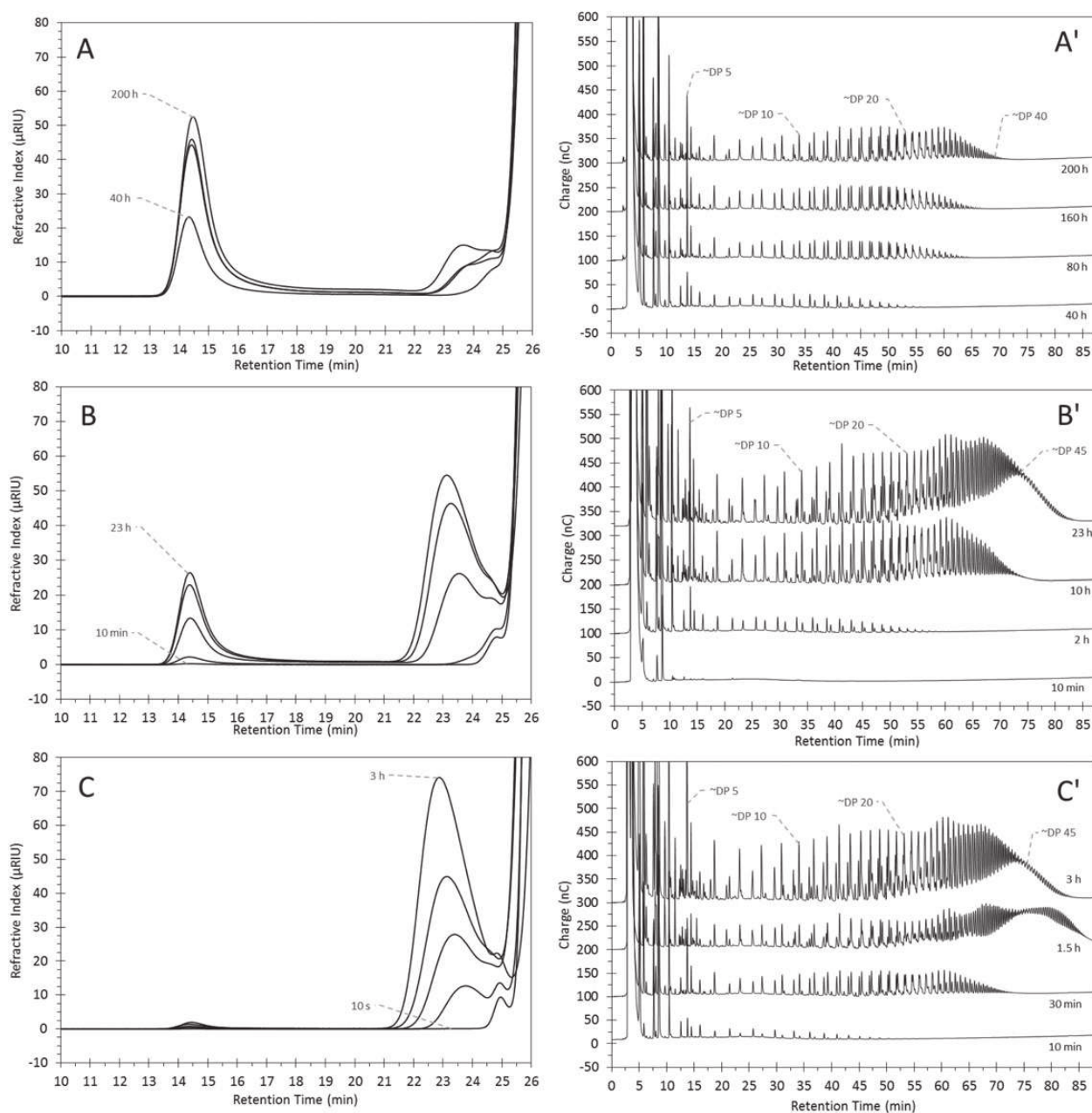


Fig. 3. Product profiles evolution in SacB reactions at high substrate concentration. (A–C) Levan profiles by HPSEC and (A')–(C') fructooligosaccharides profiles by HPAEC-PAD in SacB reactions employing 400 g/L sucrose and different enzyme concentration: 0.1 U/mL (A, A'), 1 U/mL (B, B') and 10 U/mL (C, C'). Reaction conditions: 37°C, pH 6.

effect of protein concentration on product profile, two unrelated proteins (albumin and lysozyme, instead of the inactive SacB mutant) were also used. As shown in Figure 5, the preferential HMW levan synthesized with 0.1 U/mL of SacB is retained when these two proteins are used to increase protein concentration, with a negligible formation of small amount of LMW levan. As the effect of high SacB activity shown in Figure 3 is independent of protein concentration, it may be inferred that this effect is the consequence of factors such as protein–protein or protein–product interactions.

Protein–protein interactions among LSs have been reported in two active forms of *Z. mobilis* LS (dimer and microfibril) in solution as a function of pH and ionic strength, each form displaying different product specificity (Goldman et al. 2008). In order to determine if

SacB exhibits aggregate formation, which could explain the enzyme concentration dependence on the molecular weight of the levan synthesized, the dissociation of possible SacB oligomers was studied using isothermal titration calorimetry (ITC) (Luke et al. 2005). Supplementary data, Figure S1 show the heats of dilution of a protein solution (3.5 mg/mL) as a function of the final protein concentration in the cell. The heats in Supplementary data, Figure S1 are essentially constant and do not follow the typical trend of progressive oligomer dissociation where the resulting heat of each injection becomes lower as the dilution proceeds. On the contrary, our results show that SacB is most probably a monomer in the range of concentrations studied. Dynamic light scattering (DLS) measurements of 12 mg/mL and 55 µg/mL SacB samples do not show the presence of aggregates, but

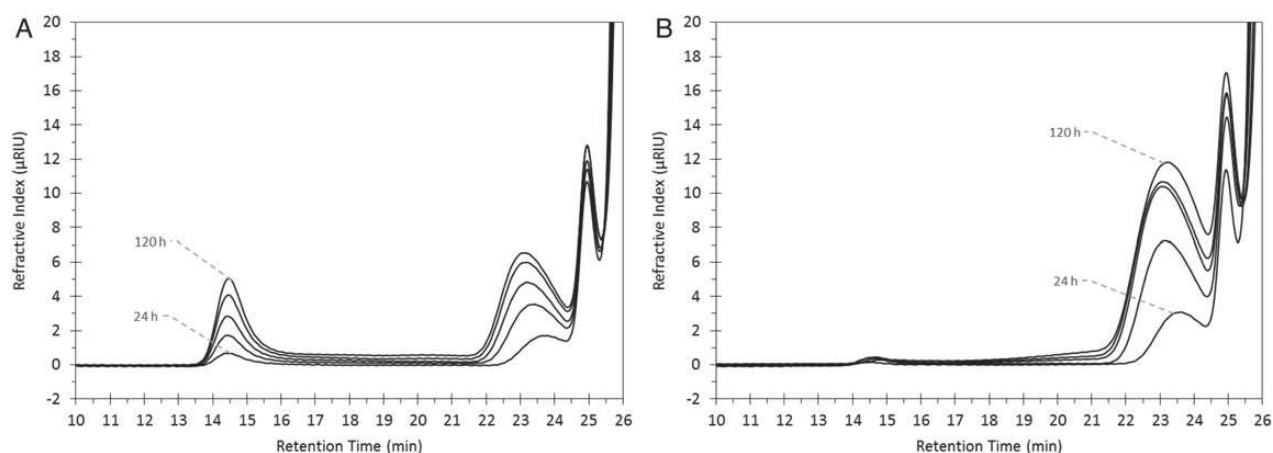


Fig. 4. Levan profile evolution in SacB reactions complemented with inactive mutant. SacB reactions with 0.1 U/mL (0.55 µg/mL) of active enzyme were complemented with an inactive SacB double mutant at two total protein concentrations: 5.5 µg/mL (A), 55 µg/mL (B).

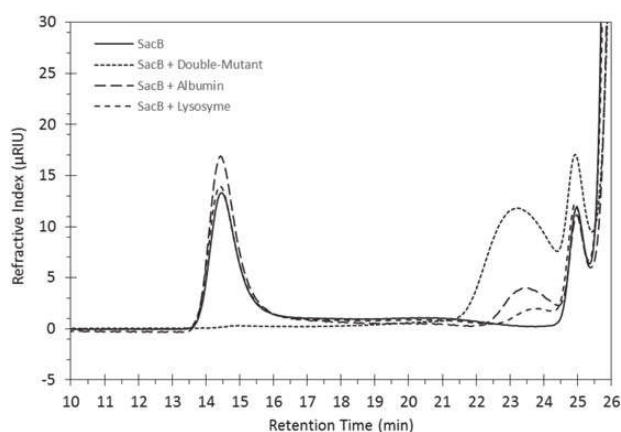


Fig. 5. Comparison of final levan profiles obtained by SacB complemented with distinct proteins. SacB reactions employing 0.1 U/mL (0.55 µg/mL) of active enzyme were complemented with lysozyme or albumin at 55 µg/mL of total protein concentration.

only small particles with a hydrodynamic diameter of 5.61 ± 0.43 nm (Supplementary data, Figure S2). This value is consistent with the presence of SacB monomers according to the crystallographic structure reported. In this context, it is also important to point out that SacB behaves as a monomer in the process carried out to obtain its crystal structure (Meng and Fütterer 2003; Meng and Fütterer 2008).

The importance of protein–carbohydrate interactions outside the catalytic pocket has been highlighted in levan synthesis. Strube et al. (2011) established that polysaccharide synthesis in SacB from *B. megaterium* is controlled by surface motifs beyond the sucrose-binding site, demonstrating by mutational studies the functional role of different amino acids involved in the polymer molecular weight control. In order to detect SacB–levan interactions, the levan binding affinity to the SacB double-mutant protein, which has inactive sucrose-binding site, was evaluated through ITC experiments. For these assays sucrose, LMW levan and a mix of short levans with average DP of 16 (DP16 levan) were employed as ligands. The energetics of association between SacB double-mutant and the three different ligands were followed by controlled additions of the sugars into a SacB double-mutant solution (upper panels, Figure 6). Integration of the resulting peaks and subsequent fitting employing the identical sites model to describe

the experimentally observed heat release profile resulted in a reaction with a 1:1 stoichiometry, i.e. one SacB double-mutant protein associates with a single sucrose (lower panels, Figure 6). The resulting interactions are weak since the obtained equilibrium binding constants (K_a) from the best fits are 73.5, 750 and 544 M^{-1} for sucrose, LMW levan and DP16 levan, respectively. Also, the associated changes in enthalpy due to the association of 1 mol of sucrose, LMW levan and DP16 levan to 1 mol of SacB double-mutant are energetically low with values of -26 , -45.7 and -63.2 kJ/mol, respectively. It is important to highlight that the K_a values obtained for the two evaluated levans are >7 times the value of the equilibrium constant for sucrose, indicating an increased binding affinity for larger molecules.

Discussion

The synthesis of a bimodal levan molecular weight distribution issued from the same enzyme under given reaction conditions is a particular property of SacB. In order to explain the presence of the two distributions, two hypotheses may be advanced. The first is that the synthesis of HMW levan results from the enlargement of the previously synthesized LMW levan. Euzenat et al. (1997) considered this possibility with the additional argument of a low affinity of LS for LMW levan leading to its accumulation. The slow transfer of a few fructosyl residues to LMW levan molecules would eventually reactivate the reaction, allowing its elongation to reach an HMW levan. From the detailed evolution of levan synthesis described in Figures 2 and 3, we propose a second hypothesis, namely that the LMW and HMW levan distributions may take place through two distinct elongation processes. This is consistent with the fact that it is possible to define specific reaction conditions in which the HMW levan synthesis is observed without the previous accumulation of LMW levan (as in the 0.1 U/mL reactions of Figures 2A and 3A) while reaction conditions also exist where the exclusive synthesis of LMW levan takes place (as in the case of the 10 U/mL reactions of Figures 2C and 3C). Indirect evidence of the two independent elongation processes was published as early as 1980, when Tanaka et al. reported that [^{14}C] labeled LMW levan added to the enzyme reaction mixture as acceptor, was not incorporated into HMW levan, which was nevertheless synthesized de novo.

The presence of two elongation mechanisms is mainly supported by the evolution of the levan profiles during the reaction described

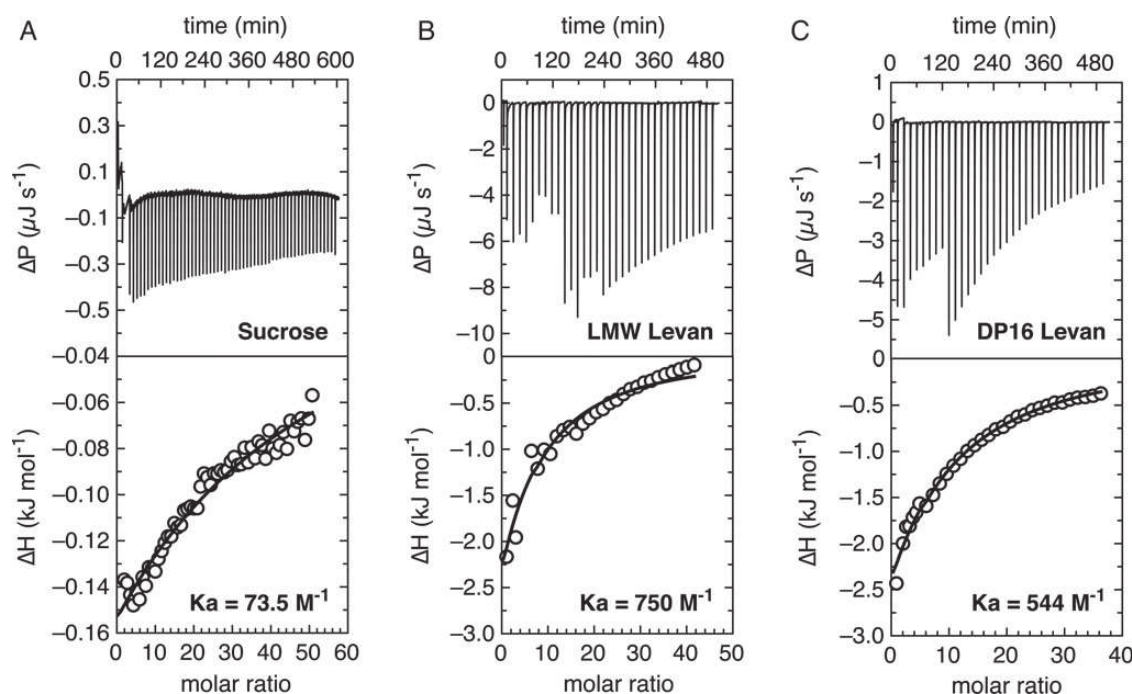


Fig. 6. Binding of SacB double-mutant with sucrose (A), LMW levan (B) and DP16 levan (C) followed by ITC. The upper panels correspond to the raw experimental data and the lower panels to the integrated peaks, which are normalized by concentration (circles). The experimental data from each titration have been fitted using the identical sites binding model (continuous lines). The x-axis is ligand/protein molar ratio.

in Figures 2C' and 3C', where it is shown that LMW levan synthesis takes place through an increasing sequential production of a wide variety of intermediate oligosaccharides found in the reaction medium, characteristic of a *non-processive mechanism*. On the other hand, it is also observed that HMW levan synthesis does not require LMW levan as precursor and is present in the solution without accumulation of intermediaries, resembling a *processive mechanism*. Although enzyme–enzyme interactions that result in large aggregates are reported for other LS, we were not able to detect interactions between SacB molecules or aggregation in calorimetric and DLS assays, in a wide enzyme concentration range. We therefore suggest that the two different mechanisms are dependent on interactions between the enzyme and its acceptor molecules, which include mono-, di- and oligosaccharides as well as the growing levan chain. We have been able to reconstruct LMW levan synthesis by the addition of independent intermediates such as DP16 levan. However, the same intermediates could not be elongated to reach the HMW levan distribution even at low enzyme concentration where HMW levan synthesis is favored (results not shown). The difficulty to obtain HMW levan from intermediates can only be explained if, in order to set up a *processive mechanism* in SacB, a permanent contact acceptor-protein is present, a contact that starts from sucrose (no free intermediates are observed). Any acceptor–SacB dissociation may turn off the *processive* elongation process favoring the *non-processive* polymerization that leads to LMW levan. This elongation mechanism shift may be triggered by any factor involving dissociation-related events such as high ionic strength, which selectively inhibit HMW levan yielding only LMW levan, as indirectly found by Tanaka et al. (1979) for *B. subtilis* LS.

As far as the effect of substrate concentration is concerned, results in the literature are not only limited but also controversial (Euzenat et al. 1997; Iizuka et al. 2002). Our results show no effect of substrate concentration on levan molecular weight as similar distributions are obtained at 100 and 400 g/L, for any given enzyme concentration.

It is important to point out that, as shown in the HPAEC-PAD analysis in Figure 2A', the HMW levan synthesis occurs with a release of low DP oligosaccharides, probably derived from occasional dissociation events during the *processive* polymerization. In this context, high sucrose concentrations do increase the size of such free oligosaccharides (Figure 3A') but only after the HMW levan distribution has been formed. This profile resembles an incipient *non-processive* synthesis of LMW levan, which occurs as a second step in the synthesis reactions induced by the high concentration of substrate employed.

The effect of enzyme concentration in the elongation mechanism is quite clear, as the process leading to either HMW or LMW levan distributions, or both, can be defined through enzyme concentration in the reaction. As shown here, this effect is not due to enzyme activity but to enzyme concentration, as demonstrated by the fact that similar levan distribution profiles are obtained at similar SacB concentrations even if activities differ by one order of magnitude. In order to reconcile this effect with the existence of two levan elongation mechanisms, we studied enzyme–levan interactions through ITC experiments using an inactive double-mutant SacB and two products of different size (LMW and DP16 levan), as well as sucrose, the main substrate. The ITC results are consistent with the presence of alternative binding sites in SacB, which may allow the interaction with oligosaccharides/levans as Strube et al. (2011) suggested for SacB from *B. megaterium*. These results point to enzyme–product interactions to explain the shift in elongation mechanism. Accordingly, one could speculate about the presence of an active and an acceptor binding site in SacB participating in the reaction. Additionally, the elongation mechanism shift may be result of an *acceptor-stealing* phenomenon involving the participation of the acceptor binding site as SacB concentration increases. In this way, at high SacB concentrations, enzyme molecules (active or inactive) may hinder the *processive* elongation, stealing the elongating acceptor from the enzyme and releasing it into the bulk reaction, from where it is taken up again to be elongated in a

non-processive mechanism. On the other hand, when very low enzyme concentrations are used, interactions between SacB molecules and SacB-acceptor intermediates do not take place, allowing the successful *processive* synthesis of HMW levan. Additional support of this *acceptor-stealing* hypothesis are the reports of Iizuka et al. (2002) and Chambert and PetitGlatron (1993), who immobilized LSs from *Bacillus natto* and *B. subtilis* and found that at conditions where enzyme molecules cannot interact, HMW levan is mainly synthesized, as in very low enzyme concentration reactions, where interactions by molecular diffusion are limited.

The duality of *processive* and *non-processive* mechanisms in fructan synthesis has already been discussed by Ozimek et al. (2006) to explain the differences between fructosyltransferase specificities leading either to FOS and those leading to HMW fructans. In the same context, Moulis et al. (2006) proposed a *semi-processive* mechanism to include both the *processive* and *non-processive* nature of the mechanism observed for the family GH70 glucanases, which actually contain glucan-binding regions that may act as mediators of the shift between the two processes. We may conclude that SacB, the LS from *B. subtilis*, a single-domain enzyme where no fructan-binding sites have been identified so far, is capable to proceed through *processive* or *non-processive* elongation mechanisms, leading to polymer distributions of widely different average molecular weights which, in turn, are determined by the reaction conditions.

Materials and methods

Enzymes

The SacB-D86A-E342A (mentioned as double-mutant) was generated by serial site-directed mutagenesis, following the QuikChange II protocol (Stratagene) with forward primers 5'-CA GTA ACA GAT GAA ATT GCA CGC GCG AAC GTC-3' (E342A), 5'-GGC CTG GAC GTT TGG GGC AGC TGG CCA TTA CAA AAC GC-3' (D86A) and the complementary reverse primers (mutations are underlined). Electrocompetent *Escherichia coli* DH5 α cells were transformed with the PCR product; plasmid DNA was amplified and verified by sequencing.

Escherichia coli BL21 [*E. coli* F2 ompT hsdSB (rB2mB) gal dcm (DE3)] carrying the recombinant plasmid encoding SacB (Ortiz-Soto et al. 2008) or SacB-D86A-E342A were grown in Luria-Bertani medium containing 200 μ g/mL of ampicillin at 37°C, induced with 0.2 mM IPTG after reaching an optical density of 0.6 $A_{600\text{nm}}$ and incubated at 18°C for 8 h. For enzyme extraction, cells were harvested by centrifugation (6000 rpm, 20 min, 4°C), resuspended in lysis solution (1 mg/mL lysozyme) and frozen/thawed three times before sonication. Enzymes were purified by ion exchange chromatography following a procedure previously described (Meng and Fütterer 2003). The incubation of the double-mutant under the same conditions of reaction tested with active SacB generated not glucose, fructose or synthesis of levans, which corroborated its null activity.

Assay of LS activity

Enzymatic activity was measured by following the reducing power released from 100 g/L of sucrose in 50 mM phosphate (pH 6) buffer with 1 mM CaCl₂ at 37°C, using the 3,5-dinitro-salicylic acid method. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of fructose equivalent per minute. This corresponds to a global LS activity, which includes transfructosylation and hydrolysis activities.

Synthesis of levans under different reaction conditions

The reactions were prepared at two sucrose concentrations (100 and 400 g/L) and three enzymatic activities (0.1, 1 and 10 U/mL). Sucrose was dissolved in 50 mM acetate buffer (pH 6) containing 1 mM CaCl₂. Reaction mixtures (600 μ L) were allowed to proceed at 37°C with aliquots removed at different time intervals in order to monitor levan and fructooligosaccharides formation. Samples were immediately frozen, heated in boiling water during 10 min for enzyme denaturalization and saved frozen until analysis. SacB reactions with protein additives were carried out employing 0.1 U/mL SacB active (0.55 μ g/mL) complemented with SacB double-mutant, bovine serum albumin (Sigma) or chicken eggwhite lysozyme (Sigma) at 5.5 or 55 μ g/mL of total protein concentration measured by the Bradford method (Bio-Rad protein assay) using bovine serum albumin as the protein standard.

The hydrolysis–transfructosylation (H/T) ratios and conversion levels were determined by measuring the amount of glucose, fructose and sucrose. Fructose is the result of the hydrolytic activity, whereas the difference between glucose and fructose concentration is the result of the transfructosylation activity. Sugars quantification was carried out by HPLC in a Waters 600E system controller (Waters) equipped with a refractive index detector (Waters 410), and a Prevail Carbohydrate ES column (4.6 \times 250 mm) kept at 30°C, using acetonitrile/water (75:25) as the mobile phase at 1 mL/min.

Levans and oligosaccharides profile analysis

Levans molecular weights were determined by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) including two Ultrahydrogel SEC columns in series (Ultrahydrogel Linear, 7.8 \times 300 mm, and Ultrahydrogel 500, 7.8 \times 300 mm) and using 0.1 mM NaNO₃ as eluent at flow rate of 0.8 mL/min. Commercial dextrans of 5.2–668 kDa were used as calibration standards.

Oligosaccharides analysis were performed by HPAEC-PAD using a 3 \times 250 mm Dionex Carbopack PA200 column. A gradient of sodium acetate (5–100 mM in 20 min, 100–400 mM in 60 and 10 min for initial conditions re-equilibration) with 150 mM NaOH was applied at a 0.5 mL/min flow rate. Detection was performed using Dionex ED40 module with a gold working electrode and an Ag/AgCl pH reference.

Isothermal titration calorimetry

Heats of dilution were measured at 25°C using a VP ITC instrument (Microcal). The SacB sample (3.5 mg/mL in 50 mM acetate buffer, 1 mM Ca and pH 6.0) was placed in the syringe and titrated into the cell containing initially only buffer. The protein and buffer solutions were degassed before being loaded in the calorimeter. Titrations of 5 and 10 μ L spaced by 300 s were carried out. The calorimetric signals were integrated to obtain the corresponding heats with the Origin 7.0 software.

Heats of association between SacB double-mutant and the different levans were measured at 25°C. For all the studies, the concentration of the SacB double-mutant protein placed in the calorimetric cell was 3.7 mg/mL and dissolved in a 50 mM acetate buffer, 1 mM Ca and pH 6.0 media. The different ligand solutions i.e. LMW levan, DP16 levan and sucrose (13.16, 11.25 and 17.93 mM, respectively) were prepared with the same media where the protein was dissolved in order to avoid heat effects due to a mismatch of the dissolving media. Each of these solutions was placed in the syringe employed to carry out the titrations. Protein and all levan solutions were degassed before being loaded into the calorimeter. Additions of 5 and

10 μ L of the different levan solutions into the calorimetric cell were spaced by 900 s. The association heat profile was obtained from the integrated heat signals and thermodynamic analysis was carried out using the single set of identical sites model with the Origin 7.0 ITC data analysis software.

DLS analysis

DLS measurements were performed employing Zetasizer Nano ZS (Malvern) equipped with a 4 mW He-Ne 633 nm laser with a detection angle of 173° backscatter at 25°C in a quartz cuvette. Size distribution was obtained by three replicates and multiple data acquisitions (≥ 10) were performed. Two SacB concentrations, namely 12 mg/mL and 55 μ g/mL, in 50 mM of sodium phosphate buffer, 1 mM Ca and pH 6.0, were analyzed.

Supplementary data

Supplementary data for this article are available online at <http://glycob.oxfordjournals.org/>.

Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (grant number 219728) and by Universidad Nacional Autónoma de México-Dirección General Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT) (grant numbers IN222311, IN112813).

Acknowledgements

We thank Fernando González, Ma. Elena Rodríguez and Alma Jessica Díaz Salazar for their technical support.

Conflict of interest statement

None declared.

Abbreviations

DP, degree of polymerization; FSs, fructansucrases; HMW, high-molecular weight; HPAEC-PAD, high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection; HPSEC, high-performance size-exclusion chromatography; H/T, hydrolysis–transfructosylation ratio; ISs, inulosucrases; LMW, low-molecular weight; LS, levansucrase; SacB, *Bacillus subtilis* levansucrase.

References

Chambert R, Petit-Glatron M-F. 1989. Study of the effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Carbohydr Res.* 191:117–123.

Chambert R, Petit-Glatron M-F. 1993. Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. *Carbohydr Res.* 244:129–136.

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, Hsieh Y-C, Tien Y-C, Chen C-D, Chiang C-M, Chen C-J. 2010. Crystal structures of *Aspergillus japonicus* fructosyltransferase complex with donor/acceptor substrates reveal complete subsites in the active site for catalysis. *J Biol Chem.* 285:23251–23264.

Doelle HW, Kirk L, Crittenden R, Toh H, Doelle MB. 1993. *Zymomonas mobilis* – science and industrial application. *Crit Rev Biotechnol.* 13:57–98.

Euzenat O, Guilbert A, Combes D. 1997. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochem.* 32:237–243.

Goldman D, Lavid N, Schwartz A, Shoham G, Danino D, Shoham Y. 2008. Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase: An ordered microfibril structure of the enzyme promotes levan polymerization. *J Biol Chem.* 283:32209–32217.

Hernandez L, Arrieta J, Menendez C, Vazquez R, Coego A, Suarez V, Selman G, Petit-Glatron MF, Chambert R. 1995. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem J.* 309(Pt 1):113–118.

Homann A, Biedendieck R, Götze S, Jahn D, Seibel J. 2007. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: Mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J.* 407:189–198.

Iizuka M, Mima T, Ben Ammar Y, Ito K, Minamiura N. 2002. Mechanism of Synthesis of Levan by *Bacillus natto* Levansucrase. *J Appl Glycosci.* 49:229–237.

Kralj S, Buchholz K, Dijkhuizen L, Seibel J. 2008. Fructansucrase enzymes and sucrose analogues: A new approach for the synthesis of unique fructo-oligosaccharides. *Biocatal Biotransformation.* 26:32–41.

Luke K, Apiyo D, Wittung-Stafshede P. 2005. Dissecting homo-heptamer thermodynamics by isothermal titration calorimetry: Entropy-driven assembly of co-chaperonin protein 10. *Biophys J.* 89:3332–3336.

Martínez-Fleites C, Ortíz-Lombardía M, Pons T, Tarbouriech N, Taylor EJ, Arrieta JG, Hernández L, Davies GJ. 2005. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J.* 390:19–27.

Meng G, Fütterer K. 2003. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat Struct Biol.* 10:935–941.

Meng G, Fütterer K. 2008. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct Biol.* 8:16.

Moullis C, Joucla G, Harrison D, Fabre E, Potocki-Veronese G, Monsan P, Remaud-Simeon M. 2006. Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *J Biol Chem.* 281:31254–31267.

Nakapong S, Pichyangkura R, Ito K, Iizuka M, Pongsawasdi P. 2013. High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *Int J Biol Macromol.* 54:30–36.

Ortiz-Soto ME, Rivera M, Rudiño-Piñera E, Olvera C, López-Munguía A. 2008. Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Eng Des Sel.* 21:589–595.

Ozimek LK, Kralj S, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. 2006. The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology.* 152:1187–1196.

Pijning T, Anwar MA, Böger M, Dobruchowska JM, Leemhuis H, Kralj S, Dijkhuizen L, Dijkstra BW. 2011. Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: Insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *J Mol Biol.* 412:80–93.

Porrás-Domínguez JR, Ávila-Fernández Á, Miranda-Molina A, Rodríguez-Alegría ME, Munguía AL. 2015. *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average Levan molecular weight. *Carbohydr Polym.* 132:338–344.

Song D, Jacques NA. 1999. Mutation of aspartic acid residues in the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem J.* 264:259–264.

Strube CP, Homann A, Gamer M, Jahn D, Seibel J, Heinz DW. 2011. Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *J Biol Chem.* 286:17593–17600.

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. *J Biochem.* 85:287–293.

Tanaka T, Oi S, Yamamoto T. 1980. The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase. *J Biochem.* 87:297–303.

Yamamoto S, Iizuka M, Tanaka T, Yamamoto T. 1985. The mode of synthesis of levan by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Agric Biol Chem.* 49:343–349.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Understanding the transfer reaction network behind the non-processive synthesis of low molecular weight levan catalyzed by *Bacillus subtilis* levansucrase

Enrique Raga-Carbajal¹, Agustín López-Munguía¹, Laura Alvarez² & Clarita Olvera¹ 

Under specific reaction conditions, levansucrase from *Bacillus subtilis* (SacB) catalyzes the synthesis of a low molecular weight levan through the non-processive elongation of a great number of intermediates. To deepen understanding of the polymer elongation mechanism, we conducted a meticulous examination of the fructooligosaccharide profile evolution during the levan synthesis. As a result, the formation of primary and secondary intermediates series in different reaction stages was observed. The origin of the series was identified through comparison with product profiles obtained in acceptor reactions employing levanbiose, blastose, 1-kestose, 6-kestose, and neo-kestose, and supported with the isolation and NMR analyses of some relevant products, demonstrating that all of them are inherent products during levan formation from sucrose. These results allowed to establish the network of fructosyl transfer reactions involved in the non-processive levan synthesis. Overall, our results reveal how the relaxed acceptor specificity of SacB during the initial steps of the synthesis is responsible for the formation of several levan series, which constitute the final low molecular weight levan distribution.

Fructans are fructosyl polymers produced by several plants and microorganisms whose biological function as energy reservoir and microbial defense agent has been demonstrated^{1,2}. Depending on the linkage type, fructans can be classified as inulin, containing $\beta(2-1)$ bonds in the main chain with $\beta(2-6)$ ramifications; and levan, containing $\beta(2-6)$ bonds in the main chain with $\beta(2-1)$ ramifications³. Both fructans have interesting physicochemical and functional properties, and therefore a wide range of applications in the food and medical industries. Its low digestibility and potential to be degraded by probiotic bacteria made these polysaccharides an excellent prebiotic³. Besides this important application, they have been proposed as antioxidant, antiobesity, antiinflammatory, antitumoral, and antiviral agents⁴⁻⁸. They have also been studied due to their immunomodulatory, fibrinolytic and hypocholesterolemic activity^{9,10}, among others. For this reason, there is a scientific interest in understanding the mode of action of the enzymes involved in fructan synthesis.

Fructansucrases (FSs) are glycosyltransferases that catalyze the synthesis of fructose-containing polymers from sucrose and are classified as levansucrases (EC 2.4.1.10) or inulosucrases (EC 2.4.1.9), depending on the type of synthesized polymer. *Bacillus subtilis* levansucrase (SacB), the most studied FS, consists of a 54 kDa single domain with a five-bladed-propeller fold that encloses a substrate binding central cavity¹¹. In this site, the fructosyl moiety transfer takes place through a double-displacement reaction mechanism coordinated by three catalytic residues¹². The mechanism involves breakage of the glycosidic linkage in a fructosyl donor (usually a sucrose molecule), resulting in the formation of a covalent fructosyl-enzyme intermediate and the release of the glucose moiety. Subsequently, the fructosyl moiety is transferred from the enzyme to an acceptor molecule; as a result, the acceptor is elongated in one fructosyl unit. The relaxed acceptor specificity of SacB has already been demonstrated through the evaluation of several molecules as fructosyl acceptors in SacB reactions using sucrose

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C. P, 62210, Cuernavaca, Morelos, Mexico. ²Centro de Investigaciones Químicas-IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad #1001, Col. Chamilpa, C.P, 62210, Cuernavaca, Morelos, Mexico. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.O. (email: clarita@ibt.unam.mx)

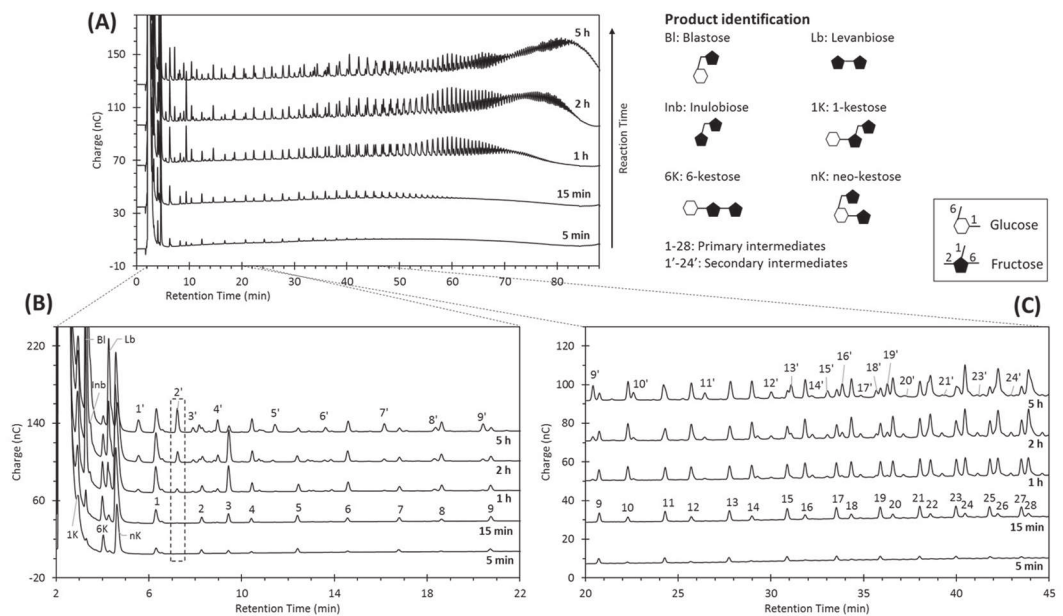


Figure 1. Evolution of the non-processive synthesis of levans followed by HPAE-PAD analysis. B and C panels are amplified views of chromatogram A. Unidentified products were classified as primary intermediates (1–28) and secondary intermediates (1'–24'). The first are produced early in the reaction, whereas the latter appear after 1 hour (e.g. peak 2'). Reaction conditions: SacB 0.5 μM , sucrose 100 g L^{-1} , pH 6, 25 °C.

as donor substrate, such as alcohols (xylitol, glycerol), monosaccharides (glucose, fructose, mannose, xylose, galactose, arabinose, fucose), disaccharides (isomaltose, maltose, melibiose, cellobiose, lactose, maltulose) and oligosaccharides (maltooligosaccharides, oligolevans)^{13–15}. When a water molecule acts as acceptor of the fructosyl intermediate, fructose is released into the reaction media (hydrolysis). As thoroughly demonstrated, the hydrolysis/transfructosylation specificity is strongly defined by reaction conditions^{16–18}.

In reactions with sucrose as the single substrate, SacB catalyzes the formation of polymeric products and produces two distributions: a high molecular weight (HMW) and a low-molecular weight (LMW) levan with an average molecular weight of 2300 kDa and 7.2 kDa, respectively¹⁹. Although levan is the major product in many levansucrase (LS) reactions, fructooligosaccharides (FOS) have been associated to the polymer synthesis since the very first reports dealing with LS reaction mechanism, half a century ago^{20,21}. Nevertheless, up to now only a few FOS have been identified, mainly due to analytical limitations. Nowadays, high-performance techniques, such as anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD), have allowed the resolution and identification of some oligosaccharides in reactions with different LSs^{17,22–24}. Recently, the observation of reaction intermediates using this type of analysis allowed us to elucidate the SacB levan elongation mechanisms; namely, a processive and a non-processive mechanism for HMW and LMW levan synthesis respectively¹⁹. In effect, SacB synthesizes the LMW levan through sequential fructosyl capture, transfer and release of the fructosylated intermediates, i.e. FOS of an increasing degree of polymerization. As a consequence of this elongation mechanism, the final product consists of a large number of intermediates and final elongation products, actually a distribution of “levan molecules”, most of them still not identified. Most importantly, the mechanistic and structural bases of this biosynthetic transformation remain unclear.

In order to gain a better understanding about the mode of action of SacB levansucrase in the non-processive elongation of levans, we meticulously examined the synthesis products following the formation and evolution of intermediates by HPAE-PAD not only in reactions with sucrose as a single substrate but also in the presence of different inherent acceptors of the reaction. This strategy allowed the identification of several polymer chain initiators, as well as intermediate fructan series, which were substantiated by NMR analyses of some intermediates, all associated to levan synthesis. From a more general perspective, our results illustrate how the initial broad acceptor specificity of a single enzyme results in the formation of a heterogeneous distribution of polysaccharide chains.

Results and Discussion

Distinct intermediate series emerge throughout the non-processive synthesis of levans. As depicted in Fig. 1A, SacB synthesizes a distribution of LMW levans through the elongation of a wide variety of intermediates, whose size increases over time during the reaction. Actually, the spectrum of intermediates and final products includes more than 150 compounds. Besides glucose and fructose, products of the transferase and hydrolysis reactions, the comparison with standards (Supplementary Fig. S1) allowed the identification of disaccharides such as: blastose [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)-D-Glcp], levanbiose [D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf], and inulbiose [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf], as well as the trisaccharides: 1-kestose [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-Glcp], 6-kestose [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-Glcp], and neo-kestose [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-Fruf] as products of transferase activity to sucrose (Fig. 1B).

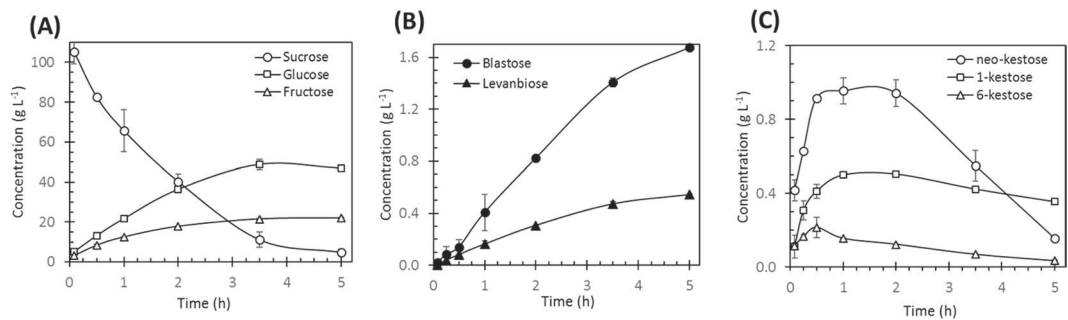


Figure 2. Formation kinetics of monosaccharides, disaccharides and trisaccharides during the non-processive synthesis of levans by SacB. Reaction conditions: SacB 0.5 μM , sucrose 100 g L^{-1} , pH 6, 25 $^{\circ}\text{C}$.

In a more detailed examination of the fructooligosaccharides profile, we can observe two distinct series of intermediates in the same molecular weight range (Fig. 1B and C). One of this intermediates group is synthesized from the very beginning of the reaction and is conserved until the end of the reaction, whereas a second group of intermediates emerge after 1 hour of reaction (as example, see the box for peak 2' in Fig. 1B). The formation of different fructooligosaccharides series may be associated with the elongation of different initiators in the synthesis levan process. As deduced from the synthesis, accumulation and consumption of oligosaccharides described in both Figs 1 and 2, the non-processive synthesis of LMW levan may be summarized in three stages or phases as follows:

Early phase. During the first 30 minutes of reaction less than 20% of sucrose is converted into glucose (byproduct of both transfructosylation and hydrolysis reactions), fructose (product of hydrolysis) and various transfructosylation products. Among the products of transfer to sucrose, three main compounds are formed and accumulated from the very beginning of the reaction: 1-kestose, 6-kestose and neo-kestose (Fig. 1B). Neo-kestose accumulates and remains as the major trisaccharide (up to 0.9 g L^{-1}), twice the concentration of 1-kestose and 4.5 times that of 6-kestose (Fig. 2C). At the same time, the first group of products, which we define as “primary intermediates”, appears in solution increasing in size over time, reaching DPs of approximately 30. The first 28 primary intermediates of the early phase are numbered in the 15-min oligosaccharide profile shown in Fig. 1B and C.

Late phase. As the reaction proceeds, new products are observed when more than 20% of sucrose is converted. Among these products, the disaccharides blastose and levanbiose reach 0.4 and 0.16 g L^{-1} after one hour of reaction and duplicate their concentration one hour later (Fig. 2B), while inulobiose is barely detected (Fig. 1B). The formation of these three products is related to the rapid accumulation of glucose and fructose, which reach 36 and 18 g L^{-1} , respectively, when sucrose conversion approaches 60%, after 2 h of reaction (Fig. 2A). The most important finding in this phase is the identification of an additional group of intermediates, designed as “secondary intermediates” and observed after one hour of reaction (Fig. 1B and C). These secondary intermediates include FOS of DP 3 to approximately 20, in contrast to primary intermediates that, at this reaction time, reach DPs higher than 40. During the late phase, neo-kestose concentration remains constant, whereas 1-kestose and 6-kestose reach maximum concentrations of 0.5 g L^{-1} and 0.21 g L^{-1} (Fig. 2C).

Sucrose depletion phase. The final reaction stage occurs when sucrose is depleted, resulting in the LMW distribution of levan, with an average DP of 50¹⁹, containing both primary and secondary intermediates, as well as their elongation products. It is important to highlight the decrease of neo-kestose when the sucrose conversion reaches more than 60% (Fig. 2C). In this third stage of the reaction, 1-kestose is the most abundant trisaccharide (0.35 g L^{-1}), whereas 6-kestose has decreased to 0.15 g L^{-1} (Fig. 2C). Meanwhile, blastose and levanbiose concentration increase during this stage of the reaction, reaching 1.67 and 0.54 g L^{-1} respectively (Fig. 2B).

As described so far, SacB synthesizes two families of intermediates during the early and late phases of reaction. To ascertain the origin and the chemical nature of these intermediate groups, we carried out reactions using sucrose as fructosyl donor and employing intermediates inherent to the reaction as acceptors, namely 1-kestose, 6-kestose, neo-kestose, blastose and levanbiose.

Primary intermediates: levan series from 1-kestose and 6-kestose. As shown above, 1-kestose, 6-kestose and neo-kestose are the first transfructosylation products. The structural difference between these products is an evidence of the low enzyme regioselectivity in the first fructosyl transfer event, in which sucrose acts as both donor and acceptor molecule. The primary intermediates observed in the early reaction phase seem to originate from these three trisaccharides. To demonstrate this hypothesis, SacB-sucrose/acceptor reactions were performed using 1-kestose or 6-kestose as acceptors. In Fig. 3A it is observed that in the SacB-sucrose/1-kestose reaction the synthesis of one oligosaccharide series is favored, but the final products profile is similar to that in SacB-sucrose reactions, including primary and secondary intermediates. A similar behavior is observed for SacB-sucrose/6-kestose reactions, with the synthesis of a clearly different oligosaccharide series, present since the beginning of the reaction (Fig. 3B). We can therefore conclude that both trisaccharides are effectively elongated by SacB, leading to the formation of two oligosaccharide series: 1-kesto-fructooligosaccharides (1K-FOS) and

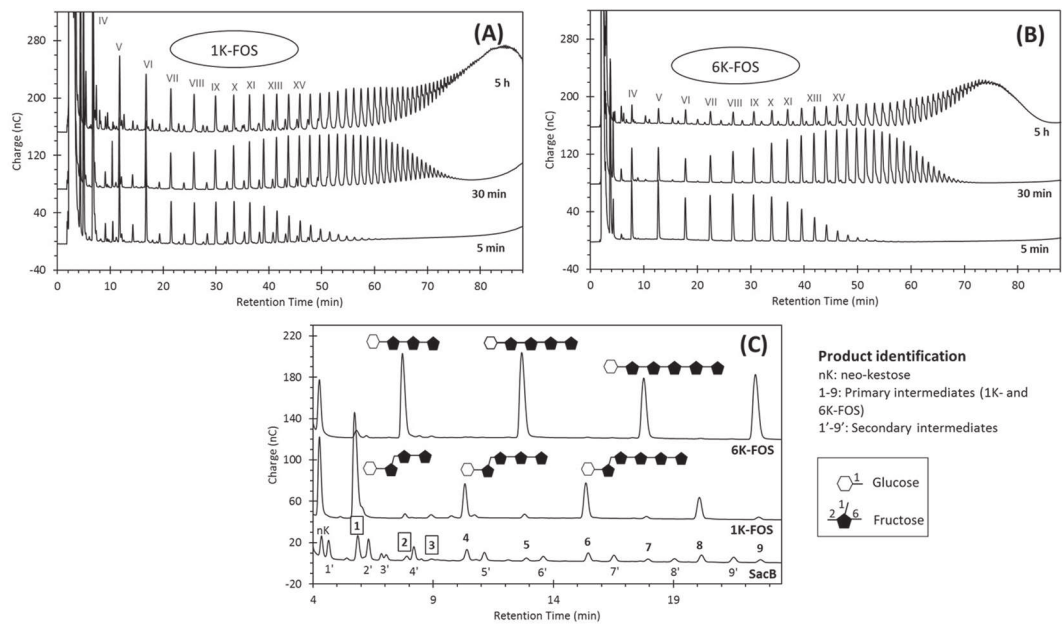


Figure 3. Evolution of the SacB-sucrose/acceptor reactions, using (A) 1-kestose and (B) 6-kestose as acceptor, analyzed by HPAE-PAD. Roman numerals indicate the estimated DP of the oligosaccharide along each oligosaccharide series. (C) Comparison of the 5-min product profile of (A) and (B) with the final product profile of the SacB-sucrose reaction (line 'SacB'). Purified primary intermediates are marked with framed numbers. Product structures are proposed according to NMR analyses. Reaction conditions: 0.5 μ M SacB, 292 mM sucrose, 5 mM acceptor.

6-kesto-fructooligosaccharides (6K-FOS), with more than 15 compounds integrating each series. The estimated DP of the detected oligosaccharides is indicated as a roman numeral in Fig. 3A and B.

Finally, Fig. 3C shows a products profile comparison between the 1K-FOS, 6K-FOS and SacB-sucrose products. For the sake of clarity, the comparison focuses only on the small intermediates of each series, with retention time of less than 24 min. It may be noticed that 1K-FOS with DP from 4 to 7 correspond to the primary intermediates 1, 4, 6, and 8; whereas the 6K-FOS with the same DP coincide with the primary intermediates 2, 5, 7, and 9. Considering that the components of both series elute at different times in the chromatographic separation, also different from the inulin-type FOS series used as standard (see Supplementary Fig. S1), and that at no time during the reaction phases 1-nystose was detected, we suggest that the fructosyl transfer to the trisaccharides involves elongation solely through β 2–6 bonds. In order to corroborate this, some of the primary intermediates in SacB reaction (peaks 1 and 2) were isolated by means of SEC and rp-HPLC, and characterized by 1D and 2D NMR spectral analysis. Peak 1 was identified as 1,6-nystose [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)- β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-Glcp], and peak 2 as 6,6-nystose [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \leftrightarrow 1)- α -D-Glcp] (Supplementary Figs S2 and S3). These tetrasaccharides are products of the fructosyl transfer at position 6 of the terminal fructosyl moiety of 1-kestose and 6-kestose, respectively. As 1K-FOS and 6K-FOS series cover the family of primary intermediates, except for peak 3, these results support the idea that 1-kestose and 6-kestose are the main inherent initiators during the early phase of LMW levan synthesis.

The acceptor nature of 1-kestose and 6-kestose has already been documented both with SacB as well as with LSs from *Aerobacter levanicum* and *Bacillus natto*. In early works, Feingold *et al.*²⁰ reported the isolation of FOS from sucrose-growing cells as well as from cell-free levansucrase extracts of *A. levanicum*, with 1-kestose as the major product and traces of 6-kestose. Moreover, these authors reported the production of up to three fructosides from successive transfers to 1-kestose, and a tetrasaccharide obtained from the transfer to 6-kestose. Later, Rapoport *et al.*²⁵ reported 1-kestose as the first product from *B. subtilis* levansucrase reactions, establishing that larger products can be obtained by fructosyl transfers to 1-kestose in β 2–6 position. More recently, Iizuka *et al.*²⁶ found that 1-kestose, 6-kestose and, to a lesser extent neo-kestose, are initiators of levan synthesis reactions by LS from *B. natto*, as demonstrated by the presence of these compounds in levan structures through nuclear magnetic resonance analysis. Our results show for the first time the chromatographic identification of the 1K-FOS and 6K-FOS levan series, with more than 15 members, all of them intrinsic products of the non-processive synthesis of LMW levan by *B. subtilis* levansucrase.

Secondary intermediates: synthesis of blasto-fructooligosaccharides and oligolevans. As LMW levan synthesis takes place, additional intermediates are observed. Consequently, these intermediates must have their origin in alternative initiators also formed during the reaction. In effect, as already shown in Figs 1 and 2, during the LMW levan synthesis the accumulation of levanbiose, inulobiose and blastose was observed. The origin of the difructosides is associated to SacB-catalyzed fructosyl transfers to fructose molecules, with levanbiose (β 2–6 bond) as the preferential product, and inulobiose (β 2–1 bond) formed to a lesser extent. On the

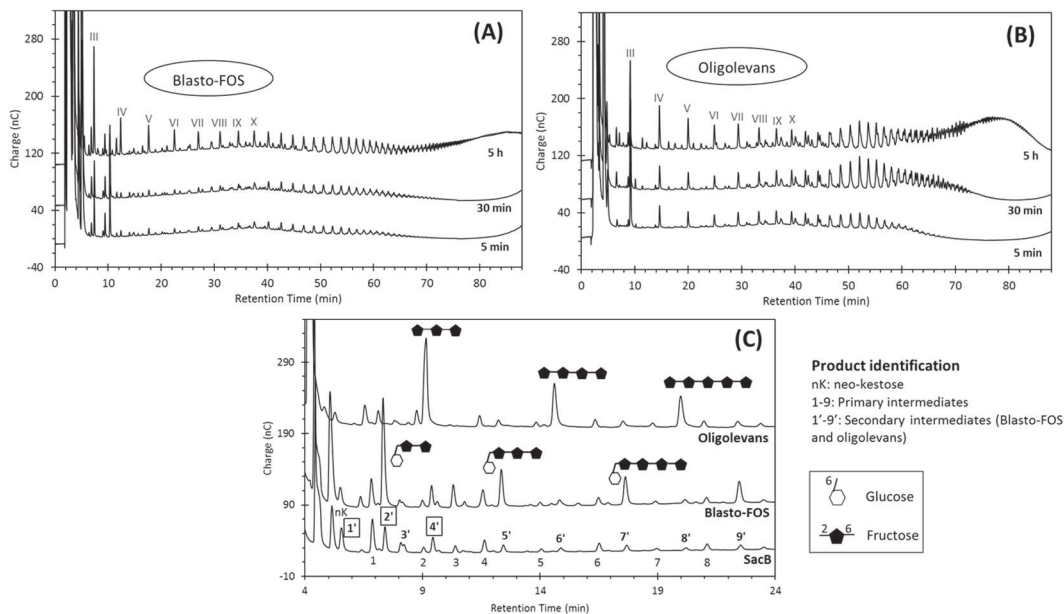


Figure 4. Evolution of the SacB-sucrose/acceptor reactions, using (A) blastose and (B) levanbiose as acceptor, analyzed by HPAE-PAD. Roman numerals indicate the estimated DP of the oligosaccharide along each oligosaccharide series. (C) Comparison of the final product profile of (A) and (B) with the final profile of the SacB reaction ('line SacB'). Purified secondary intermediates are marked with framed numbers. Product structures are proposed according to NMR analyses. Reaction conditions: 0.5 μ M SacB, 292 mM sucrose, 20 mM acceptor.

other hand, the origin of blastose is less obvious, but usually related to the hydrolysis product of neo-kestose²⁷. Nevertheless, its formation through the direct fructose transfer to glucose should also be considered²⁰.

Bearing in mind that blastose and levanbiose are the major low-DP products in the final product profile of SacB-catalyzed reaction, both disaccharides were tested as acceptors to elucidate their role in the formation of intermediates observed during the LMW levan synthesis, either in the primary or secondary groups. As in the initial assays, we observed a lower affinity of SacB for these acceptors, as their concentration had to be increased up to 20 mM in order to detect the reaction products. The evolution of the product profile during the SacB-sucrose/blastose reaction is shown in Fig. 4A. The oligosaccharide marked with the roman numeral III (most probably a DP 3 product) is initially produced, followed by the synthesis of an oligosaccharide series that stand out among the other final products. The oligosaccharides within this series are presumably the result of subsequent β 2-6 fructose transfers to blastose, constituting a novel FOS series that we propose to name "blasto-fructooligosaccharides" (Blasto-FOS). Most importantly, this series correspond to some of the secondary intermediates already described, as observed in the comparison with the SacB product profile (Fig. 4C). With the aim to corroborate the structure of this blasto-FOS series, peak 2' was isolated and characterized by 1D and 2D NMR. In the ¹H NMR spectrum, two anomeric protons were observed at δ_{H} 5.27 (d, $J = 3.76$ Hz) and 4.67 (d, $J = 7.7$ Hz), the coupling constant of these signals evidenced that this compound was a mixture of α -orientated and β -orientated glucoside isomers, in a ratio of 27:100 according to signal integration. HSQC showed their attachment to the anomeric carbons at δ_{C} 94.72 and 98.56, respectively. Besides, suggesting that C-1 position of the glucose moiety was free. Moreover, ¹³C NMR spectrum showed the presence of other two quaternary anomeric carbon signals at δ 106.56, and 106.39, attributed to two fructosyl residues. The connectivity was unravelled from key crosspeaks in the HMBC spectra, which exhibited a correlation of the quaternary carbon atom (C-2') at δ_{C} 106.56 of Fru' with the methylene protons (H-6) of Glc, as well as a correlation of the second quaternary proton (C-2'') at δ_{C} 106.39 of Fru'' with the methylene protons of H-6' (δ_{H} 3.99) of Fru'. Accordingly, peak 2' was characterized as the isomeric mixture 27/100 β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- α / β -D-Glcp, here named "blastotriose", a product derived from a single fructosyl transfer at position 6 of the fructosyl moiety of the sucrose isomer blastose (Supplementary Fig. S4).

Following the same rational, an additional oligosaccharide series was synthesized using levanbiose as acceptor (Fig. 4B). These products most probably correspond to oligolevans, FOS composed of β 2-6 linkages lacking a terminal glucosyl moiety. At least eight oligolevans with DP from 3 to 10 can be clearly identified. The estimated DP of each product is indicated with roman numerals in Fig. 4B. The comparison with the SacB-sucrose reaction profile shows that this series correspond with some of the secondary intermediates, such as peaks 4', 6', and 8' (Fig. 4C). This was confirmed through the purification and characterization of peak 4', identified by NMR as levantriose [β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf], the trisaccharide into the oligolevans series (Supplementary Fig. S5).

In addition, we were able to purify peak 1', a secondary intermediate not aligned with already described series (Fig. 4C). The enzymatic hydrolysis of this product with Fructozyme, an enzymatic preparation containing endo- and exo-inulinases, rendered equal amounts of fructose and glucose (data not shown). The 1D and 2D NMR

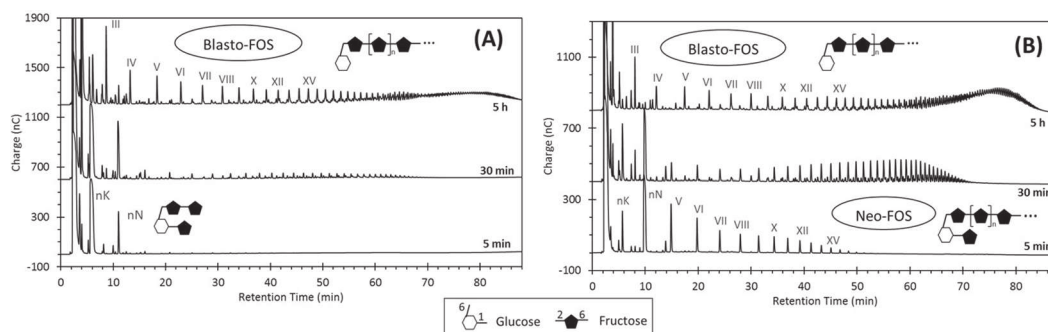


Figure 5. Evolution of the SacB-sucrose/acceptor reaction employing (A) neo-kestose (nK) and (B) 6-neo-nystose (nN) as acceptor, analyzed by HPAE-PAD. Roman numerals indicate the estimated DP of the oligosaccharide along each oligosaccharide series. Reaction conditions: 0.5 μM SacB, 292 mM sucrose, 20 mM neo-kestose or 5 mM 6-neo-nystose.

analyses of peak 1' displayed one anomeric proton signal at δ_{H} 5.44 (d, $J = 2.9$ Hz), assigned to an α -oriented glucosyl moiety. HSQC showed its attachment to the anomeric carbon at δ_{C} 94.57. In addition, ^{13}C NMR spectrum evidenced the presence of one quaternary anomeric carbon arising from a fructosyl unit. From the analysis of the signals present in the COSY, HSQC, and HMBC spectral data, the full assignment of the ^1H and ^{13}C signals belonging to the two spin systems was achieved. The interglycosidic linkage of the two sugar units was derived from the HMBC correlations between H-2 of glucose at δ_{H} 3.80 and C-2 of fructose at δ_{C} 106.13, indicating that this disaccharide has a reducing glucose. The NMR data allowed identifying peak 1' as the sucrose isomer β -D-Fruf-(2 \rightarrow 2)- α -D-Glc_p, called in this work "Ercose", a product most probably derived from the transfructosylation of glucose.

There are several reports in the literature dealing with the possibility of a fructosyl moiety transfer from sucrose to fructose or glucose by levansucrases. For instance, levanbiose, inulobiose, blastose, ercose and β -D-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 3)-D-glucose were found among the transfer products of the LS from *A. levanicum*²⁰. In the same context, the incorporation of added radiolabeled fructose into oligolevans and levans was also reported in SacB reactions with sucrose²¹. However, this is the first report providing evidence of the blastose role as acceptor in levan synthesis. It is important to mention that the acceptor role of fructose and levanbiose has only been observed in reactions with high acceptor concentrations^{21,26,28}. During the LMW levan synthesis reaction high levels of hydrolysis (H) are initially observed, while the transferase (T) activity increases towards the end of the reaction. For instance, at 292 mM sucrose the H/T ratio decreases from 62/28 to 47/53 during the reaction; consequently, fructose accumulates as a final product up to 22 g L⁻¹ with evidence of the formation of oligolevans when less than 8 g L⁻¹ of fructose has accumulated, as shown in Fig. 2A. As previously suggested, the hydrolytic activity of the levansucrase and the formation of potentially acceptor fructose molecules are additional factors influencing the composition of the final LMW levan distribution²⁹.

Neo-FOS are precursors of blasto-FOS. Finally, we investigated the role of neo-kestose in levan synthesis, carrying out the corresponding acceptor reaction. It is important to point out that, as in the case of blastose and levanbiose, neo-kestose is required in large concentrations (20 mM) to obtain significant amounts of the products. As depicted in Fig. 5A, in this reaction one product is markedly produced within the first 5 minutes of reaction. This product corresponds to the primary intermediate number 3 in Fig. 1B, most likely the product of a single β 2-6 fructosyl transfer to neo-kestose. Peak 3 was successfully isolated and NMR data allowed to identify it as β -D-Fruf(2 \rightarrow 6)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 6)- α -D-Glp-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-Frup, here named "6-neo-nystose" (Supplementary Fig. S7).

Towards the end of the reaction using neo-kestose as acceptor, the blasto-FOS series dominates above the other products. The late formation of this series is concurrent with the consumption of neo-kestose and 6-neo-nystose towards the end of the reaction. The depletion of these two neo-FOS is similarly observed at the final stage of the LMW levan synthesis, as shown in Fig. 1A for 6-neo-nystose (peak 3) and neo-kestose in Fig. 2C.

To examine the role of other member of the levan neo-series, the tetrasaccharide 6-neo-nystose was assayed as acceptor (Fig. 5B). We found that 6-neo-nystose favors with high affinity the formation of a completely new oligosaccharide series, labeled with roman numerals in the 5-min product profile shown in Fig. 5B, and most likely consisting of levan-type neo-FOS produced by successive transfers to 6-neo-nystose reaching a DP larger than 15. The presence of a new complete series derived from 6-neo-nystose, but not from neo-kestose reflects the higher acceptor specificity of the tetrasaccharide and is consistent with the high concentration of neo-kestose (20 mM) needed to observe an acceptor reaction in comparison with the lower amounts of 6-neo-nystose (5 mM) required in the reactions. However, this new series is gradually consumed as the reaction proceeds, resulting in the accumulation of blasto-FOS, which are depicted in Fig. 5B, marked with roman numerals.

SacB-catalyzed reactions with neo-kestose or 6-neo-nystose as sole substrates yielded mainly hydrolysis products: fructose and blastose from neo-kestose, and fructose and blastotriose (trisaccharide in the blasto-FOS series) from 6-neo-nystose, revealing that the two substrates may also be used by SacB as substrate fructosyl donors. Nevertheless, transfructosylation products were also observed during the initial steps in both reactions, revealing that they may also be used by SacB as substrate fructosyl donors (Supplementary Figs S8 and S9). This

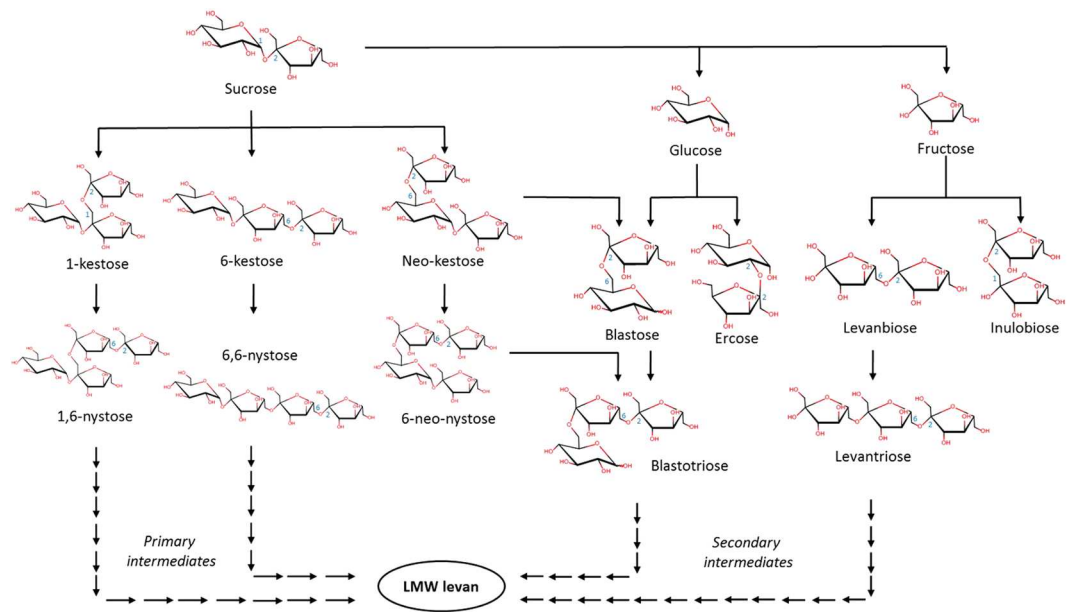


Figure 6. Diagram of the intermediates/products and fructosylation/hydrolysis reactions inherent to the *B. subtilis* levansucrase non-processive mechanism for low molecular weight (LMW) levan synthesis. The identified FOS series were classified as primary or secondary according to the reaction stage in which they are produced (see text).

result is relevant as other transfructosylation products such as blastose, levanbiose, 1-kestose or 6-kestose did not serve as donor substrates, as no products could be detected upon incubation with levansucrase at similar enzyme and substrate concentrations with the corresponding acceptor reaction (data not shown).

Our evidence highlights the capability of SacB to synthesize a complete series of neo-FOS from the corresponding precursor, i.e. 6-neo-nystose; however, during LMW levan synthesis only the tri- and tetra-saccharides accumulate, to be later consumed. This truncated polymerization may be related to the low acceptor specificity of neo-kestose, which also explains its accumulation among the primary trisaccharides. Our results also confirm the donor capacity of the neo-FOS, previously reported exclusively for neo-kestose³⁰. The donor nature of the neo-FOS series oligosaccharides is not surprising, considering that all these products maintain the sucrose moiety in one end of their structure. Due to their lower specificity, the potential donor role of neo-kestose and 6-neo-nystose probably becomes important in the *sucrose depletion phase*. Blastose and blastotriose resulting from the corresponding fructosyl transfer or hydrolysis reactions may then be elongated to produce the secondary intermediates included in the LMW levan distribution.

Network of transfer reactions during LMW levan synthesis. LMW levan, obtained through a non processive synthesis reaction catalyzed by *B. subtilis* levansucrase, may be described as a set of FOS series that result from the elongation of different initiators synthesized from sucrose at different stages of the reaction mediated by the availability of different acceptors. The complex network of FOS series and initiators is schematized in Fig. 6. As described in detail in the previous sections, an *early phase* proceeds with the formation of 6-kestose, 1-kestose and neo-kestose as the first products of transfructosylation followed by the elongation of 6-kestose and 1-kestose to the corresponding levan series. Neo-kestose accumulates and is only consumed for the synthesis of 6-neo-nystose. 6K-FOS, 1K-FOS and two neo-FOS (neo-kestose and 6-neo-nystose) compose what we have defined as primary intermediates. In the *late phase*, when glucose and fructose reach an adequate concentration to become fructosyl acceptors, ercose, inulobiose, blastose, and levanbiose are produced, including the two latter as initiators of the blasto-FOS and oligolevan series respectively, both part of the secondary intermediate group of products. Finally, in the *sucrose depletion phase*, the primary intermediates neo-kestose and 6-neo-nystose are used as donors of fructosyl residues to produce blasto-FOS, increasing the concentration of these secondary intermediates. The final levan distribution is therefore a set of reducing and non-reducing fructan series whose structure depends on the acceptor used as initiator.

It is important to underline the variety of products synthesized by SacB in the *early phase* of the reaction. The presence of three products (6-kestose, 1-kestose and neo-kestose) reflects the low regioselectivity of levansucrase in the first fructosyl transfer to a sucrose molecule. The synthesis of these three kestoses has been reported in reactions catalyzed by both levansucrases and inulosucrases^{24,27,31}, suggesting that this lack of regioselectivity when sucrose is the acceptor molecule may be a common characteristic among fructansucrases. The relaxed regioselectivity is consistent with the result of structure-function analysis that locate bond type specificity of fructansucrases in residues further away from the +2 substrate subsite³². Additionally, the broad acceptor specificity is also a common fructansucrase property outlined in the literature^{33–35}. This relaxed specificity allows *B. subtilis* levansucrase to employ kestoses and even the products of sucrose hydrolysis (glucose and fructose) as

acceptors, each according to its own specificity. Accordingly, SacB low regioselectivity explains the broad spectrum of compounds that comprise the low molecular weight levan distribution. In the same way, the multiplicity of intermediates and initiators resembles the reactions catalyzed by some glucansucrases, enzymes that produce glucose polymer from sucrose^{36,37}, suggesting that these enzymes also have a relaxed acceptor specificity and low regioselectivity in the early transfer reactions.

In summary, this work contributes to a better understanding of the polymerization reaction of fructansucrases, clarifying the network of fructosyl transfer reactions involved in the non-processive biosynthesis of what has up to now been referred as low molecular weight levan, actually a distribution of various levan series. Further work to study the effect of oligosaccharide DPs in the reaction catalyzed by the *B. subtilis* levansucrase is in progress.

Methods

Standards and substrates. The following saccharides were used as standards: glucose, fructose, sucrose (Sigma Aldrich, USA); GFn DP3–10 inulin-type FOS OligoTech® (Elicityl, France); Oligofructose Orafti®P95 (Beneo, Germany), containing GFn and Fn DP 2–7 inulin-type FOS; 6-kestose and neokestose (kindly donated by Professor M. Iiusuka). The acceptor substrate 1-kestose was purchased from Wako Pure Chemical Industries (Japan); levanbiose was obtained as recently reported³⁸; and blastose, 6-kestose, neo-kestose and 6-neo-nystose were isolated (5–10 mg) from SacB reactions and purified by size exclusion chromatography (SEC) followed by phase-reverse chromatography (rpHPLC). SEC fractionation was performed in a Bio-Gel P2 Extra Fine column (2.5 × 100 cm, Bio-Rad) using MQ water as eluent at 0.2 mL/min. rpHPLC was carried out in a Waters 1525 HPLC system equipped with a Spherisorb S5 ODS2 Semi-Prep column (20 × 250 mm, Waters), employing MQ water as mobile phase at 7 mL/min.

Recombinant expression and purification of SacB. *Escherichia coli* BL21 (DE3) harboring pET22b + *sacB*³⁹ was grown to mid-exponential phase at 37 °C with aeration until A₆₀₀ reached 0.6. Expression of SacB was induced by adding isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) at a concentration of 0.2 mM and then incubated for 8 h at 18 °C. The recombinant enzyme was purified from the cell soluble fraction using cation exchange chromatography according to a previously reported protocol¹⁹. Enzyme purity was corroborated by SDS-PAGE and protein content quantified employing the Bradford reagent (Bio-Rad) with albumin as standard.

SacB and acceptor reactions. We carried out the levansucrase reactions under enzyme and sucrose concentrations that favors the exclusive synthesis of LMW levan according to our previous work¹⁹, i.e. 0.5 μM (27.5 μg mL⁻¹) enzyme and 292 mM (100 g L⁻¹) sucrose, in a medium containing 50 mM acetate buffer (pH 6) and 1 mM CaCl₂. We verified the exclusive synthesis of LMW levan through gel permeation chromatography analysis as previously reported¹⁹. The acceptor reactions were carried out adding 5 mM of 1-kestose, 6-kestose, or 6-neo-nystose to the reaction mixture. In the case of blastose, levanbiose, and neo-kestose acceptor reactions, we increased the acceptor concentration to 20 mM to improve acceptor reaction efficiency. The reaction mixtures were allowed to proceed at 25 °C with aliquots removed at different time intervals. Samples were immediately frozen, and later heated in boiling water during 10 min for enzyme denaturalization and stored at -20 °C until analysis. Additionally, the acceptors were incubated exclusively with SacB to evaluate both, their donor capacity and their eventual hydrolysis. All experiments were performed by duplicate.

Oligosaccharide analysis and quantification. We obtained the oligosaccharide profiles by HPAE-PAD analysis in a Dionex DX-500 IC system equipped with GP50 pump, ED50 electrochemical detector, U3000 autosampler and a CarboPac PA200 column (3 × 250 mm, Dionex) maintained at 30 °C. Product elution was carried out applying a sodium acetate gradient with 100 mM NaOH at 0.5 mL min⁻¹ as follows: 5–100 mM sodium acetate in 25 min, 100–400 mM in 60 min, and 10 min for initial condition reequilibration (5 mM sodium acetate). The initial identification of some oligosaccharides was achieved by comparison with standards and, in the case of blastose and levanbiose, according to HPAE-PAD analysis previously reported^{27,38}. The oligosaccharides 1-kestose, 6-kestose, neo-kestose, levanbiose and blastose were also employed in the generation of standard curves for quantitative analysis through HPAE-PAD.

Simple sugars (fructose, glucose, and sucrose) were analyzed in a Waters 1525 HPLC system equipped with Waters 717 plus autosampler and Waters 2414 refractive index detector. We employed a Prevail Carbohydrate ES column (4.6 × 250 mm) kept at 30 °C and acetonitrile-water (75:25, v/v) as mobile phase at 1 mL/min. All measurements were performed by duplicate.

NMR analysis. NMR spectra were acquired on a Varian Unity NMR spectrometer operating at 700 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C nuclei. Chemical shifts are listed in parts per million (ppm), referenced to D₂O and were assigned on the basis of ¹H–¹H gCOSY, gTOCSY, gHSQC, and gHMBC spectral analysis as required.

References

1. Brocklebank, K. J. & Hendry, G. A. F. Characteristics of plant species which store different types of reserve carbohydrates. *New Phytol.* **112**, 255–260 (1989).
2. Geider, K., Zhang, Y., Ullrich, H. & Langlotz, C. Expression of virulence factors secreted by *Erwinia Amylovora*. *Acta Hort.* **489**, 347–352 (1999).
3. Fooks, L. J., Fuller, R. & Gibson, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.* **9**, 53–61 (1999).
4. V., D., Ende, W., Peshev, D. & De Gara, L. Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science and Technology* **22**, 689–697 (2011).
5. Kang, S. A. *et al.* Anti-Obesity and Hypolipidemic Effects of Dietary Levan in High Fat Diet-Induced Obese Rats. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 796–804 (2004).

6. Alarcon-Aguilar, F. J. *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant effects of a hypoglycemic fructan fraction from *Psacalium peltatum* (H.B.K.) Cass. in streptozotocin-induced diabetes mice. *J. Ethnopharmacol.* **132**, 400–407 (2010).
7. Chen, X. M. & Tian, G. Y. Structural elucidation and antitumor activity of a fructan from *Cyathula officinalis* Kuan. *Carbohydr. Res.* **338**, 1235–1241 (2003).
8. Lee, J. B. *et al.* Anti-influenza A virus effects of fructan from Welsh onion (*Allium fistulosum* L.). *Food Chem.* **134**, 2164–2168 (2012).
9. Delgado, G. T. C., Tamashiro, W. M. S. C. & Pastore, G. M. Immunomodulatory effects of fructans. *Food Research International* **43**, 1231–1236 (2010).
10. Yamamoto, Y. *et al.* *In vitro* digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J. Nutr. Biochem.* **10**, 13–18 (1999).
11. Meng, G. & Fütterer, K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 935–41 (2003).
12. Meng, G. & Fütterer, K. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct. Biol.* **8**, 16 (2008).
13. Tanaka, T., Yamamoto, S., Oi, S. & Yamamoto, T. Structures of heterooligosaccharides synthesized by levansucrase. *J. Biochem.* **90**, 521–526 (1981).
14. Cheetham, P. S. J., Hacking, A. J. & Vlitos, M. Synthesis of novel disaccharides by a newly isolated fructosyl transferase from *Bacillus subtilis*. *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 212–219 (1989).
15. Seibel, J. *et al.* Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydr. Res.* **341**, 2335–49 (2006).
16. Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Miranda-Molina, A., Rodríguez-Alegria, M. E. & López Munguía, A. *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydr. Polym.* **132**, 338–344 (2015).
17. Euzenat, O., Guilbert, A. & Combes, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochem* **32**, 237–243 (1997).
18. Tanaka, T., Oi, S. & Yamamoto, T. Synthesis of levan by levansucrase. Some factors affecting the rate of synthesis and degree of polymerization of levan. *J. Biochem.* **85**, 287–93 (1979).
19. Raga-Carbajal, E. *et al.* Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Glycobiology* **26**, 377–85 (2016).
20. Feingold, D. S., Avigad, G. & Hestrin, S. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 4. Isolation and probable structures of oligosaccharides formed from sucrose by a levansucrase system. *Biochem. J.* **64**, 351–61 (1956).
21. Rapoport, G., Dionne, R., Toulouse, E. & Dedonder, R. Initiation of levan chains in *Bacillus subtilis*. *Bull. la Socie te Chim. Biol.* **48**, 1323–48 (1966).
22. Tian, F., Inthanavong, L. & Karboune, S. Purification and Characterization of Levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* in Intra- and Extracellular Forms Useful for the Synthesis of Levan and Fructooligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1929–1938 (2011).
23. Strube, C. P. *et al.* Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *J. Biol. Chem.* **286**, 17593–600 (2011).
24. Santos-Moriano, P. *et al.* Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of reaction conditions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **119**, 18–25 (2015).
25. Rapoport, G. & Dedonder, R. [Specificity of the levansucrase activity of *Bacillus subtilis*: clarification]. *Bull. la Socie te Chim. Biol.* **48**, 1311–22 (1966).
26. Iizuka, M., Mima, T., Ammar, Y. Ben, Ito, K. & Minamiura, N. Mechanism of Synthesis of Levan by *Bacillus natto* Levansucrase. *J. Appl. Glycosci.* **49**, 229–237 (2002).
27. Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D. & Seibel, J. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* **407**, 189–98 (2007).
28. Yamamoto, S., Iizuka, M., Tanaka, T. & Yamamoto, T. The mode of synthesis of levan by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 343–349 (1985).
29. Méndez-Lorenzo, L. *et al.* Intrinsic Levansucrase Activity of *Bacillus subtilis* 168 Levansucrase (SacB). *PLoS One* **10**, e0143394 (2015).
30. Hestrin, S., Feingold, D. S. & Avigad, G. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 3. Donor-acceptor specificity of levansucrase from *Aerobacter levanicum*. *Biochem. J.* **64**, 340–351 (1956).
31. Peña-Cardena, A., Rodríguez-Alegria, M. E., Olvera, C. & López-Munguía, A. Synthesis of Fructooligosaccharides by ISlA4, a truncated inulosucrase from *Leuconostoc citreum*. *BMC Biotechnol.* **15** (2015).
32. Pijning, T. *et al.* Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *J. Mol. Biol.* **412**, 80–93 (2011).
33. Tian, F. & Karboune, S. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*: Specificity, kinetics, and product characterization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **82**, 71–79 (2012).
34. Visnapuu, T. *et al.* Levansucrases from *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *P. chlororaphis* subsp. aurantiaca: substrate specificity, polymerizing properties and usage of different acceptors for fructosylation. *J. Biotechnol.* **155**, 338–49 (2011).
35. Lu, L. *et al.* A recombinant levansucrase from *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1 catalyzes versatile transfructosylation reactions. *Process Biochem.* **49**, 1503–1510 (2014).
36. Moulis, C. *et al.* Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *J. Biol. Chem.* **281**, 31254–67 (2006).
37. Albenne, C. *et al.* Molecular Basis of the Amylose-like Polymer Formation Catalyzed by *Neisseria polysaccharea* Amylosucrase. *J. Biol. Chem.* **279**, 726–734 (2004).
38. Porras-Domínguez, J. R. *et al.* Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochem.* **49**, 783–790 (2014).
39. Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñera, E., Olvera, C. & López-Munguía, A. Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Eng. Des. Sel.* **21**, 589–95 (2008).

Acknowledgements

ERC acknowledges the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for providing the PhD grant No. 420196/261902 (CVU/Becario). The authors thank Marcela Ayala for critical revision of the manuscript as well as Fernando Gonzalez and Aurelia Ocampo for technical assistance. This work was supported by CONACyT (grants CB-2013-219728 and CONACyT-BMBF-2015-267620) and the Universidad Nacional Autónoma de México (grant UNAM-PAPIIT IN213616). Authors also thank Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (CONACyT 251613) for the spectroscopic analyses.

Author Contributions

CO and ERC conceived the study and designed the experiments. ERC performed the experiments. ERC carried out the NMR analysis. CO, ALM, LA and ERC analyzed data and wrote the manuscript. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32872-7>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018