



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**“INFLUENCIA DE DIVERSOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS Y
ESTRUCTURALES EN EL PESO MOLECULAR DE LA LEVANA SINTETIZADA
POR LA LEVANSACARASA DE *Bacillus subtilis* 168”**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:

LUIS ALBERTO MORALES MORENO

COMITÉ TUTORAL:

**DR. AGUSTÍN LÓPEZ-MUNGUÍA CANALES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DRA. GLORIA SAAB RINCÓN
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**DR. ROBERTO C. MUÑOZ GARAY
INSTITUTO DE CIENCIAS FÍSICAS**

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE 2020



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 fue realizado en el laboratorio de Tecnología Enzimática perteneciente al departamento de Ingeniería Celular Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del doctor Agustín López-Munguía Canales.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante la beca de maestría con numero de CVU 888289

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente: Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo (Instituto de Biotecnología – UNAM)

Secretario: Dr. José Adelfo Escalante Lozada (Instituto de Biotecnología – UNAM)

Vocal: Dra. Carmen Nina Pastor Colón (Centro de Investigación en Dinámica Celular – UAEM)

Vocal: Dr. Miguel Costas Basín (Facultad de Química – UNAM)

Vocal: Dra. Wendy Xolalpa Villanueva (Instituto de Biotecnología – UNAM)

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Agustín López-Munguía Canales por el tiempo dedicado en mi formación académica, así como por sus consejos, su atención, su calidad humana y total apoyo este proyecto.

A la doctora Gloria Saab Ricón y el doctor Roberto Carlos Muñoz Garay, miembros del comité tutor, por sus consejos, discusiones, aportaciones e interés en este proyecto.

A la doctora Elda Guadalupe Espín Ocampo, la doctora Carmen Nina Pastor Colón, la doctora Wendy Xolalpa Villanueva, el doctor Miguel Costas Basín y el doctor José Adelfo Escalante Lozada, miembros del jurado, por sus acertados comentarios y sugerencias.

Al doctor Luis Arturo Bello Pérez y a su laboratorio por su apoyo en los análisis de cromatografía por SEC-MALS.

A la doctora Alma Guadalupe Vázquez Durán, al doctor Abraham Méndez Albores y su grupo de investigación por su apoyo en la cuantificación de nanopartículas.

A todos los miembros del laboratorio ALM, por hacer tan grata mi estancia en ese laboratorio.

A doña Aurelia, a Judith y a Larisa por su apoyo técnico y administrativo.

A la maestra María Elena por enseñarme tanto, por sus pláticas y sus ideas que aportaron mucho en este proyecto.

A Fernando Gonzáles, por todo su apoyo técnico en la parte de cromatografía.

A mis padres, Margarita y José Refugio, por todas las enseñanzas y todo el apoyo puesto en mí.

A mis hermanos, Iván y Brandon, por todo su apoyo y su confianza.

A todos mis amigos y compañeros del IBt, en especial a Alejandra, Raúl, Rubén, Andrés, Sol, Jaime, Daniel, Fernando, Juan José, Iván, Lya, Silvia Gabriela, Bruno, Laura, Fidel, Ekaterina, Silvia Montiel, Ángeles, Erick y Javi por su amistad y por compartir momentos que serán inolvidables para mí durante mi estancia en el IBt.

A mis amigos de toda la vida, Humberto, Ulises, Daniel, Edgar, Zuri, Irene, Josué, Keren, Omar, Julio, Luis y Magaly, por su valiosa amistad y por su apoyo.

A Paloma, por su valiosa amistad, por escucharme en todo momento y por los momentos tan divertidos que hemos compartido.

A Isabella, mi ahijada por dejarme entrar en su vida, por su cariño y por ser fuente de inspiración en los momentos más difíciles.

Finalmente, a Carlos, mi gran amigo, que siempre cuida de mí donde quiera que se encuentre.

INDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| 1 RESUMEN..... | 13 |
| 2 INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| 3 GENERALIDADES | 18 |
| 3.1 Estructura química de levana..... | 18 |
| 3.2 Síntesis de levana..... | 19 |
| 3.3 <i>Bs-SacB</i> | 23 |
| 3.3.1 El cristal de <i>Bs-SacB</i> y la reacción..... | 23 |
| 3.3.2 Factores que afectan el peso molecular en <i>Bs-SacB</i> | 25 |
| 3.4 Relación estructura/función de <i>Bs-SacB</i> | 28 |
| 3.5 Nanopartículas de levana | 31 |
| 3.6 Peso molecular de la levana | 33 |
| 4 HIPÓTESIS | 35 |
| 5 OBJETIVO GENERAL..... | 35 |
| 6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 35 |
| 7 METODOLOGÍA Y MATERIALES..... | 36 |
| 7.1 Producción y purificación de <i>Bs-SacB</i> y las mutantes (H243L y S164A)..... | 36 |
| 7.2 Concentración de proteína | 37 |
| 7.3 Actividad enzimática | 37 |
| 7.4 Efecto de diversos parámetros sobre la síntesis de levana | 37 |
| 7.5 Inmovilización de <i>Bs-SacB</i> | 38 |
| 7.6 Síntesis y purificación de levana. | 38 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 7.7 | Análisis del peso molecular de levana y cuantificación de azúcares por cromatografía líquida. | 39 |
| 7.8 | Análisis de productos de reacción por cromatografía de intercambio iónico.. | 40 |
| 7.9 | Determinación del tamaño de partícula de levana | 40 |
| 7.10 | Análisis de partículas en Microscopia Electrónica de Transmisión | 40 |
| 7.11 | Cuantificación de nanopartículas | 41 |
| 7.12 | Precipitación fraccionada de levana..... | 41 |
| 8 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 42 |
| 8.1 | Análisis de diversos parámetros que afectan la síntesis de levana en <i>Bs-SacB</i> y las mutantes H243L y S164A | 42 |
| 8.1.1 | Análisis sobre la distribución del peso molecular de la levana sintetizada por <i>Bs-SacB</i> y la mutante H243L a 45°C | 42 |
| 8.1.2 | Efecto de la concentración de enzima sobre de peso molecular de la levana producida por <i>Bs-SacB</i> y sus mutantes H243L y S164A | 45 |
| 8.2 | Caracterización de la levana | 54 |
| 8.2.1 | Síntesis de levana por <i>Bs-SacB</i> y la levana sintetizada por la mutante H243L y S164A | 54 |
| 8.2.2 | Tamaño de partícula de las levanas | 55 |
| 8.2.3 | Nanopartículas de levana | 57 |
| 8.2.4 | Autoensamble de nanopartículas de levana y su estabilidad..... | 59 |
| 8.2.5 | Cuantificación de nanopartículas | 63 |
| 8.2.6 | Precipitación fraccionada de levana de alto peso molecular..... | 68 |
| 9 | CONCLUSIONES..... | 75 |
| 10 | BIBLIOGRAFÍA..... | 76 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura de la levana. Se muestra la unión de los residuos fructosilos por enlaces β -2,6 y las ramificaciones por enlaces β -2,1..... | 19 |
| Figura 2. Diagrama de los intermediarios y productos de las reacciones de transfructosilación y de hidrolisis de la levansacarasa de <i>B. subtilis</i> en la síntesis de levana de bajo peso molecular, modificada de Raga-Carbajal et al. (2018). | 21 |
| Figura 3. Estructura de la levansacarasa de <i>Bs-SacB</i> | 23 |
| Figura 4. Mecanismo de reacción de la levansacarasa de <i>Bs-SacB</i> | 24 |
| Figura 5. Efecto de la concentración de enzima en el mecanismo de elongación de levana sintetizada por <i>Bs-SacB</i> . A, B y C son cromatogramas obtenidos con HPSEC; A', B' y C' son cromatogramas obtenidos con HPAEC-PAD. A y A' reacciones a 0.55 μ g/mL de <i>Bs-SacB</i> ; B y B' reacciones a 5.5 μ g/mL de <i>Bs-SacB</i> ; C y C' reacciones a 55 μ g/mL de <i>Bs-SacB</i> . Todas las reacciones se realizaron a 37°C y 100 g/L de sacarosa. Imagen tomada de Raga-Carbajal et al. (2016). | 27 |
| Figura 6. Posición de algunas mutantes de <i>Bs-SacB</i> . En color naranja se muestra la triada catalítica y en azul la molécula de sacarosa. | 29 |
| Figura 7. Distancias atómicas entre el aminoácido H243 , residuos críticos en <i>Bs-SacB</i> y moléculas de agua (amarillo). Distancias mostradas en Å..... | 31 |
| Figura 8. Efecto de reacciones a 45°C sobre la levana sintetizada por la mutante H243L . Estas reacciones se llevaron a cabo a 1 U/mL de enzima a 45°C a 100 y 300 g/L de sacarosa. | 43 |

Figura 9. Efecto de la concentración de sacarosa en la síntesis de levana por *Bs-SacB* a 45°C. Esta reacción se llevó a cabo a 600 g/L (puntos), 300 g/L (línea discontinua) y 100 g/L (línea continua). Estas reacciones corresponden a 24 h de reacción. 44

Figura 10. A) Efecto de la concentración de enzima en la distribución de pesos moleculares de la levana sintetizada por la mutante **H243L**. Estas reacciones se llevaron a cabo a 100 g/L a 37°C variando la concentración de enzima. B) Distribución de pesos moleculares de la levana sintetizada por la mutante **H243L** a 10 U/mL a 37°C, variando la concentración de 100 g/L a 300 g/L de sacarosa. En rojo se muestra la levana de bajo peso molecular sintetizada por *Bs-SacB*. Todas las reacciones tienen conversiones mayores a 90 %. 46

Figura 11. Análisis de cromatografía de intercambio iónico de la levana BPM-SacB (rojo) comparada con la levana sintetizada por **H243L** (negro) a 10 U/mL y 100 g/L de sacarosa. 47

Figura 12. Efecto de la concentración de enzima en la distribución de pesos moleculares de la levana sintetizada por la mutante **S164A**. Estas reacciones se llevaron a cabo a 100 g/L a 37°C variando la concentración de enzima. 48

Figura 13. Representación gráfica de la inmovilización se *Bs-SacB* en un soporte de agarosa, este soporte se encuentra unido con ácido nitriloacético -un quelante- que a su vez retiene covalentemente iones de Ni ⁺², con los cuales las histidinas interaccionan fuertemente..... 49

Figura 14. Efecto de la inmovilización de enzima en la distribución de pesos moleculares de la levana sintetizada por la mutante **S164A** y *Bs-SacB*. Reacciones a 1 U/mL para las dos enzimas y en ambos casos (inmovilizada y libre). Estas reacciones se llevaron a cabo a 100 g/L a 37°C con agitación de 1000 rpm. 50

| | |
|--|----|
| Figura 15. Distribución de pesos moleculares de <i>Bs</i> -SacB inmovilizada. Reacciones a 5.5 µg/mL de enzima inmovilizada. En una reacción fue añadido 1 mg/mL de enzima inactiva doble mutante. Estas reacciones se llevaron a cabo a 100 g/L de sacarosa a 37°C..... | 52 |
| Figura 16. A) Esferas de agarosa con <i>Bs</i> -SacB inmovilizada y cubierta de levana. Fotografía tomada a 12 horas de reacción. B) Esferas de agarosa sin enzima inmovilizada. Ambas fotografías tomadas en microscopio óptico (40X) en campo claro..... | 52 |
| Figura 17. Distribución de pesos moleculares de la levana sintetizada por <i>Bs</i> -SacB, las mutantes H243L y S164A . En líneas discontinuas negras se muestra la levana de APM-SacB; en amarillo se muestra levana con distribución bimodal sintetizada por <i>Bs</i> -SacB; en línea continua negra se muestra la levana de BPM-SacB; en rojo la levana de APM-H243L; en azul la levana BPM-S164A. Las condiciones de síntesis se describen en la sección 8.2.1..... | 55 |
| Figura 18. Distribución del tamaño de partícula por DLS de las levanas sintetizadas por <i>Bs</i> -SacB y sus mutantes. (---rojo---) levana de BPM-SacB; (---negro---) levana de APM-H243L; (---rosa---) levana de APM-SacB; (---verde---) levana de BPM-S164A y (---azul---) levana con una distribución bimodal de peso molecular sintetizada por <i>Bs</i> -SacB..... | 56 |
| Figura 19. Nanopartículas de levana de BPM-SacB, analizadas por microscopía electrónica de transmisión después de 1 hora de reacción (10 U/mL, 100 g/L de sacarosa, 37°C). A) 35,000X B) 50,000X..... | 58 |
| Figura 20. Cinética de formación de nanopartículas. A) Síntesis de levana de bajo peso molecular durante la reacción (10 U/mL, 100 g/L de sacarosa, 37°C). B) Síntesis de | |

levana con distribución bimodal de pesos moleculares durante la reacción (1 U/mL, 100 g/L de sacarosa, 37°C). 60

Figura 21. Comportamiento de la levana BPM-SacB en presencia de Triton X-100 como aceptor. En rojo se muestra el tiempo inicial de la reacción; en negro con líneas discontinuas la reacción con la mutante **H243L** a 1 U/mL; en línea negra continua la reacción con *Bs*-SacB. Las reacciones fueron llevadas a cabo a 100 g/L, 37 °C, 1 % de levana de BPM-SacB y 5% de Triton X-100. 62

Figura 22. Distribución del tamaño y numero de partículas analizado por NTA. Reacciones de *Bs*-SacB a 10 U/mL, 100 g/L de sacarosa y 37°C. En A) la reacción a 50 % de conversión: B) la reacción a 75 % de conversión. 63

Figura 23. Distribución del tamaño y numero de partículas analizado por NTA. Reacciones a 0.1 U/mL, 100 g/L de sacarosa y 37°C. En A) 24 h de reacción; B) 120 h de reacción. 65

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Parámetros cinéticos, estabilidad térmica a 40 °C ($t_{1/2}$) pH óptimo de <i>Bs-SacB</i> y algunas de sus mutantes | 30 |
| Tabla 2. Peso molecular de levana sintetizada por enzimas provenientes de diferentes microorganismos y el método por el cual fue analizado su peso molecular..... | 34 |
| Tabla 3. Tamaño de partícula de la levana sintetizada por <i>Bs-SacB</i> y sus mutantes. El peso molecular fue analizado por SEC-RI y el tamaño de partícula por DLS | 57 |
| Tabla 4. Tamaño, concentración y contenido de cadenas de levana y residuos de fructosa de nanopartículas sintetizadas por <i>Bs-SacB</i> en condiciones de síntesis de levana de bajo peso molecular (10 U/mL, 100 g/L de sacarosa y 37°C)..... | 64 |
| Tabla 5. Tamaño, concentración y contenido de cadenas de levana y residuos de fructosa de nanopartículas sintetizadas por <i>Bs-SacB</i> en condiciones de síntesis de levana de alto peso molecular (0.1 U/mL, 100 g/L de sacarosa y 37°C)..... | 66 |
| Tabla 6. Análisis por SEC-RI de fracciones de levana obtenidas a partir de una levana de alto peso molecular, mediante precipitación fraccionada..... | 70 |
| Tabla 7. Precipitación fraccionada de la levana de alto peso molecular analizada por SEC-MALS. Se muestran los datos del peso molecular y el porcentaje que representa cada pico encontrado. En donde: M_w es el peso molecular; M_w/M_n es el índice de polidispersidad | 73 |

1 RESUMEN

Bs-SacB, la levansacarasa de *Bacillus subtilis*, tiene la capacidad de sintetizar levana con una distribución bimodal de pesos moleculares (alto y bajo peso molecular), pero bajo ciertas condiciones de reacción, puede sintetizar casi exclusivamente una u otra levana. Sin embargo, hasta el momento sólo se ha podido describir un efecto/causa del fenómeno: condiciones de reacción/peso molecular, sin tener un mecanismo claro que lo explique. Una de estas condiciones de reacción es la concentración de enzima, analizada en detalle en este trabajo, encontrando primeramente que el peso molecular que alcanza la levana modulado por la concentración de enzima, se conserva en la síntesis de levana por las mutantes **H243L** y **S164A**, las cuales se habían reportado como enzimas con un producto de distribución monomodal de peso molecular. En efecto, mediante la inmovilización de *Bs-SacB* o de la mutante **S164A** se demostró que al evitar las interacciones enzima/enzima o enzima/polímero/enzima, a pesar de tener una alta concentración de enzima en la reacción -condición que da lugar a la síntesis de levana de bajo peso molecular- se sintetiza exclusivamente levana de alto peso molecular. Se plantea así, que sitios en la superficie de la enzima le permiten interaccionar con el polímero o con otra molécula de enzima, afectando el crecimiento de las cadenas de levana. Paralelamente, se estudió un factor hasta ahora ignorado dentro de la síntesis de levana y es la capacidad de la levana de formar nanopartículas en el medio de reacción. Del análisis de este fenómeno se encontró evidencia que sugiere que moléculas de levana de bajo peso molecular (52 residuos de fructosa) interactúan entre sí para formar una nanopartícula de al menos 100 nm, hasta ahora solo reportadas para levana de alto peso molecular. La caracterización por microscopía electrónica de transmisión permitió confirmar su morfología y tamaño. Un análisis en la cinética de formación de nanopartículas demostró que la levana adopta esa estructura desde el inicio de la reacción. Se encontró además de que las nanopartículas son muy estables y que una vez formadas, es difícil desagregarlas, sugiriendo que una vez ocurra esta agregación no están disponibles para ser elongadas por la enzima. La cuantificación de nanopartículas por análisis de rastreo de nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés) demostró que a medida que avanza la reacción el número de partículas aumenta, pero manteniendo el mismo tamaño. Mediante esta técnica también se pudo determinar que se necesita una

cantidad mínima (4.8×10^{-5} mg/mL) de levana para detectar nanopartículas. Un hallazgo dentro del proyecto lo constituye el aportar evidencias a que el mecanismo mediante el cual se sintetiza la levana de alto peso molecular es, al igual que la levana de bajo peso molecular, no procesivo. Esto se concluye después de llevar a cabo una precipitación fraccionada de la levana de alto peso molecular, y observar que la distribución de peso molecular de las fracciones encontradas así lo sugiere. La comparación de dos técnicas para calcular el peso molecular de la levana demuestra que el peso molecular de la levana de alto peso molecular es de 35,600 KDa, según se determinó por SEC-MALS, un orden de magnitud superior a lo que hasta ahora se ha reportado mediante mediciones por SEC-RI. Dado que la determinación por SEC-MALS se basa en un método absoluto, sumado al comportamiento de la levana en solución, es probable que el peso molecular de la levana corresponda al determinado por SEC-MALS. A pesar de los valiosos avances logrados en este trabajo, no se ha podido aun definir claramente el mecanismo mediante el cual -bajo ciertas condiciones de reacción- el crecimiento de las cadenas se detiene para dar lugar a una levana de bajo peso molecular o de alto peso molecular.

2 INTRODUCCIÓN

La levana es un homopolisacárido compuesto de fructosas, unidas por enlaces β -2,6 y es sintetizado a partir de sacarosa por una fructosiltransferasa. Este polisacárido es de sumo interés, debido principalmente a sus características fisicoquímicas y a su actividad funcional. Existen potenciales aplicaciones de este polímero, que en su mayoría dependen del peso molecular y van desde aplicaciones como prebiótico, como aditivo en yogurt, como su uso en biopelículas para reparar daño a tejidos por quemaduras, hasta su actividad antiirritante, antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, anticancerígena, entre muchas otras como ha sido revisado a profundidad por Öner et al. (2016). Hay aplicaciones tanto para los oligosacáridos de bajo grado de polimerización (DP 2-10) conocidos como fructooligosacáridos o FOS, así como de las levanas de bajo y alto peso molecular ($M_w = 8,3$ y $2,200$ KDa, respectivamente).

La síntesis de levana microbiana es llevada a cabo por una sola enzima, una fructosiltransferasa denominada levansacarasa (EC 2.4.1.10). Un análisis de la secuencia de dos levansacarasas (*Zymomonas mobilis* y *B. subtilis*), arrojó que en al menos 107 géneros de bacterias cuyo genoma se ha secuenciado, se han encontrado levansacarasas putativas, lo que nos sugiere su enorme distribución en la naturaleza (González-Garcinuño et al. 2018). Hasta la fecha se ha reportado la estructura cristalográfica de cinco levansacarasas, incluida la de *B. subtilis*. En el grupo de Biotecnología del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, se ha trabajado con diversas enzimas provenientes de bacterias lácticas, pero con mayor profundidad con *Bs-SacB*, debido a que se trata de una enzima robusta que se puede producir de manera muy eficiente expresando el gen en *E. coli*. *Bs-SacB* tiene además la característica de producir levana con una distribución bimodal de pesos moleculares (un polímero de 8.3 KDa y otro de 2,200 KDa). En efecto, diversos trabajos previos, además de los realizados en el grupo, han permitido definir condiciones de reacción que dan lugar a la distribución bimodal de pesos moleculares del producto (levana de bajo y alto peso molecular), así como condiciones de reacción en las que la enzima sintetiza de manera casi exclusiva cada una de las dos distribuciones. Dentro de los factores más estudiados destacan: la temperatura, la concentración de sustrato, la presencia de solventes orgánicos, la fuerza iónica, el estado de la enzima (libre o inmovilizada) y la concentración de enzima, como ha sido recientemente revisado por

Ortiz-Soto et al. (2019). Así mismo, se han descrito vías alternas de síntesis de series tales como las oligofruktananas, neofruktananas y blastósidos, además de las fruktanas.

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado desde hace varios años a *Bs-SacB* para tratar de describir su especificidad y su muy particular mecanismo de reacción, quedando aún muchas incógnitas por resolver, particularmente las relativas al mecanismo de elongación de las cadenas y su alcance. Por ejemplo, se ha constatado que la levana de bajo peso molecular se sintetiza en *Bs-SacB* mediante un mecanismo *no procesivo*, pero se desconoce porqué la síntesis se detiene cuando el polímero alcanza en promedio un peso molecular en particular (8.3 kDa), y porqué en determinadas circunstancias, la síntesis continúa hasta alcanzar muy altos pesos moleculares (>2,200 kDa) (Raga-Carbajal et al. 2016), habiendo condiciones en las que prevalecen ambos. La respuesta a estos cuestionamientos pudiera encontrarse no solo en el mecanismo de elongación de la enzima, sino en las características fisicoquímicas del producto, la levana. Dado que existe interés tanto desde un punto de vista de investigación básica como aplicada de controlar la síntesis de FOS, así como de las levanas de diversos pesos moleculares, nos interesa explorar la hipótesis de un control de la síntesis de levana que involucre tanto los factores moleculares relativos a la enzima y su mecanismo de acción, como aquellos hasta ahora no considerados como son los relacionados con las propiedades fisicoquímicas de las levanas en solución acuosa. En efecto, se sabe que las levanas tienen la particularidad de formar agregados en forma esférica de un tamaño de al menos 100 nm. Este comportamiento ha sido descrito para levanas de alto peso molecular, pero se desconoce hasta el momento si levanas de bajo peso molecular son capaces de formar estas “nanopartículas”. Esta estructura particular de la levana llama la atención ya que pudiera ser un factor más que contribuya a definir el peso molecular que alcanza la levana durante la síntesis. Nuestro interés en este proyecto es analizar la evolución de las nanoestructuras de levana durante la síntesis, con el fin de que, en combinación con los factores estructurales que hemos señalado -incluida la estructura misma de la enzima- sea posible describir en detalle la síntesis y elongación de la levana.

En nuestro grupo de investigación contamos con mutantes de *Bs-SacB*, que se reporta, alteran el mecanismo de elongación, las cuales nos ayudarían a complementar el análisis del mecanismo de elongación y de comportamiento de las levanas en solución. Tal es el caso de mutantes tales como **S164A** que produce en mayor proporción levana de bajo peso molecular, o la mutante **H243L** que solo produce levana de alto peso molecular, ambas obtenidas por Ortiz-Soto et al. (2008).

3 GENERALIDADES

3.1 Estructura química de levana

La levana es un homopolisacárido no estructural de fructosa, producido por diversos microorganismos y algunas especies de plantas, con enlaces β -2,6 y algunas ramificaciones en β -2,1 entre las fructosas que la componen (figura 1). Se ha reportado que para la levana de bajo peso molecular de *Bs-SacB*, pueden ser hasta 22 unidades fructosilo por ramificación (2 ramificaciones), en cambio para la levana de alto peso molecular podrían ser 11 unidades fructosilo por ramificación, teniendo hasta 1,120 ramificaciones (Tanaka et al. 1980). Junto con la inulina, la levana forma parte de las fructanas más comunes, la primera conformada por residuos de fructosa con enlaces β -2,1. Las fructanas forman parte de la reserva energética de cerca del 12 % de plantas superiores (Olvera et al. 2008). En el caso de la inulina es más común encontrarla en plantas, entre las que se encuentran la cebolla, el plátano y la chicoria, siendo esta última la principal fuente de obtención (Wichienhot et al. 2011). Por otro lado, la levana es encontrada principalmente en microorganismos, más precisamente en bacterias.

El interés en la levana parte de su diversidad estructural, sus características fisicoquímicas y su variada gama de potenciales aplicaciones, entre las que destacan su uso como nanoportadores para el suministro de fármacos de diverso origen, péptidos y proteínas, como es el caso de la vancomicina (Sezer et al. 2011; Sezer et al. 2017). Así mismo, se ha reportado una variedad de propiedades nutraceuticas como su actividad antiviral, antitumoral, antioxidante, antiirritante, antiinflamatoria; también se ha descrito su función como prebiótico o como sustituto de grasa (Öner et al. 2016). Cabe mencionar que la mayoría de estas potenciales aplicaciones están relacionadas con el peso molecular de la levana.

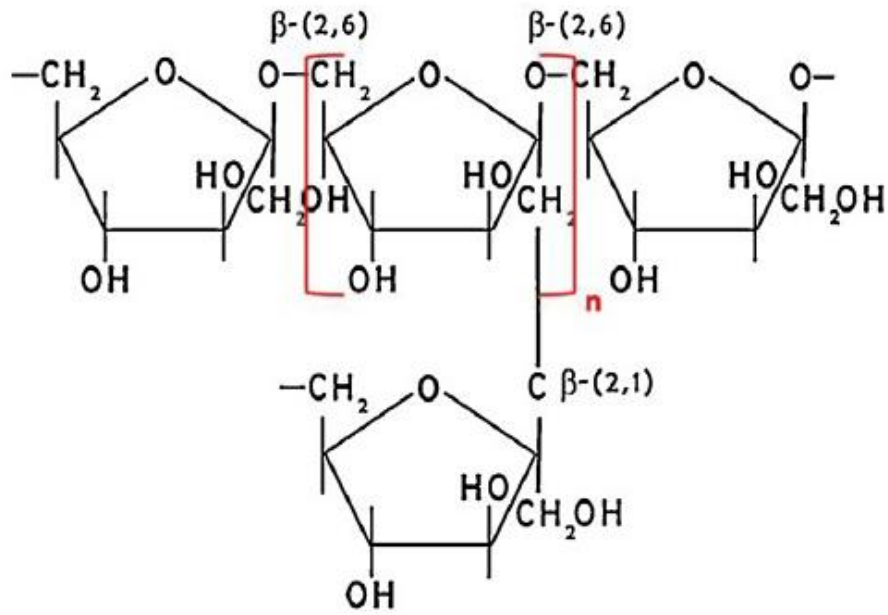


Figura 1. Estructura de la levana. Se muestra la unión de los residuos fructosilos por enlaces β -2,6 y las ramificaciones por enlaces β -2,1.

Dentro de las características físicas que hacen interesante a la levana, destacan su baja viscosidad intrínseca (Ehrlich et al. 1974), su alta solubilidad en agua (Arvidson et al. 2006) y su baja o nula solubilidad en muchos solventes orgánicos (Ullrich, 2009). Se ha reportado que en solución, la levana forma nanopartículas esféricas de al menos 100 nm, de donde se sugiere que provienen algunas de sus propiedades (Newbrun et al. 1971).

3.2 Síntesis de levana

La levana sintetizada por plantas requiere de la intervención de diversas enzimas, en un primer paso la enzima sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST) sintetiza 1-kestosa como intermediario a partir de dos moléculas de sacarosa y dependiendo de la planta, la levana puede ser sintetizada por una o la acción de varias enzimas, entre ellas, la sacarosa:fructana 6-fructosiltransferasa (6-SFT) o glucosa-fructana-fructana 6-fructosiltransferasa (6G-FFT) que generan enlaces β -2,6, esta última también puede generar enlaces β -2,1 (Ritsema & Smeekens, 2003). La levana sintetizada por estas enzimas alcanza un peso molecular relativamente pequeño (2-33 kDa) (Rhee et al. 2005),

comparada con el alto peso molecular de la levana sintetizada por bacterias. En el caso de la síntesis bacteriana, cabe destacar primeramente que la levana es sintetizada por una sola enzima, la levansacarasa (EC 2.4.1.10), enzima perteneciente a la familia GH68 de las glicosiltransferasas. La levansacarasa tiene actividad de transferasa, que cataliza la transferencia de un residuo fructosilo de la sacarosa a una variedad de aceptores; y de hidrólisis, cuando una molécula de agua es el aceptor. Ambas actividades tienen un comportamiento cinético del tipo Michaelis-Menten (Chambert et al. 1974), y pueden ser moduladas por diferentes factores como la concentración de sacarosa, la presencia de solventes orgánicos, temperatura, fuerza iónica y la concentración de enzima (Tanaka et al. 1980; Porras Domínguez et al. 2015).

La reacción se inicia cuando una molécula de sacarosa actúa como donador de un grupo fructosilo (Chambert et al. 1974). La sacarosa es también el principal aceptor del residuo fructosilo: cuando es unido al carbono 1 de la fructosa en la molécula de sacarosa, se forma el compuesto 1-kestosa, mientras que cuando es unido al carbono 6 de la fructosa se genera 6-kestosa; cuando la transferencia es a la glucosa de la sacarosa en el carbono 6 entonces se sintetiza neokestosa. Al menos en *Bs-SacB*, estas moléculas son conocidas como intermediarios primarios en la síntesis de levana de bajo peso molecular, debido a su temprana aparición en la reacción (hasta el 20% de conversión), y como puede comprobarse, resulta de una relajada especificidad inicial de la enzima.

La transferencia del residuo fructosilo se puede dar también a la glucosa libre en solución, lo que resulta en la síntesis nuevamente de sacarosa cuando se une al carbono 1, en blastosa cuando se transfiere al carbono 6 o en ercosa cuando es unido al carbono 2. De igual manera, la molécula de fructosa puede también actuar como aceptor generando levantobiosa cuando el fructosilo es unido al carbono 6 o inulobiosa cuando es unido al carbono 1. En el proceso de síntesis con *Bs-SacB*, estas moléculas son conocidas como aceptores secundarios, ya que son observados después de un cierto avance de la reacción, es decir, después de que se alcanza el 20% de conversión de la sacarosa. Todas estas series de fructooligosacáridos pueden ser aceptores subsecuentes del residuo fructosilo, dando lugar a los intermediarios de la síntesis de levana de bajo peso molecular o, si son elongados lo suficiente, formando parte de la levana de alto peso molecular (figura 2) (Santos-Moriano et al. 2015; Raga-Carbajal et al. 2018).

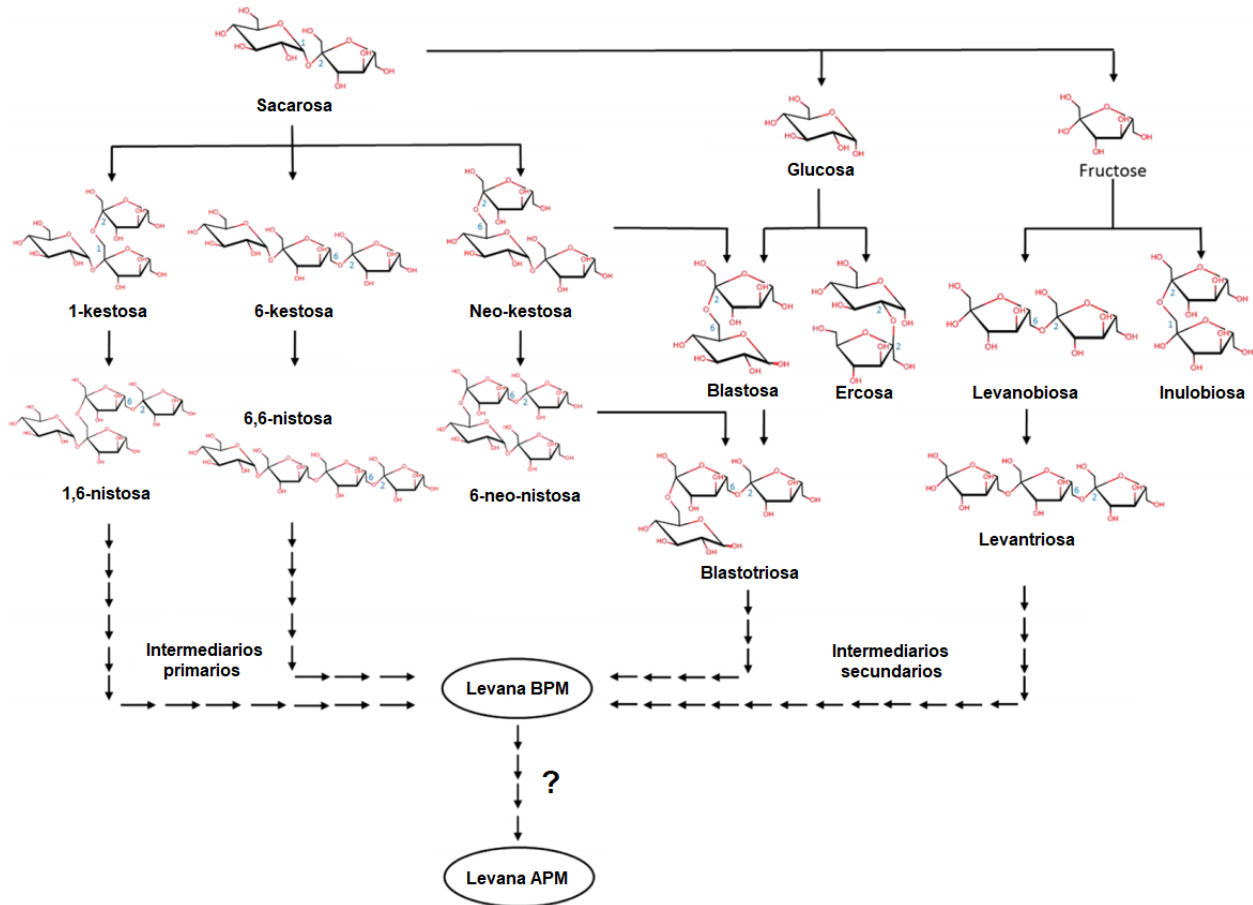


Figura 2. Diagrama de los intermediarios y productos de las reacciones de transfructosilación y de hidrólisis de la levansacarasa de *B. subtilis* en la síntesis de levana de bajo peso molecular, modificada de Raga-Carbajal et al. (2018).

En este sentido, se han descrito dos posibles mecanismos de elongación de levana: el *procesivo* y el *no procesivo*. En el caso del mecanismo *procesivo*, los residuos de fructosa se incorporan sucesivamente a la cadena hasta finalizar el proceso de elongación, lo que requiere que la cadena de levana esté disponible para alargarla, asociada de alguna manera a la enzima. Por otro lado, en el mecanismo *no procesivo*, el producto recién fructosilado se libera de la enzima – como sucede en el mecanismo de reacción tipo “ping pong”- hasta que una vez más, vuelve a ser incorporado como sustrato para reaccionar con la enzima, para ser elongado nuevamente, este proceso se repite hasta obtener un producto de mayor peso molecular (Ozimek, et al., 2006).

Lo anterior sugiere que se realizan unas 50 adiciones en el caso de la levana de bajo peso molecular, o más de 50,000 en el caso de la levana de alto peso molecular. La diferencia entre estos dos mecanismos es sorprendente y hasta la fecha no ha sido descrita a profundidad por los grupos de investigación que trabajan con levanas.

Se ha sugerido que el mecanismo *no procesivo* da lugar a la levana de bajo peso molecular, mientras que la levana de alto peso molecular resulta de un mecanismo *procesivo* (Ozimek et al. 2006). Para el caso de la levansacarasa de *B. subtilis* se ha propuesto que durante la síntesis participan simultáneamente los dos mecanismos de elongación debido a que bajo ciertas condiciones de reacción se sintetiza tanto levana de alto como de bajo peso molecular (Raga-Carbajal et al. 2016).

Existen desde luego factores fisicoquímicos que afectan la síntesis de levana como la temperatura, presencia de solventes orgánicos como etanol o polietilenglicol o la fuerza iónica (Tanaka et al. 1980). Sin embargo, otro factor que afecta la síntesis de levana y mayormente su peso molecular, es la fuente (estructura) de la enzima. En general, se ha descrito que enzimas provenientes de bacterias Gram-positivas sintetizan levana, ya sea de alto o bajo peso molecular. En cambio, las bacterias Gram-negativas en su gran mayoría solo son capaces de sintetizar fructooligosacáridos (Hill et al. 2019). Dentro de las primeras, se ha reportado bacterias como *Brenneria goodwinii* (Liua et al. 2017), que destacan por sintetizar levana de alto peso molecular, a diferencia de otras bacterias que sintetizan levana de bajo peso molecular como *B. megaterium* (Homann et al. 2007), en cambio existen levansacarasas tales como la de *B. subtilis* (Tanaka et al. 1980) y *B. licheniformis* (Nakapong et al. 2013) que, como hemos descrito ya, bajo ciertas condiciones de reacción dan lugar también a levana con una distribución bimodal de pesos moleculares. En este aspecto cabe mencionar la variabilidad de levana en cuanto a las ramificaciones presentes en su estructura. Por ejemplo, se ha reportado que la levana de *Halomonas* sp. AAD6 y de *Brenneria* sp. EniD312 no contienen ramificaciones (Xu et al. 2018). En cambio, las levanas sintetizadas por las enzimas de *B. subtilis*, *Z. mobilis* y *Erwinia herbicola*, contienen un 10.5% 11.0% y 10.2 % de ramificaciones respectivamente (Benigar et al. 2014). Algo interesante es el peso molecular de *Brenneria* sp. EniD312, ya que es la levana más grande reportada hasta el momento con un peso molecular de 141,000 kDa (Xu et al. 2018).

3.3 *Bs*-SacB

3.3.1 El cristal de *Bs*-SacB y la reacción

Meng & Fütterer (2003) determinaron la estructura cristalográfica de *Bs*-SacB, con una resolución a 1.5 Å. Esta enzima tiene un peso molecular de 52 kDa y presenta un plegamiento tipo β -propela de 5 hojas formadas a su vez por 4 hebras β antiparalelas como se muestra en la figura 3.

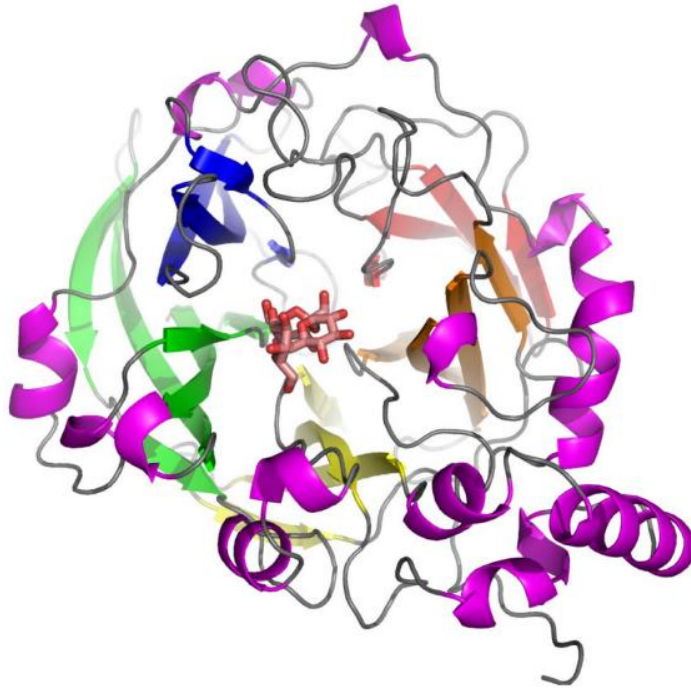


Figura 3. Estructura de la levansacarasa de *Bs*-SacB.

Gracias a la determinación de la estructura de *Bs*-SacB, se han podido identificar los aminoácidos involucrados en la reacción de transferencia. La triada catalítica identificada, consta de los residuos D86, E342 y D247, el primero actúa como nucleófilo mientras que el segundo actúa como un catalizador ácido base, el residuo D247 actúa como estabilizador formando puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 4 del residuo fructosilo (Meng & Fütterer, 2003). De igual forma se han identificado otros aminoácidos participantes en la reacción ubicados dentro de subsitios, que, si bien son clave en la reacción y en la definición de la especificidad de la enzima, no interactúan directamente con el sustrato. Dentro de estos destacan los que interactúan con la fructosa en el denominado subsitio -1, compuesto de W85, R246, D247 y W163, mientras que el

subsitio +1 que interactúa con la glucosa, está compuesto de R360, E340, E342 y R246 (Davies et al. 1997). Más recientemente se identificó el subsitio +2 compuesto de N242 y Y237, que se sugiere está relacionado con la unión al aceptor del residuo fructosilo (Meng & Fütterer, 2008).

El mecanismo de reacción “Ping-Pong” ha sido propuesto para *Bs*-SacB, vía la formación de un intermediario fructosilo-enzima. Este residuo fructosilo se forma por el ataque nucleofílico del residuo D86 al carbono 2 de la fructosa, en una molécula de sacarosa. Posteriormente, un protón del E342 es transferido al grupo saliente, la glucosa (figura 4a), seguido de lo cual el grupo del ácido desprotonado remueve un protón de la molécula aceptora generando un anión altamente reactivo que realiza un ataque nucleofílico sobre el enlace éster del complejo enzima-fructosa (figura 4c), para así llevar a cabo la transferencia (figura 4d) (Seibel et al. 2006).

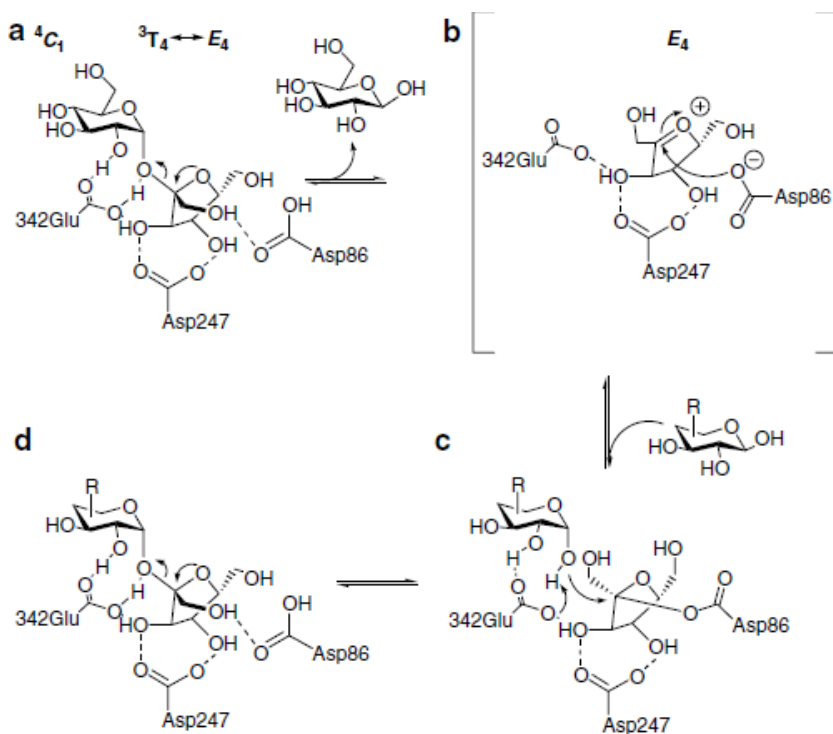


Figura 4. Mecanismo de reacción de la levansacarasa de *Bs*-SacB.

3.3.2 Factores que afectan el peso molecular de la levana sintetizada por *Bs-SacB*

El estudio de diversos factores que afectan la síntesis de levana en la levansacarasa de *B. subtilis*, en especial el peso molecular que alcanza durante la reacción se inició en la segunda mitad del siglo pasado (Tanaka et al. 1980). Sin embargo, no dejan de reportarse avances en la descripción de dicho proceso. Recientemente se describió el efecto de la concentración de enzima en el peso molecular del producto sintetizado. Este fenómeno, inicialmente descrito por Porras-Domínguez et al. (2015) y analizado a mayor profundidad por Raga-Carbajal et al. (2016), plantea una hipótesis que actualmente es analizada desde diversos ángulos por el grupo de Biocatálisis del Instituto de Biotecnología. En efecto, como se puede observar en los cromatogramas de la figura 5, estos autores describieron que a 1 U/mL (equivalentes a una concentración de enzima de 5.5 µg/mL), el peso molecular de la levana sintetizada presenta un comportamiento bimodal (alto y bajo peso molecular). En cambio, cuando la reacción se lleva a cabo a bajas concentraciones de enzima, como puede ser 0.1 U/mL (equivalentes a 0.55 µg/mL) el peso molecular de la levana sintetizada es casi exclusivamente de alto peso molecular. Así mismo, cuando la reacción se realiza con un exceso de enzima como puede ser 10 U/mL (equivalente a 55 µg/mL) la reacción se dirige casi exclusivamente hacia la síntesis de levana de bajo peso molecular. Además de estos análisis, en el mismo estudio se corroboró que este fenómeno no está controlado por la cinética de la reacción, es decir, que mientras más rápida se haga la síntesis, más pequeño resulte el polímero. Expresado de otra forma, se demostró que el efecto realmente es ocasionado por la concentración de enzima. Para demostrar lo anterior, Raga-Carbajal et al. (2016) realizaron reacciones a baja concentración de enzima (0.55 µg/mL) de *Bs-SacB*, en la cual se espera la síntesis de levana de alto peso molecular; sin embargo, al adicionar en la reacción enzima sin actividad (una variante con dos mutaciones en el sitio catalítico, E342A/D86A) hasta alcanzar una concentración de 55 µg/mL, se observó que la distribución del peso molecular del polímero alcanzada al final de la reacción resultaba ser de bajo peso molecular, equivalente al obtenido a esa concentración total de enzima, pero activa. La enzima inactiva tiene dos mutaciones en el sitio catalítico que no afectan su plegamiento, pero la inactivan totalmente.

La hipótesis que surge a partir de este trabajo con el fin de explicar este fenómeno es la posible interacción enzima-enzima o enzima-levana-enzima como requisito para la síntesis de levana de bajo peso molecular. Complementario a estos experimentos y con el fin de explorar la agregación o formación de multímeros, se describió que altas concentraciones de enzima no provocan su oligomerización, esto anterior analizado por dispersión dinámica de la luz (DLS por sus siglas en inglés) y calorimetría de titulación isotérmica (ITC por sus siglas en inglés) (Raga-Carbajal et al. 2016).

Así, se plantea que, al tener una alta concentración de enzima (55 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la levana que está siendo elongada y que de alguna manera podría estar asociada a la superficie de la enzima, podría ser desplazada por la interacción con la superficie de otra molécula de enzima, deteniendo el proceso de elongación, y dando lugar a la levana de bajo peso molecular. Por el contrario, cuando se tiene una concentración baja de enzima (0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$) disminuye en varios órdenes de magnitud las interacciones enzima-levana-enzima, permitiendo que la levana siga siendo elongada hasta alcanzar un peso molecular considerablemente más alto.

Este fenómeno no se ha reportado para otras levansacarosas y concretamente, se ha demostrado que en la levansacarasa de *B. megaterium* esto no ocurre, sugiriendo que este efecto es característico de *Bs-SacB* (Ortiz-Soto et al. 2018).

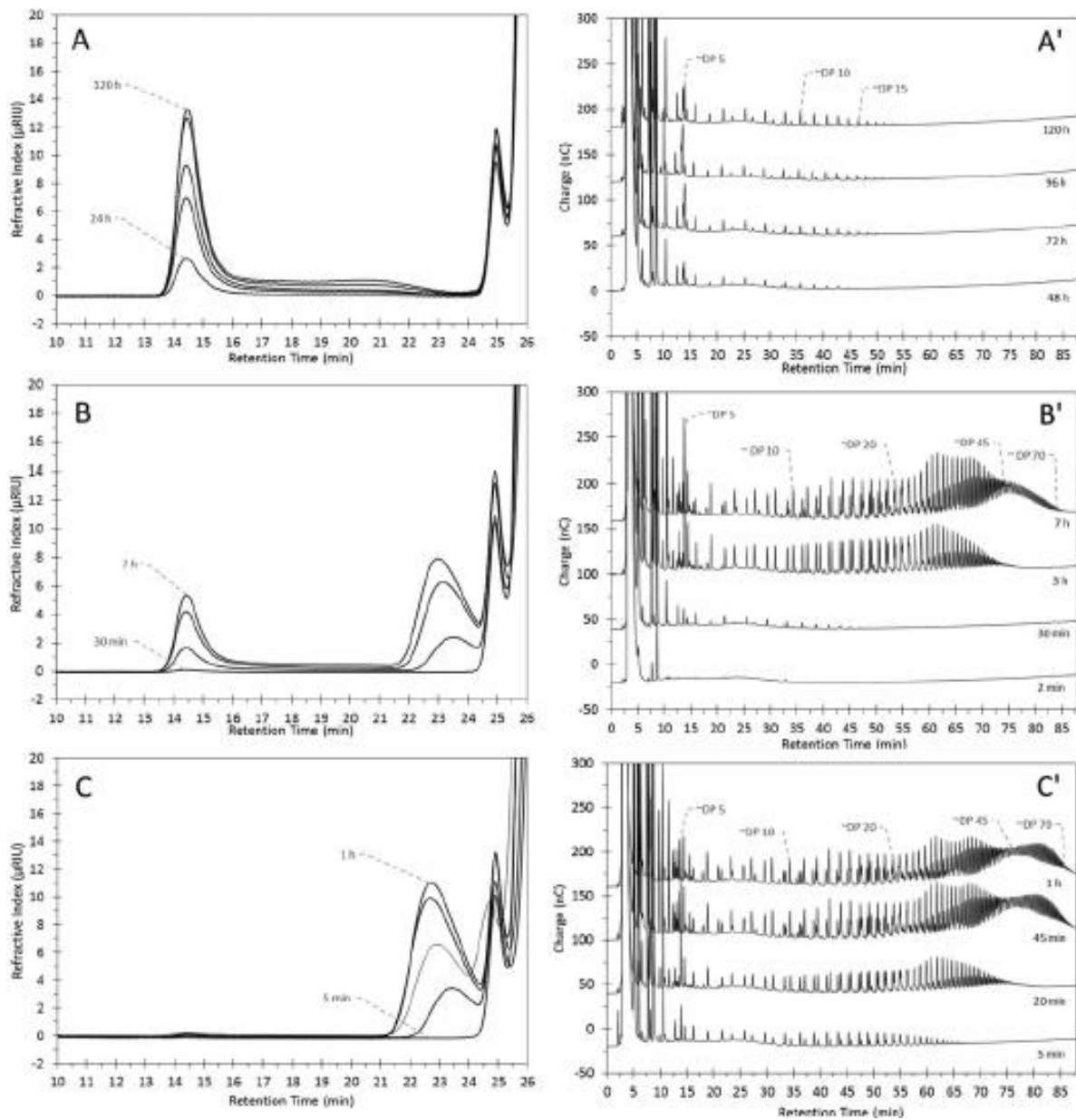


Figura 5. Efecto de la concentración de enzima en el mecanismo de elongación de levana sintetizada por *Bs-SacB*. A, B y C son cromatogramas obtenidos con HPSEC; A', B' y C' son cromatogramas obtenidos con HPAEC-PAD. A y A' reacciones a 0.55 µg/mL de *Bs-SacB*; B y B' reacciones a 5.5 µg/mL de *Bs-SacB*; C y C' reacciones a 55 µg/mL de *Bs-SacB*. Todas las reacciones se realizaron a 37°C y 100 g/L de sacarosa. Imagen tomada de Raga-Carbajal et al. (2016).

3.4 Relación estructura/función de *Bs-SacB*

Ortiz-Soto et al. (2019) analizaron las estructuras cristalográficas que hasta ese momento se encontraban disponibles: *Bs-SacB*, (1oyg y 1pt2), la levansacarasa de *B. subtilis*; *Bm-LS* (PDB 3om2), la levansacarasa de *B. megaterium*; *Ea-LS* (PDB 4d47), la levansacarasa de *E. amylovora*; y *Gd-LS* (PDB 1w18), la levansacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, con el fin de definir una posible relación entre la estructura de estas enzimas y el peso molecular de los productos que sintetizan. Las estructuras antes mencionadas presentan un tipo de plegamiento similar, una β -propela, y el sitio de unión a sacarosa se encuentra conservado, con algunas diferencias en los lazos que lo rodean. Por otro lado, *Bs-SacB* y *Bm-LS* tienen una topología similar en cuanto al sitio activo (su área y su volumen). Sin embargo, *Bs-SacB* es capaz de sintetizar levana de alto peso molecular ($\gg 2,200$ kDa), mientras que *Bm-SacB* sintetiza principalmente fructooligosacáridos. De este análisis de los sitios de unión de las 4 levansacarosas cristalizadas, se concluyó que no existe relación entre su estructura y el volumen del sitio catalítico con el peso molecular de la levana que estas enzimas sintetizan.

Así mismo se ha estudiado la especificidad hacia el tamaño de la levana a partir de estudios de relación estructura/función de las levansacarosas realizando mutagénesis dirigida y analizando las consecuencias en la especificidad del producto, concretamente su peso molecular. En el caso de *Bs-SacB*, las mutaciones se han realizado en ciertos aminoácidos cercanos al sitio catalítico o en los subsitios de unión, obteniéndose modificaciones en la actividad transferasa de la enzima para el caso de la mutación **R360H** (Chambert & Petit-Glatron, 1991) o en la distribución de pesos moleculares, para las mutantes **S164A** y **H243L** (Ortiz-Soto et al. 2008). En algunos casos, las mutaciones han llevado a la pérdida de la capacidad de sintetizar polímero, sintetizándose únicamente FOS (mutaciones en **R360S**, **R433A**, **Y429N** y **N242H**) (Ortiz-Soto et al. 2008; Beine et al. 2008). En la figura 6 se muestran la posición de las mutantes antes mencionadas con respecto a la triada catalítica.

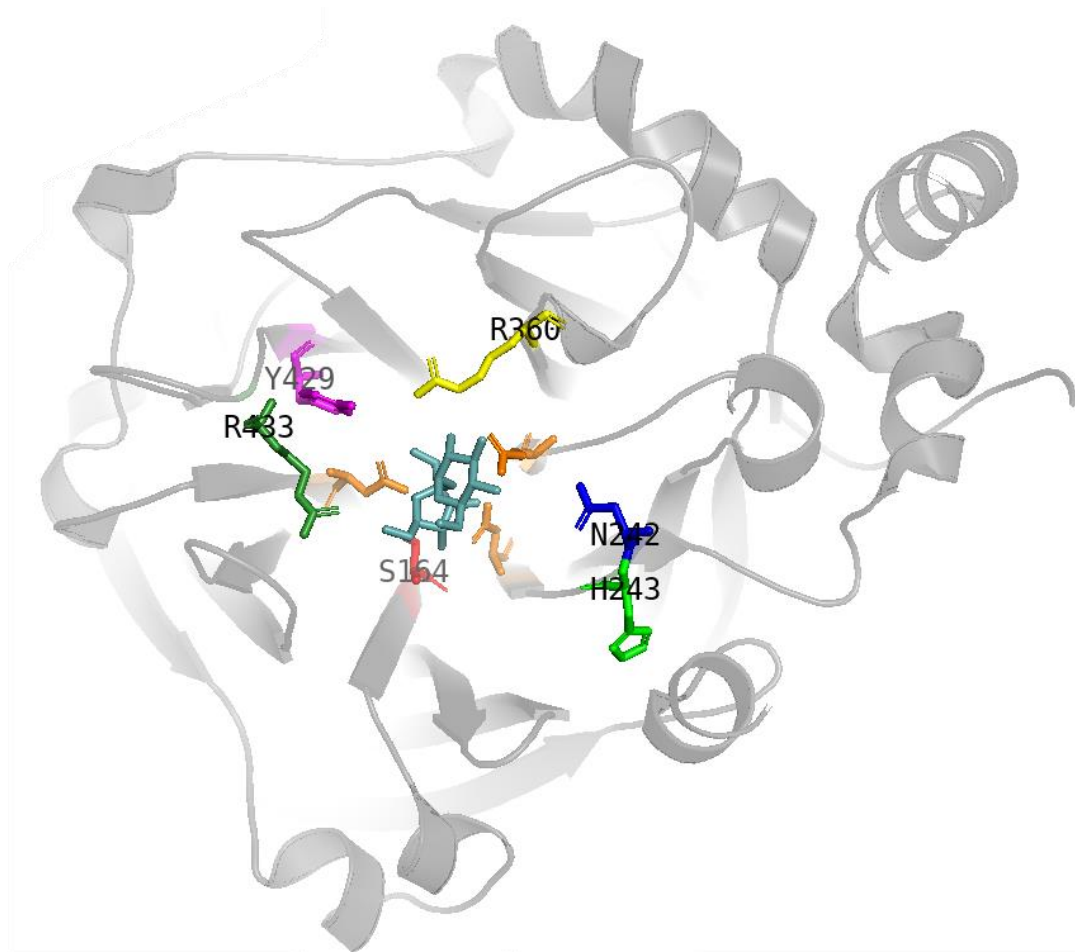


Figura 6. Posición de algunas mutantes de *Bs-SacB*. En color naranja se muestra la triada catalítica y en azul la molécula de sacarosa.

Algunas de las mutantes antes mencionadas se construyeron en el laboratorio de Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en un trabajo en el que se modificaron de manera independiente 10 aminoácidos, todos ellos cercanos a la triada catalítica y ubicados dentro de los subsitios de unión a los aceptores. Destacan de este trabajo 5 mutantes por los cambios observados en el peso molecular de la levana sintetizada: **H243L**, que sintetiza preferentemente levana de alto peso molecular; **S164A**: que sintetiza preferentemente levana de bajo peso molecular, y **R360S**, **Y429N** y **R433A**, que sintetizan fundamentalmente FOS (Ortiz-Soto et al. 2008). En la tabla 1 se muestran los datos cinéticos de cada mutante, así como su pH óptimo y su estabilidad térmica.

Tabla 1. Parámetros cinéticos, estabilidad térmica a 40 °C ($t_{1/2}$) pH óptimo de *Bs-SacB* y algunas de sus mutantes

| Levansacarasa | Km (mM sacarosa) | Kcat (s ⁻¹) | Kcat/Km (s ⁻¹ mM ⁻¹) | $t_{1/2}$ (min) | pH optimo |
|----------------|---------------------|-------------------------|--|-----------------|-----------|
| <i>Bs-SacB</i> | 8 | 164.6 | 20.3 | 52 | 6 |
| S164A | 2.5 | 6.4 | 2.6 | 628 | 6 |
| H243L | 10.5 | 141.5 | 13.5 | 7.9 | 6 |
| I341L | 7.4 | 166.3 | 22.6 | 31.4 | 6 |
| R360K | 30 | 170.2 | 5.6 | 42.11 | 6 |
| R360S | 154 | 13.5 | 0.09 | 17.21 | 6 |
| G361F | 297.3 | 57.4 | 0.19 | <1 | 6 |
| Y429N | 319.4 | 6.3 | 0.02 | 47.04 | 5-6 |
| R433A | 29.3 | 87.5 | 2.98 | 16 | 6-7 |

En este sentido, la mutante **H243L** podría servir como objeto de estudio comparativo ya que sus características cinéticas son similares a las de *Bs-SacB*, no así su comportamiento en relación con la síntesis de levana, debido a que esta mutante es capaz de sintetizar levana con una distribución monomodal (alto peso molecular). Esta mutación afecta su estabilidad térmica, muy probablemente por los contactos polares que mantiene con los aminoácidos K189, D219, Q226 y V228 a través de dos moléculas de agua (figura 7). También se sabe que esta mutante es más hidrolítica que *Bs-SacB*, posiblemente por disminuir la afinidad a la molécula aceptora (sacarosa o levana) debido a que N242 se encuentra en el subsitio +2.

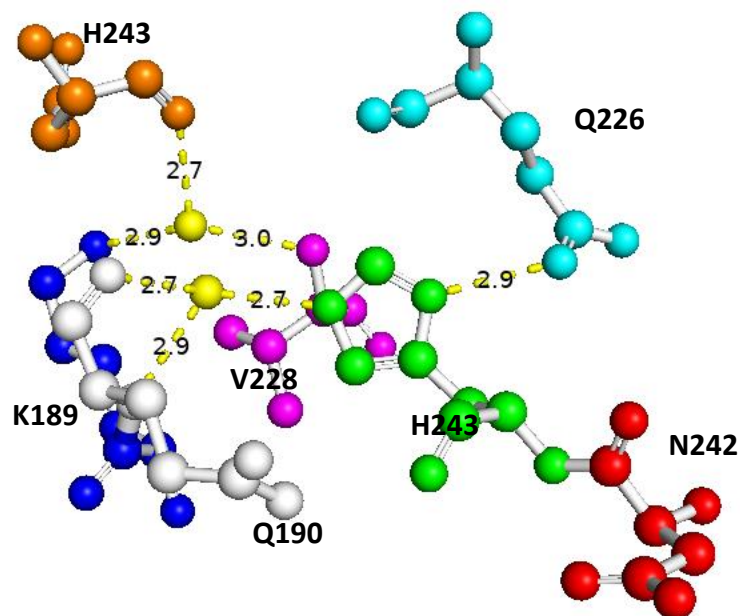


Figura 7. Distancias atómicas entre el aminoácido H243, residuos críticos en *Bs-SacB* y moléculas de agua (amarillo). Distancias mostradas en Å.

En resumen, estos antecedentes muestran que la síntesis de levana y muy particularmente, el peso molecular que alcanza la levana sintetizada por *Bs-SacB*, puede ser modulada por diferentes condiciones de reacción o condiciones estructurales. Sin embargo, aun con toda la información reportada hasta el momento, no se ha podido definir un factor determinante que pueda explicar claramente la capacidad de *Bs-SacB* de sintetizar levana con distribución bimodal con una amplia diferencia entre el peso molecular de ambas levanas. Tampoco se ha considerado si la estructura que adopta la levana conforme se sintetiza y entra al medio de reacción podría igualmente definir las posibilidades de ser elongada.

3.5 Nanopartículas de levana

Una de las características más destacadas de la levana, es su capacidad de agregarse hasta formar nanopartículas (Newbrun et al. 1971). Esta capacidad puede deberse a la estructura de la levana, es decir, a la naturaleza anfífilica de la molécula y su capacidad para dar lugar a interacciones intermoleculares tales como puentes de hidrógeno o del tipo Van der Waals (Gonzales-Garcinuño, 2019). Existen diversos reportes en los que se analiza el tamaño de partícula de levanas producidas por enzimas provenientes de

diversos microorganismos. Por ejemplo, la levana producida por las enzimas de *B. subtilis*, *Z. mobilis*, *E. herbicola* y *Brenneria* sp. EniD312 tienen diámetro de partícula promedio de 480 nm, 500 nm, 340 nm y 176 nm respectivamente; el peso molecular de estas levanas supera los 31,000 kDa. Cabe mencionar que al menos para el caso de las 3 primeras levanas, este tamaño de partícula se utilizó para calcular su peso molecular, siendo lógico que, a mayor tamaño de partícula, mayor peso molecular. Sin embargo, destaca el caso de la levana de *Brenneria* sp. EniD312, que teniendo un peso molecular mayor que la levana de *B. subtilis*, tiene un menor tamaño de partícula. Si bien, los métodos utilizados para analizar el tamaño de partícula no fueron los mismos (DLS y SLS), lo mismo para calcular su peso molecular, pareciera que no hay una relación directa entre el peso molecular y el tamaño de partícula. (Benigar et al. 2014; Xu et al. 2018).

La levana de *Bs-SacB* no ha sido analizada con profundidad, y se desconoce si la levana de bajo peso molecular también es capaz de agregarse en nanopartículas. Se desconoce también, si el hecho de que la levana se integre en nanopartículas o agregados, podría definir el que se encuentre disponible para que la enzima pueda utilizarla como aceptor manteniendo el proceso de elongación. Nuestra hipótesis establece que esta característica particular de la levana, la de agregarse en nanopartículas, puede ser un factor determinante para la elongación.

Tanaka y et al. (1980) analizaron la capacidad de la levana de bajo peso molecular como posible aceptor en la reacción, de igual manera este experimento fue llevado a cabo en nuestro laboratorio. Se encontró en ambos casos que *Bs-SacB* no puede elongar esta levana. Por ello, proponemos que posiblemente la enzima no puede reconocer a la levana para su elongación debido a que se encuentra embebida en los agregados. Por otra parte, levanas más pequeñas y FOS, los cuales posiblemente no forman agregados, si pueden ser reconocidos por la enzima como aceptores y ser elongados.

Estos factores nos llevan a pensar que el comportamiento de la levana en solución es un factor que influye de una manera importante para definir el peso molecular que alcanza la levana durante su síntesis y quizás la respuesta a las interrogantes referentes a la elongación de levana, pudieran ser contestadas analizando a mayor profundidad este fenómeno.

3.6 Peso molecular de la levana

Otra de las características de la levana es su baja viscosidad intrínseca, comparada con la de otros polisacáridos como la celulosa o la goma xantana para la que se reportan viscosidades intrínsecas de hasta 50 dL/g (Carriere et al. 1993; Jumel et al. 1996). Por el contrario, para la levana se reportan viscosidades intrínsecas muy bajas, de entre 0.07 a 0.18 dL/g, para levanas de 16,000 a 24,000 KDa (Ehrlich et al. 1974). Estos datos de viscosidad intrínseca son parecidos a los que presentan los poliestirenos altamente ramificados (0.05 – 0.1 dL/g) con un peso molecular de 53 kDa a 22,300 KDa (Striolo et al. 2001). Una baja viscosidad intrínseca y alto peso molecular indican una forma esférica y muy compacta de las moléculas (Arvidson et al. 2006).

Considerando que la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) separa a las moléculas con base a su volumen hidrodinámico y la información de su peso molecular puede ser obtenida a partir de un método absoluto (SEC-MALS) o a partir de la correlación del tiempo de elusión y su masa molecular obtenido a partir de una calibración (SEC-RI). En este último método, se debe asumir el error considerable que se puede introducir al definir el peso molecular, ya que se requiere usar estándares que no necesariamente se comportan como la molécula a analizar (Held & Kilz, 2014). Por ejemplo, la viscosidad intrínseca de dextranas, que se usan como estándares para obtener el peso molecular de diversos polímeros, van de 0.03 a 0.6 dL/g, pero con peso molecular de 1 a 658 KDa, muy por debajo de los pesos moleculares reportados para levanas de alto peso molecular. Es decir, posiblemente el comportamiento de estos estándares comparado al comportamiento de las levanas genera un error al obtener información sobre el peso molecular.

Por el contrario, los métodos absolutos de medición del peso molecular, tales como la dispersión de luz de multiángulos (MALS, por sus siglas en inglés), no necesitan estándares para obtener información sobre el peso molecular, ya que utilizan la extrapolación de todos los ángulos de dispersión de la molécula a analizar a 0 ° para medir la masa molar precisa y el radio de giro (Held & Kilz, 2014).

En la literatura existen diversos reportes sobre la producción de levana por diversas enzimas, la variabilidad en cuanto el peso molecular podría ser explicado por la fuente de la enzima (microorganismo). Sin embargo, estos reportes no han considerado el posible error al utilizar un método que utiliza otros polisacáridos para su calibración. Por ejemplo, la levana sintetizada por la enzima de *B. licheniformis* RN-01 tiene un peso molecular de hasta 612 kDa, reportada por SEC-RI, en cambio la levana sintetizada por la enzima de *B. licheniformis* 8-37-0-1 tiene un peso molecular de 9,600 kDa, en este caso reportado por SEC-MALS. En la tabla 2, se presenta una revisión sobre el peso molecular reportado en la literatura para levana sintetizada por enzimas provenientes de diferentes microorganismos y el método por el cual fue analizado.

Tabla 2 Peso molecular de levana sintetizada por enzimas provenientes de diferentes microorganismos y el método por el cual fue analizado su peso molecular.

| Microorganismo | Método para determinar el peso molecular | Peso molecular (KDa) | Referencia |
|--------------------------------------|--|----------------------|-------------------------------------|
| <i>B. licheniformis</i> RN-01 | SEC-RI | 612 y 66 | (Nakapong et al. 2013) |
| <i>Pseudomonas aurantiaca</i> s-4380 | SEC-RI | 700 | (Jang et al. 2006) |
| <i>Brenneria</i> sp. Enid312 | SEC-MALS | 141,000 | (Xu et al. 2018) |
| <i>B. goodwinii</i> | SEC-MALS | 140,000 | (Liua et al. 2017) |
| <i>B. licheniformis</i> 8-37-0-1 | SEC-MALS | 9600 | (Lu et al. 2014) |
| <i>B. subtilis</i> Natto | SEC-MALS | 72 y 4146 | (Bazani Cabral de Melo et al. 2015) |
| <i>B. subtilis</i> NRC 33A | VISCOSIDAD INTRÍNSECA | 50-60 | (Abdel-Fattah et al. 2015) |

Hasta el momento no existe un trabajo en el que se compare directamente el peso molecular de levanas obtenido empleando los diversos métodos disponibles. Esto resulta de gran importancia cuando se pretende analizar información relativa a la influencia de diversos factores sobre el mecanismo de síntesis y el peso molecular alcanzado.

4 HIPÓTESIS

El peso molecular que alcanza la levana durante la síntesis por la levansacarasa de *B. subtilis* (*Bs-SacB*) depende de la estructura de la enzima, del comportamiento cinético y de la interacción levana/enzima, pero está además relacionado con la estructura que adopta la levana en solución.

5 OBJETIVO GENERAL

Estudiar las propiedades estructurales de la levana de alto y bajo peso molecular en solución, así como la relación estructura función de la enzima *Bs-SacB* con el fin de analizar la influencia de ambos en la elongación de las cadenas de levana durante la síntesis.

6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el mecanismo de síntesis de levana de la mutante **H243L** y de la mutante **S164A**, comparativamente con la enzima silvestre *Bs-SacB*, con énfasis en el peso molecular de la levana.
- Estudiar las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las levanas de alto y bajo peso molecular en solución, sintetizadas por la enzima silvestre *Bs-SacB* y la mutante **H243L**.
- Analizar la relación entre el tamaño de partícula de la levana sintetizada y su peso molecular durante la reacción de elongación con la enzima silvestre y sus mutantes.

7 METODOLOGÍA Y MATERIALES

7.1 Producción y purificación de *Bs-SacB* y las mutantes (H243L y S164A)

La producción de *Bs-SacB* y de las dos mutantes (**H243L** y **S164A**), se llevó a cabo a partir de la cepa de *E. coli* BL21/pET-22b-*SacB*, BL21/pET-22b-H243L y BL21/pET-22b-S164A, respectivamente. El vector pET-22b contiene un sistema de expresión de un promotor inducido por isopropil β -D-1 tiogalactopiranosido (IPTG). La producción de *Bs-SacB* y de las mutantes, inició inoculando 50 mL de medio LB-ampicilina (200 μ g/mL) con colonias transformadas con el vector correspondiente y se incubaron por 18 horas a 200 rpm a 37°C. De este cultivo, 15 mL se utilizaron como inóculo en 1 litro de medio LB con ampicilina (200 μ g/mL), incubado a 37°C y 200 rpm hasta llegar a una densidad óptica de 0.5-0.6 medida a 600_{nm}. Al alcanzar esta densidad óptica se adicionó isopropil β -D-1 tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.2 mM e incubándose el cultivo por 8 horas adicionales a 18°C, 120 rpm. Finalmente se cosecharon las células por centrifugación a 4500 rpm durante 20 minutos y se lavaron 2 veces con amortiguador fosfatos 100 mM, pH 6. La pastilla de células se resuspendió en 5 mL del mismo amortiguador, añadiéndose posteriormente lisozima a una concentración de 1 mg/mL. En seguida se realizaron 3 ciclos de congelación-descongelación empleando hielo seco, después de los cuales se aplicaron 4 secuencias de sonicación durante 40 segundos totales por lapsos de 10 segundos de sonicación y 30 segundos de descanso utilizando un sonicador Branson Sonifler 250. Se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 9500 rpm durante 40 minutos a 4°C. El sobrenadante se pasó por una columna CM Sepharose®, previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 100 mM y pH 6, y posteriormente se realizó un lavado de la columna con 5 volúmenes del mismo amortiguador. Finalmente, se eluyó la enzima con un gradiente de amortiguador fosfatos 0.1 M pH 6.0 a amortiguador fosfatos 1M pH 6. Se colectaron las fracciones que contienen la enzima y se concentraron por ultrafiltración.

7.2 Concentración de proteína

La concentración de proteína fue cuantificada por el sistema Protein Assay (Bio-Rad) basado en el método de Bradford, empleando seroalbúmina bovina como estándar

7.3 Actividad enzimática

La actividad fue determinada midiendo velocidades iniciales de liberación de poder reductor a partir de una reacción a 100 g/L de sacarosa a 37°C, 300 rpm en amortiguador de acetatos 50 mM mediante la técnica del ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS). Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de equivalentes de glucosa por minuto. La actividad corresponde a la actividad de la levansacarasa global, que incluye su actividad transferasa y su actividad hidrolítica.

7.4 Efecto de diversos parámetros sobre la síntesis de levana

El análisis del efecto de reacciones a una temperatura de 45°C se llevó a cabo a 1 U/mL a 100 g/L de sacarosa en reacciones de 600 μL , con agitación de 300 rpm con tiempo de reacción de 24 h. El análisis del efecto de la concentración de sacarosa a 45 °C se llevó a cabo variando la concentración de sacarosa (100, 300 y 600 g/L) en condiciones a 1 U/mL.

El análisis del efecto de la concentración de enzima se llevó a cabo a 37°C, 100 g/L de sacarosa, 300 rpm en reacciones de 600 μL , con tiempo de reacción de 2 h para el estudio con 10 U/mL, 24 h para 1 U/mL y 144 h para el estudio a 0.1 U/mL, tanto para *Bs-SacB* como para la mutante **H243L**. Para el caso de la mutante **S164A** las reacciones se llevaron a cabo a 0.55 $\mu\text{g/mL}$, 5.5 $\mu\text{g/mL}$ y 137.5 $\mu\text{g/mL}$ (1 U/mL). Para este último caso los tiempos de reacciones fueron 21 días, 14 días y 24 horas respectivamente.

7.5 Inmovilización de *Bs-SacB*

500 µL de esferas de agarosa (Ni-NTA Agarose, QIAGEN) fueron lavadas con buffer fosfatos 50 mM, 300 mM de NaCl, pH 6, en un volumen de 1.5 mL. A las esferas lavadas se agregó enzima en una concentración de 5 mg de enzima/mL de esferas, dejándose en agitación una noche en un agitador rotatorio. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se realizaron 6 lavados (buffer acetatos 50 mM, pH 6) para remover enzima no inmovilizada. Con la enzima ya inmovilizada, se procedió a realizar las reacciones con fuerte agitación (1000 rpm) para impedir la sedimentación de las esferas. Para el caso de *Bs-SacB*, las reacciones fueron llevadas a cabo ajustando la cantidad de catalizador de tal suerte que se tuviese el equivalente a 5.5 µg de proteína inmovilizada/mL de reacción. Se llevó a cabo también una reacción en presencia de 1 mg/mL de la doble mutante inactiva de *Bs-SacB* (**E342A/D86A**). Para el caso de la mutante **S164A** las reacciones fueron llevadas a cabo a 1 U de enzima inmovilizada/mL de reacción, y de igual forma, otra reacción se realizó complementando con 1 mg/mL de la doble mutante inactiva de *Bs-SacB* (**E342A/D86A**). Todas las reacciones fueron llevadas a cabo por duplicado a 100 g/L de sacarosa, 37 °C, pH 6 en buffer de acetatos 50 mM, 1000 rpm.

7.6 Síntesis y purificación de levana.

La síntesis de levana de alto peso molecular sintetizada por *Bs-SacB* (APM-SacB) se llevó a cabo en reacciones de 1L con 1 U/mL de enzima, 100 g/L de sacarosa a 45°C en tiempos de reacción de 24 h. Para la levana de bajo peso molecular sintetizada por *Bs-SacB* (BPM-SacB), la reacción se llevó con 10 U/mL de enzima, 600 g/L a 37°C en tiempos de reacción de 4 h. La levana sintetizada por la mutante **H243L** (APM-H243L) se llevó a cabo en reacciones de 1L con 1 U/mL de enzima, 600 g/L de sacarosa a 37°C en tiempos de reacción de 24 h.

Las levanas se purificaron mediante precipitación con etanol en una relación etanol:solución de levana 3:1, dejando precipitar toda la noche a 4°C. Los precipitados se dializaron para eliminar etanol, glucosa, sacarosa y fructosa. Posteriormente se liofilizaron y fueron almacenados para análisis.

7.7 Análisis del peso molecular de levana y cuantificación de azúcares por cromatografía líquida.

Los análisis se llevaron a cabo en un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific Inc). La concentración de sacarosa, glucosa y fructosa se determinó en una columna Luna-Omega (7.8 x 300 mm) acoplada a un detector de índice de refracción (Shodex), empleando como eluyente una mezcla de acetonitrilo/agua 75:25 (V/V) a un flujo de 1 mL/min a una temperatura de 30°C,

El análisis de la distribución de peso molecular de la levana fue llevado a cabo usando dos sistemas de detección diferentes:

- I) Size Exclusion Chromatography - Refractive Index (SEC-RI). En este sistema se utilizó la columna Ultrahydrogel Linear (7.8 x 300 mm) con un índice de exclusión entre 0.50 y 10,000 kDa, empleando como eluyente nitrato de sodio 0.1 M a un flujo de 0.8 mL/min y a una temperatura de 35°C. La información del peso molecular se obtuvo a partir de los tiempos de elución definidos mediante un detector de índice de refracción (Shodex), y extrapolados en una curva estándar construida con dextranas de 5.2, 11.6 23.8, 48.6 150, 270, 410 y 670 KDa (PSS-Polymer Standards Service - USA Inc)
- II) Size Exclusion Chromatography - (Multi-angle Light Scattering – Refractive Index (SEC-MALS-RI). Se empleó también un sistema de separación conteniendo una precolumna Ultrahydrogel (Waters, Milford, MA), y dos columnas en serie: OHPak SB-807 HQ y OHPak SB-804 HQ (Shodex, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan), con agua desionizada degasificada y filtrada como fase móvil. Todas las separaciones se llevaron a cabo con un flujo de 0.5 mL/min a 30 °C. El detector MALS usado para la determinación del peso molecular de la levana fue un Wyatt DAWN® HELEOS II equipado con un detector de índice de refracción, Optilab T-rEx (Wyatt Tehnology, Santa Barbara, CA USA) para la determinación de concentración. Los datos fueron procesados con el software ASTRA (v.5.3.1.5).

7.8 Análisis de productos de reacción por cromatografía de intercambio iónico

El análisis de oligosacáridos y levana de bajo peso molecular se realizó mediante HPAEC-PAD utilizando una columna Dionex Carbopack PA200 de 3 × 250 mm. Se aplicó un gradiente de acetato de sodio (5–100 mM en 20 min, 100–400 mM en 60 y 10 min para el reequilibrio de las condiciones iniciales) con NaOH 150 mM a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La detección se realizó utilizando el módulo Dionex ED50.

7.9 Determinación del tamaño de partícula de levana

Se determinó el tamaño de partícula de las levanas sintetizadas y purificadas, preparadas a una concentración de 1%. Las mediciones se realizaron a 37°C en un analizador de tamaño de partícula Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Worcestershire, UK). El índice de refracción de la levana utilizado fue 1.65, considerando al agua como dispersante. Se colocó 1 ml de muestra en una celda para espectrofotómetro de 1 cm y se procedió a la medición. Todas las mediciones se hicieron por triplicado.

Los análisis del tamaño de partícula durante la reacción enzimática fueron llevados a cabo directamente del medio de reacción. La colecta de la muestra se realizó a los tiempos a analizar, desactivando la enzima sometiéndola a ebullición por 10 minutos.

7.10 Análisis de partículas en Microscopia Electrónica de Transmisión

Se realizó una reacción enzimática con *Bs-SacB* (10 U/mL, 100 g/L de sacarosa, 37°C). Después de 1 hora de reacción, se desactivó la enzima sometiéndola a ebullición por 10 minutos, concentrando posteriormente el medio por ultrafiltración y dializando la muestra con 5 volúmenes de agua destilada para eliminar sales y monosacáridos, empleando para ello concentradores Corning® Spin-X® con membranas de 10,000 MWCO. La levana purificada se cuantificó por medio de espectrofotometría medida a 480 nm a partir de una curva estándar de levana de bajo peso molecular.

De la solución anterior se tomaron 10 µl y se dejaron caer sobre una rejilla de carbono-cobre y se secaron al aire durante 24 h. En seguida se retiró el exceso de muestra con un papel de filtro y se dejó flotar en una gota (5 µL) de acetato de uranilo al 2% durante 1 min. El exceso de uranilo también se elimina con la ayuda de un papel de filtro. Las

rejillas con las muestras analizadas por el método de tinción negativa se observaron en un microscopio electrónico de transmisión marca ZEISS modelo Libra a un voltaje de aceleración de 120 Kv con cámara digital Gatan.

7.11 Cuantificación de nanopartículas

El método de Análisis de Rastreo de Nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés) fue empleado para determinar la concentración de nanopartículas en un equipo NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) equipado con un módulo de laser a 532_{nm}. Se realizaron diluciones de la muestra a analizar hasta que se llegó a una concentración adecuada para que el equipo pudiera realizar un análisis confiable.

7.12 Precipitación fraccionada de levana

La levana fue fraccionada por precipitación con etanol. A la levana de APM-SacB recién sintetizada (1 U/mL, 45 °C, 100 g/L de sacarosa), se le agregó por goteo etanol absoluto hasta que la solución se tornó turbia. Esta solución fue centrifugada a 10,000 rpm por 1 hora a 4°C. Con el sobrenadante resultante se repitió el proceso de precipitación hasta llegar a 5 fracciones. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía de permeación en gel con detector de índice de refracción y MALS

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Análisis de diversos parámetros que afectan la síntesis de levana en *Bs-SacB* y las mutantes H243L y S164A

Como mencionamos anteriormente, se ha descrito en la literatura que existen factores que afectan la distribución de peso molecular de la levana sintetizada por *Bs-SacB*, quedando claro que, por lo general, la enzima opta por una distribución bimodal con levana de bajo o de alto peso molecular. Algunos de estos factores son la fuerza iónica, la temperatura o presencia de solventes orgánicos, lo que hace pensar que se trata de un efecto de los parámetros en la estructura de la enzima. Otras condiciones tales como la concentración de sustrato, concentración de enzima o de igual manera, la temperatura, llevan a pensar en un efecto asociado con la velocidad de reacción o con las interacciones enzima-levana-enzima. Sin embargo, no se ha podido definir claramente un mecanismo que explique esta característica de *Bs-SacB*, sino solo una relación causa/efecto. En este trabajo, el énfasis se puso inicialmente en un análisis detallado del efecto que tiene concentración de enzima y la temperatura en las mutantes **H243L** y **S164A**, debido a que se ha reportado que estas mutantes presentan un cambio en la distribución de pesos moleculares de la levana que sintetizan, con respecto al comportamiento observado para *Bs-SacB*.

8.1.1 Análisis sobre la distribución del peso molecular de la levana sintetizada por *Bs-SacB* y la mutante H243L a 45°C

Se sabe que a bajas temperaturas (4°C) la actividad de transferencia se ve favorecida, sobre la actividad hidrolítica de la enzima. Sin embargo, a temperaturas un poco más altas (>37°C), aunque disminuye la transferencia, la velocidad de reacción aumenta. Por ello, se evaluó el efecto de una alta temperatura (45°C) en el peso molecular de la levana de *Bs-SacB* sintetizada. Se observó, que a 45°C (1 U/mL y 100 g/L de sacarosa) se sintetiza preferentemente levana de alto peso molecular. Dado que la mutante **H243L** sintetiza preferentemente levana de alto peso molecular, se decidió explorar el comportamiento de la mutante a esta temperatura, con el fin de explorar el límite del peso molecular de la levana que puede sintetizar esta enzima. Esperábamos encontrar un efecto sinérgico de ambas condiciones, ya que ambas condiciones (reacciones a 45°C y la mutación **H243L**) favorecen la síntesis de levana de alto peso molecular.

Se encontró que la mutante **H243L** mantuvo la misma especificidad a 45°C, con respecto a la observada a 37°C, es decir, seguimos observando la presencia de levana de alto peso molecular incluso a concentraciones de sacarosa más altas (300 g/L), la figura 8 muestra las 2 mediciones, en las que podemos observar en todos los casos solo un pico (8.5 minutos en el tiempo de retención), el cual representa a la levana de alto peso molecular. De alguna manera, una levana de aproximadamente 2,200 kDa representa el límite superior de peso molecular que alcanza la levana sintetizada tanto por la mutante **H243L** (mutación que favorece la síntesis de levana de alto peso molecular) como por la enzima silvestre *Bs-SacB*.

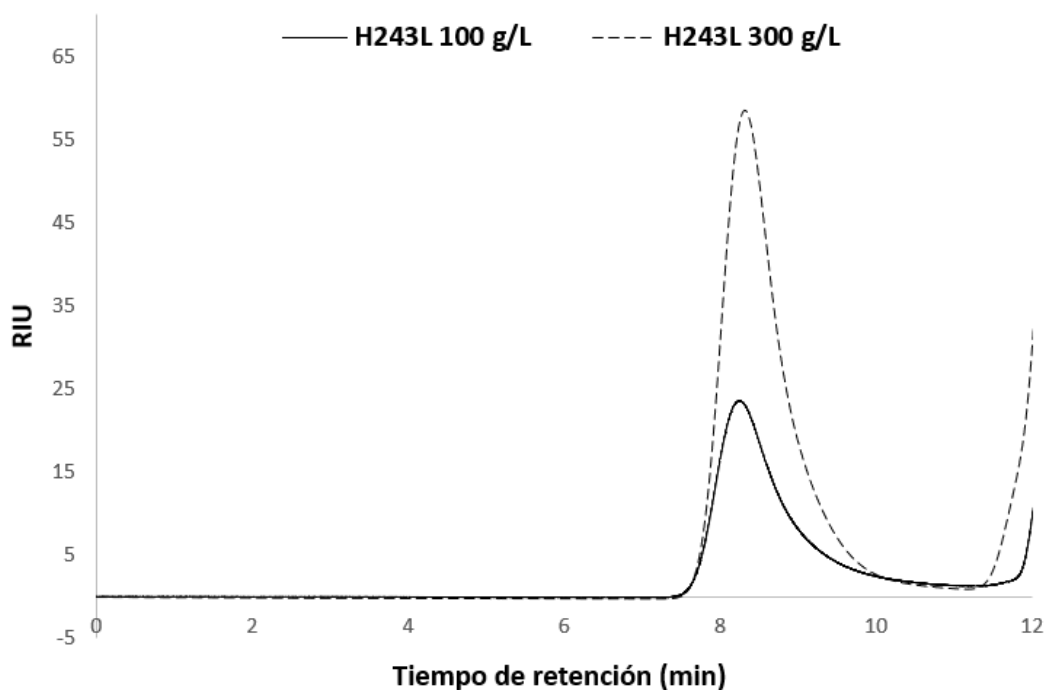


Figura 8. Efecto de reacciones a 45°C sobre la levana sintetizada por la mutante H243L. Estas reacciones se llevaron a cabo a 1 U/mL de enzima a 45°C a 100 y 300 g/L de sacarosa.

Un resultado interesante surgido a partir de síntesis de levana con diferentes distribuciones de peso molecular, fue que, al tratar de aumentar la productividad de levana de alto peso molecular que se sintetiza por *Bs-SacB* a 1 U/mL, 45°C se aumentó la concentración de sacarosa de 100 g/L empleados hasta ahora a 600 g/L. Se observó entonces un cambio importante de especificidad, ya que se pasó de una distribución normal con levana de APM, a una bimodal con levanas de alto y bajo peso molecular. Este efecto pudiera ser explicado a partir de la estabilidad de la enzima, ya que al subir

la temperatura hasta 45°C podría provocarse su desnaturalización, impidiendo que participe en la reacción, no solo desde el punto de vista catalítico, sino también mediante las interacciones con las que otros sitios en la superficie de la enzima pudieran contribuir a la reacción. Así, al llevar a cabo la reacción a altas temperaturas, la concentración de enzima activa disminuye por su desactivación/desnaturalización y observamos un efecto derivado de la concentración de enzima, y no de la temperatura. Por otro lado, al aumentar la concentración de sustrato hasta 600 g/L, se genera una protección de la enzima por la concentración de la sacarosa. Es decir, la concentración de la enzima activa no disminuye, y en consecuencia podemos observar levana con una distribución bimodal de pesos moleculares. Este efecto se puede observar incluso a 300 g/L como se demuestra en la figura 9. Esta hipótesis podría ser explicada agregando un protector a la reacción a 100 g/L equivalente a la presencia de una alta concentración de sacarosa.

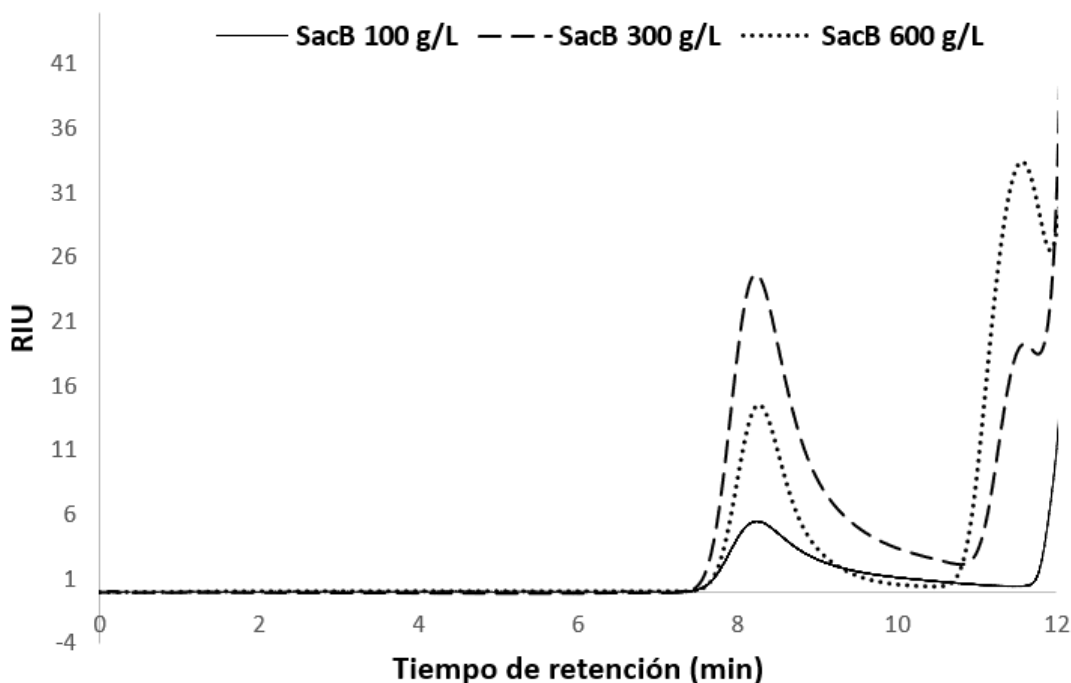


Figura 9. Efecto de la concentración de sacarosa en la síntesis de levana por *Bs-SacB* a 45°C. Esta reacción se llevó a cabo a 600 g/L (puntos), 300 g/L (línea discontinua) y 100 g/L (línea continua). Estas reacciones corresponden a 24 h de reacción.

8.1.2 Efecto de la concentración de enzima sobre de peso molecular de la levana producida por *Bs-SacB* y sus mutantes **H243L** y **S164A**

La hipótesis de trabajo en el grupo para explicar el efecto que tiene la concentración de enzima, plantea uno o varios sitios en la superficie de la enzima que pueden interactuar con la levana (sitios de unión a fructosa), de modo que cuando la concentración de enzima en la reacción es alta (55 µg/mL), el o los sitios en la superficie pueden competir con otras moléculas de enzima por la levana en elongación, impidiendo que esta sea elongada de manera continua, dando lugar a un mecanismo no procesivo que genera un polímero de bajo peso molecular (8.3 KDa). En cambio, cuando se emplean concentraciones bajas de enzima (0.55 µg/mL), se evitan las interacciones y la levana puede ser elongada hasta un polímero de alto peso molecular (2,200 KDa). Esta hipotética interacción proteína-polímero-proteína estaría presente conforme se aumenta la concentración de enzima, existiendo interacciones que dan lugar a la distribución bimodal (5.5 µg/mL). Basados en esta hipótesis, se decidió evaluar de igual manera este fenómeno (única variable la concentración de enzima) en las dos mutantes (**H243L** y **S164A**), que como mencionamos, sintetizan levana con una distribución normal de alto y bajo peso molecular, respectivamente, cuando se emplean en las mismas condiciones de reacción que *Bs-SacB*, es decir, 1 U/ml, 37 C y 100 g/L de sacarosa.

Dado que los parámetros cinéticos de la mutante **H243L** son muy similares a los de *Bs-SacB* silvestre, se utilizaron las mismas concentraciones para ambas enzimas. Se encontró que el efecto de altas concentraciones de enzima para la mutante **H243L** (55 µg/mL) es similar al de *Bs-SacB* ya que podemos observar la síntesis de levana de bajo peso molecular (figura 10A). Incluso, esta levana es de un peso molecular menor (2.6 kDa). No obstante, también observamos una pequeña cantidad de levana de alto peso molecular, algo que siempre ocurre, es decir, a pesar de que podemos modular el peso molecular de la levana sintetizada modificando las condiciones de reacción, la levana que se sintetiza preferencialmente, ya sea de alto o bajo peso molecular, va acompañada de una mínima cantidad de levana de bajo o de alto peso molecular respectivamente. Para poder observar mejor este efecto, se realizaron reacciones a 300 g/L y en efecto, se puede observar con mayor claridad la presencia de esta levana (figura 10B). La mutación **H243L** hace que su estabilidad térmica sea menor que la silvestre *Bs-SacB* (6.5 veces menos), lo que podría sugerir una modificación en su estructura, dando lugar a la

modificación de el o los sitios de unión a fructosa hipotéticos que proponemos, provocando que esta mutante sintetice preferentemente levana de alto peso molecular, pero solo hasta tener concentraciones de enzima altas (55 $\mu\text{g/mL}$), este sitio de unión que es menos funcional puede tener un efecto en la síntesis de levana. Aún faltan datos para corroborar esta hipótesis, la cristalización de esta mutante podría ayudar a resolver cuestiones referentes a este sitio hipotético o si se trata de otra condición estructural no reportada hasta el momento.

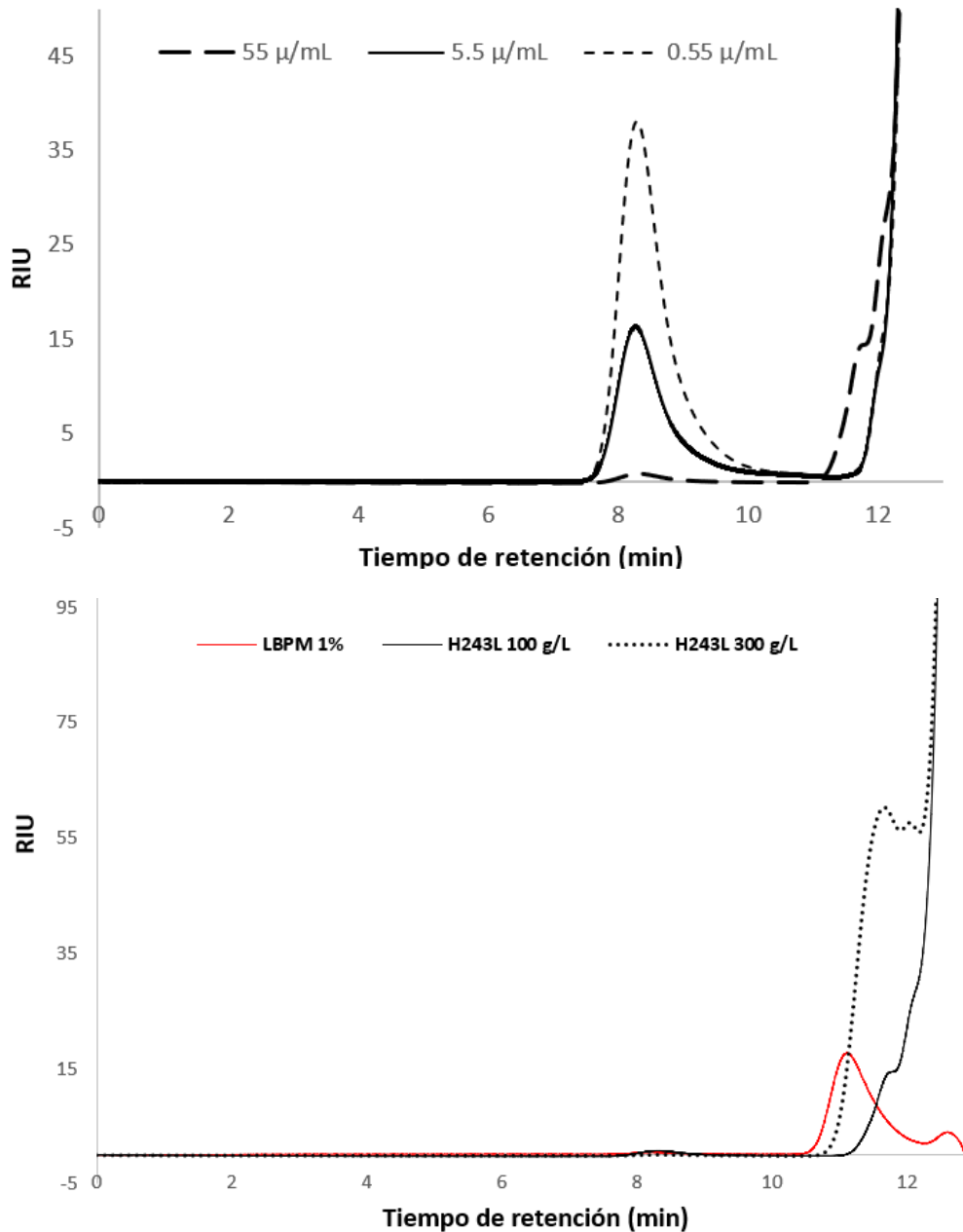


Figura 10. A) Efecto de la concentración de enzima en la distribución de pesos moleculares de la levana sintetizada por la mutante H243L. Estas reacciones se llevaron a cabo a 100 g/L a 37°C variando la concentración de enzima. B) Distribución de pesos moleculares de la levana sintetizada por la mutante H243L a 10 U/mL a 37°C, variando la concentración de 100 g/L a 300 g/L de sacarosa. En rojo se muestra la levana de bajo peso molecular sintetizada por *Bs-SacB*. Todas las reacciones tienen conversiones mayores a 90 %.

Un análisis por HPAEC-PAD de esta levana de menor peso molecular (2.6 KDa) sintetizada por la mutante **H243L** sugiere que, al igual que la levana de bajo peso molecular sintetizada por *Bs-SacB* es sintetizada por un mecanismo *procesivo*, debido a que se observan los intermediarios en la síntesis de esta levana, en la figura 11 cada pico representa una cadena de levana con un grado de polimerización cada vez mayor (de izquierda a derecha). La transferencia de esta enzima disminuye considerablemente, hidrolizando casi el 80% del sustrato, cuando *Bs-SacB* usa el 40% de la sacarosa para reacciones de transferencia a las mismas condiciones.

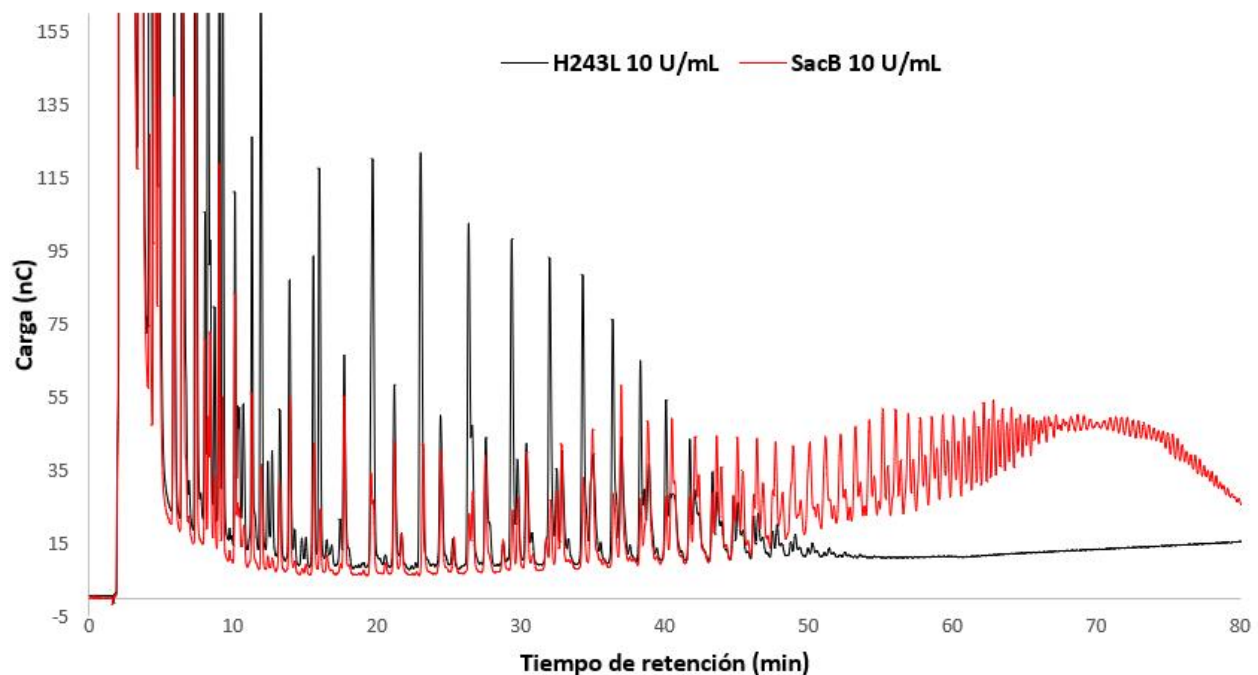


Figura 11. Análisis de cromatografía de intercambio iónico de la levana BPM-SacB (rojo) comparada con la levana sintetizada por H243L (negro) a 10 U/mL y 100 g/L de sacarosa.

Bajas concentraciones de enzima (**0.55 µg/mL**) no cambian el comportamiento de la mutante **H243L**, al menos para la síntesis de polímero ya que, tal como fue caracterizada, se observa únicamente la síntesis de levana de alto peso molecular, como lo muestra el cromatograma de la figura 10A.

Por otro lado, la mutante **S164A** presenta un cambio importante de parámetros cinéticos con respecto a la silvestre (una K_{cat} 25 veces menor), lo que implica que para llegar a una actividad de 1 U/mL se requiere de una alta concentración de enzima (137.5 $\mu\text{g/mL}$), mucho más alta que los niveles usuales de concentración de la enzima silvestre *Bs-SacB* (5.5 $\mu\text{g/mL}$). Todos los análisis reportados hasta el momento, relativos a la caracterización de la mutante **S164A** no habían contemplado el efecto de la concentración de enzima, por lo que se llevaron a cabo reacciones basadas en concentraciones de enzima comparables a la silvestre, a pesar de traer como consecuencia velocidades de reacción muy bajas. En el cromatograma de la figura 12 podemos observar que al igualar las concentraciones de reacción a las utilizadas con *Bs-SacB* (0.55 $\mu\text{g/mL}$ y 5.5 $\mu\text{g/mL}$), la mutante presenta el mismo comportamiento en cuanto a la síntesis que *Bs-SacB*. Este resultado demuestra que el mecanismo de elongación de levana es el mismo que para *Bs-SacB*. Es decir que, independientemente de la actividad enzimática (velocidad de reacción) a 5.5 $\mu\text{g/mL}$ observamos la síntesis de levana con una distribución bimodal de pesos moleculares estrechamente asociada a la concentración de enzima en la reacción; consecuentemente, a 0.55 $\mu\text{g/mL}$ observamos únicamente la síntesis de levana de alto peso molecular.

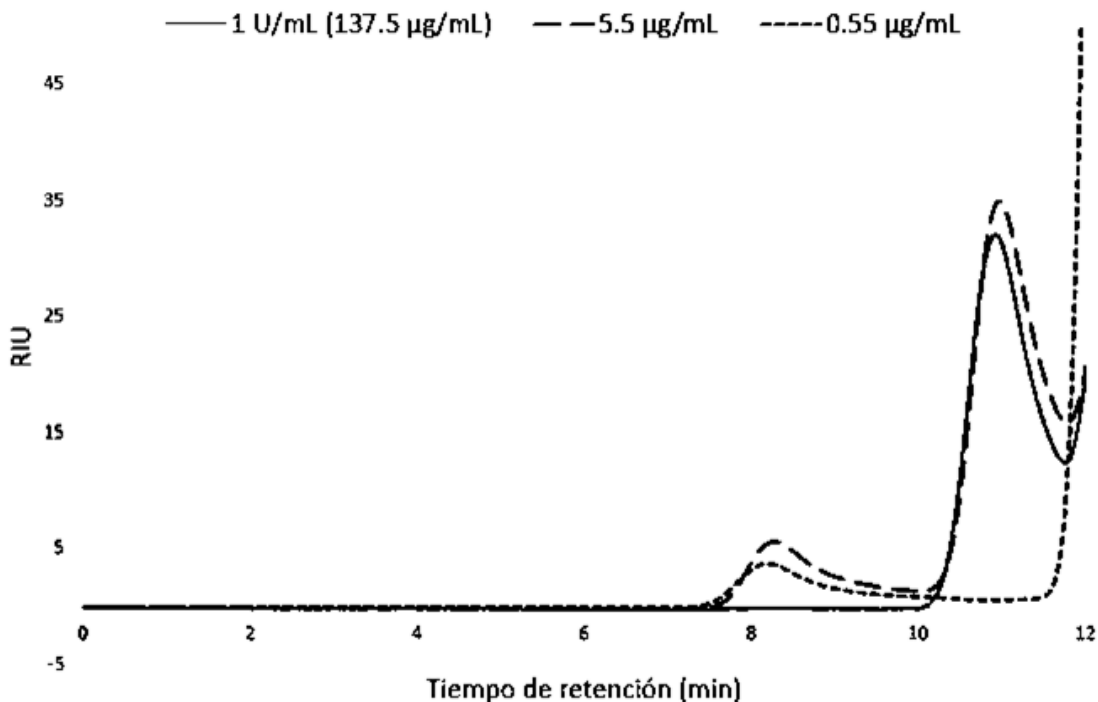


Figura 1. Efecto de la concentración de enzima en la distribución de pesos moleculares de la levana sintetizada por la mutante S164A. Estas reacciones se llevaron a cabo a 100 g/L a 37°C variando la concentración de enzima.

Estos resultados muestran que tanto en *Bs-SacB*, como en las dos mutantes analizadas, la concentración de enzima modula el peso molecular que alcanza la levana durante la síntesis, independientemente de modificaciones en mutantes que se creía ocasionaban un cambio de especificidad relativa al peso molecular de la levana sintetizada.

Para apoyar nuestra hipótesis, en la que se plantea la existencia de interacciones entre enzima-enzima o enzima-levana-enzima, nos planteamos experimentos en los que se impidiesen interacciones entre las moléculas de enzima. Una forma de lograr este objetivo es inmovilizando la enzima, aunque los métodos clásicos hasta ahora explorados (inmovilización en Eupergit o CLEAs) no nos aseguran que toda la enzima se encuentre disponible para llevar a cabo la reacción, o que la misma inmovilización bloquee sitios importantes para la interacción entre proteína-polímero-proteína. Por esta razón, se decidió emplear esferas de agarosa, que usualmente son utilizadas para la purificación de proteínas por medio de la etiqueta de histidinas. Esta inmovilización nos permitiría tener a la enzima en su plegamiento activo, debido a que las proteínas en este sistema quedan atrapadas por la unión de la etiqueta de histidinas ubicadas en el extremo amino terminal, que se unirá a la superficie de las esferas, asegurándonos que la inmovilización no interferirá con el sitio activo (figura 13).

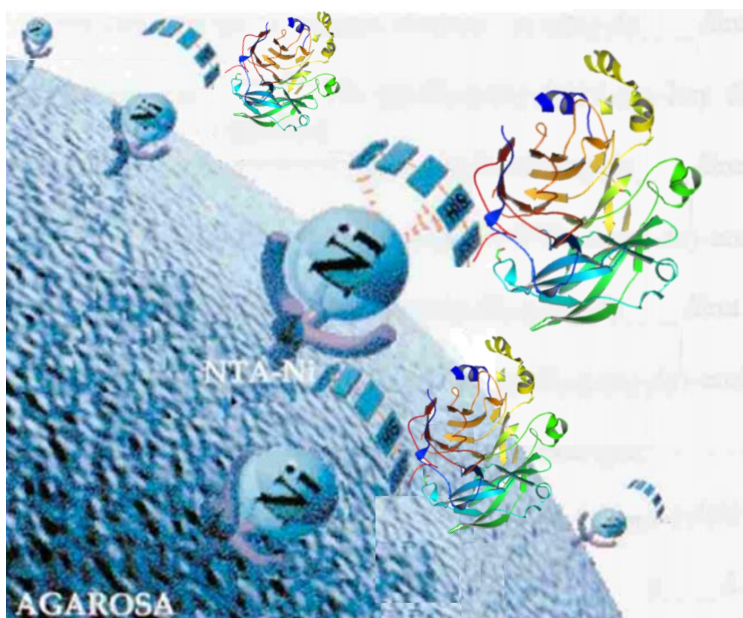


Figura 2. Representación gráfica de la inmovilización de *Bs-SacB* en un soporte de agarosa, este soporte se encuentra unido con ácido nitriloacético -un quelante- que a su vez retiene covalentemente iones de Ni^{+2} , con los cuales las histidinas interaccionan fuertemente.

Los resultados que se presentan en la figura 14, muestran el efecto que produce la inmovilización de la enzima, tanto para la mutante **S164A** como para *Bs-SacB*. Podemos observar en los cromatogramas que, cuando la enzima se encuentra inmovilizada solo se produce levana de alto peso molecular. Esto apoya nuestra hipótesis, es decir, a pesar de existir una alta concentración de enzima, al estar inmovilizada se restringen las interacciones enzima-levana-enzima o enzima-enzima como se describió con anterioridad, permitiendo que las cadenas de levana se puedan elongar hasta dar lugar al polímero de alto peso molecular. Este efecto es más notable en la inmovilización de la mutante **S164A**, de la que, como mencionamos anteriormente, requerimos una concentración de 137.5 $\mu\text{g/mL}$ de enzima para poder llegar a 1 U/mL, en estas condiciones, estando la enzima libre hemos descrito que se observa únicamente la síntesis de levana de bajo peso molecular. Sin embargo, cuando se inmoviliza la enzima, y se evitan las interacciones, de forma similar a lo que ocurre cuando se disminuye la concentración de enzima a 0.55 $\mu\text{g/mL}$, se sintetiza levana de alto peso molecular. Así, con estos experimentos queda demostrado que, a pesar de tener concentraciones altas de enzima, incluso mayores a 55 $\mu\text{g/mL}$, si se evitan las interacciones entre las moléculas de enzima, la levana sintetizada es solo de alto peso molecular. Otro efecto notable debido a la inmovilización es el aumento considerable en la transferencia de la enzima, llegando hasta el 80 %.

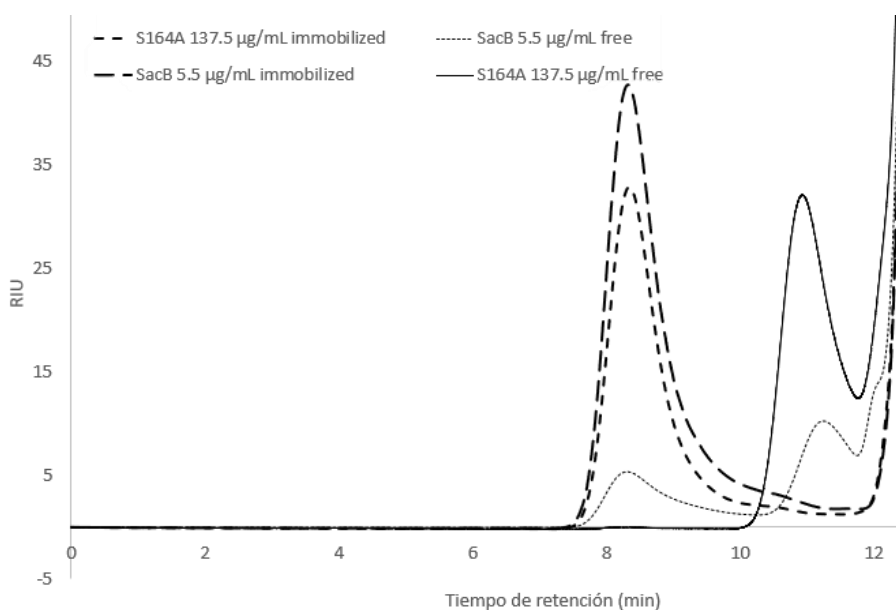


Figura 3. Efecto de la inmovilización de enzima en la distribución de pesos moleculares de la levana sintetizada por la mutante **S164A** y *Bs-SacB*. Reacciones a 1 U/mL para las dos enzimas y en ambos casos (inmovilizada y libre). Estas reacciones se llevaron a cabo a 100 g/L a 37°C con agitación de 1000 rpm.

Para corroborar que el efecto que observamos es debido a la inmovilización de la enzima realizamos un experimento similar al reportado por Raga-Carbajal et al. (2016), en el que en la reacción de enzima inmovilizada se agrega enzima inactiva (doble mutante) hasta alcanzar una concentración final de 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enzima inmovilizada + 49.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enzima doble mutante). Así, solo las moléculas de enzima activa que se encuentran inmovilizadas pueden sintetizar levana, al no poder interaccionar entre ellas pero sí con la doble mutante inactiva que se agrega a la reacción. Es importante considerar un posible artefacto derivado del hecho de que existen sitios libres de Ni^{+2} en la superficie del catalizador, al que es afín la etiqueta de histidinas que posee también la enzima doble mutante inactiva. Para resolver este problema, se agregó una alta concentración de enzima inactiva (1 mg/mL), para que, no solo el soporte se sature de enzima, sino que no existan problemas difusionales debido a la enzima inmovilizada - enzima libre. Los resultados de estos experimentos se muestran en los cromatogramas de la figura 15, en los que puede apreciarse un cambio de distribución de pesos moleculares, al cambiar de la síntesis de levana de alto peso molecular cuando la enzima esta inmovilizada, a una levana con distribución bimodal cuando enzima inactiva a una alta concentración es agregada para interaccionar con la enzima inmovilizada durante la síntesis. A diferencia de lo que ocurre al realizar estos experimentos con enzima libre (la síntesis de levana de bajo peso molecular), podemos observar que la distribución no cambia totalmente a levana de bajo peso molecular. Creemos que pudiera deberse a que la síntesis de levana en este método de inmovilización provoca que la levana tienda a agregarse alrededor del soporte, provocando así un impedimento estérico en la interacción enzima activa-levana-enzima inactiva, es decir entre la enzima inmovilizada y la enzima libre. Como podemos ver en la figura 16A, se observan las esferas de agarosa en el centro cubiertas de una gran cantidad de levana, sugiriendo en primer lugar que la difusión de la enzima inactiva libre hacia la enzima inmovilizada pudiera estar severamente restringida, y que la levana tiende a interactuar preferentemente con otras moléculas de levana llegando al grado de tener moléculas de levana agregadas. En la figura 16B podemos ver al soporte de agarosa sin levana adherida a ella.

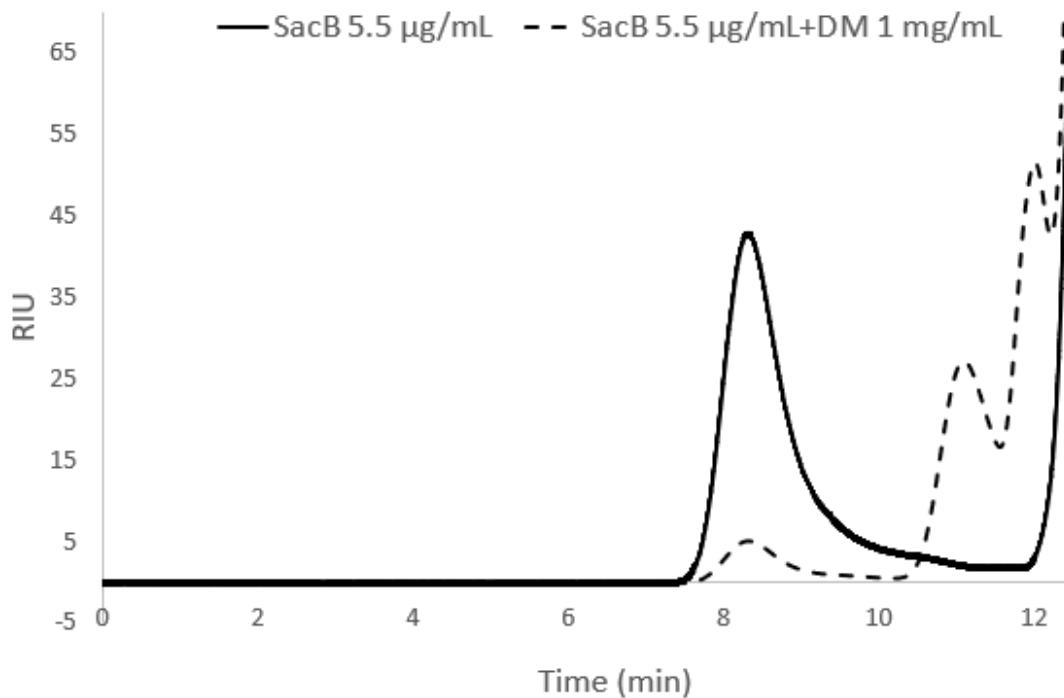


Figura 4. Distribución de pesos moleculares de *Bs-SacB* inmovilizada. Reacciones a 5.5 µg/mL de enzima inmovilizada. En una reacción fue añadido 1 mg/mL de enzima inactiva doble mutante. Estas reacciones se llevaron a cabo a 100 g/L de sacarosa a 37°C.

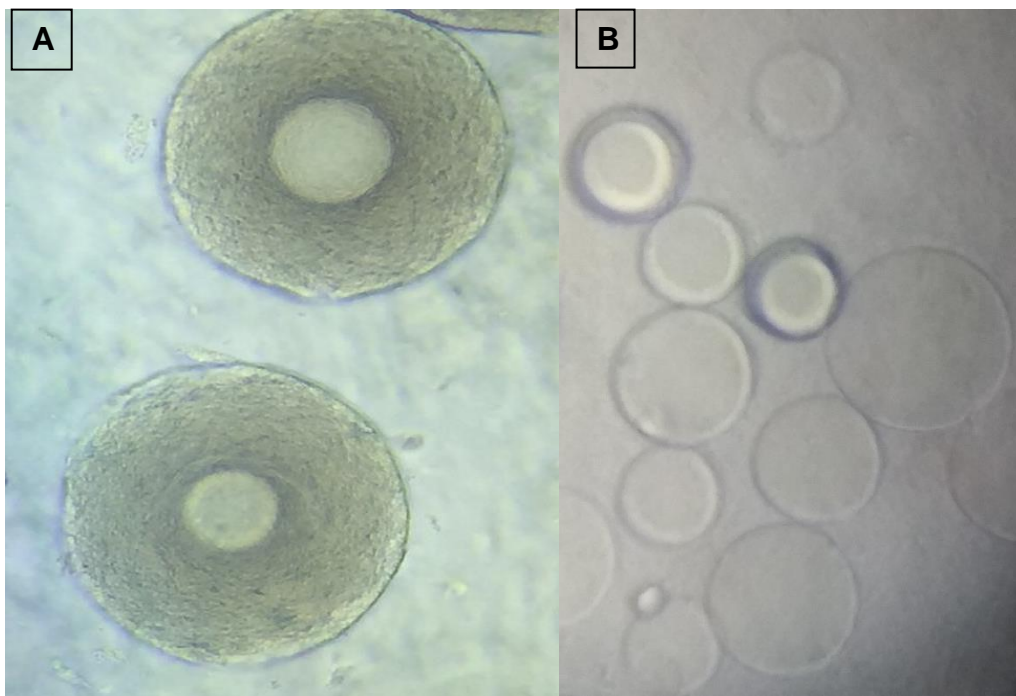


Figura 5. A) Esferas de agarosa con *Bs-SacB* inmovilizada y cubierta de levana. Fotografía tomada a 12 horas de reacción. B) Esferas de agarosa sin enzima inmovilizada. Ambas fotografías tomadas en microscopio óptico (40X) en campo claro.

Todos estos datos ponen en evidencia la importancia de la interacción enzima-levana-enzima para controlar la distribución de pesos moleculares de la levana, sugiriendo este efecto como el predominante. Otros reportes relacionados con la modulación del peso molecular de la levana sintetizada también podrían ser explicados con la hipotética interacción enzima-levana-enzima. Por ejemplo: la presencia de solventes (etanol 40%) que fue descrita por Tanaka et al. (1980), favorece la síntesis de levana de alto peso molecular. Posiblemente tal cantidad de etanol pueda estar provocando que cierta cantidad de enzima precipite o se desnaturalice generando que exista menor cantidad de enzima estructuralmente activa, con el sitio de unión a fructosas intacto, generando nuevamente un efecto debido a una baja concentración de enzima. Esta justificación sería similar a la empleada para explicar el efecto de realizar reacciones a altas temperaturas (45°C).

Con toda la información disponible y la obtenida en esta sección del proyecto, hemos podido definir condiciones que favorecen la síntesis de polímero de un peso molecular definido, además de poner en evidencia la necesidad de una interacción enzima-levana-enzima en este proceso. Consideramos estas evidencias un avance en la comprensión de la particular capacidad de *Bs-SacB* de sintetizar levana con una distribución particular de peso molecular.

Sin embargo, queda por definir con más detalle el mecanismo exacto mediante el cual sucede el proceso de elongación, y resolver diversas incógnitas surgidas de este proyecto tales como ¿qué define los límites de elongación de la levana por *Bs-SacB*? Esta pregunta nos la hacemos conscientes de que existen enzimas capaces de sintetizar levana con un peso molecular mucho más alto que *Bs-SacB* como la de *Brenneria* sp. EniD312 (141,000 kDa) (Xu et al. 2018). Existen igualmente incógnitas referentes al papel que podrían jugar las propiedades fisicoquímicas de la levana, muy particularmente la capacidad de la levana de alto peso molecular para formar nanopartículas y la influencia de estas nanopartículas en el mecanismo de elongación durante la síntesis. Por ejemplo: ¿la formación de nanopartículas juega un papel importante para que el límite de elongación de la levana de alto peso molecular sea 2,200 KDa? ¿en qué momento se forman las nanopartículas durante la reacción? ¿la levana de bajo peso molecular, al igual que la levana de alto peso molecular puede formar nanopartículas? ¿son las nanopartículas un factor determinante para que la levana no sea reconocida como

aceptor por la enzima siendo entonces el mecanismo mediante el cual se define el tamaño de la levana? Estas y otras preguntas pudieran resolverse analizando el comportamiento de la levana en solución, por lo cual en la siguiente sección se describe los análisis realizados sobre las levanas y cómo pudieran influir en la síntesis de levana, y por ende su peso molecular.

8.2 Caracterización de la levana

8.2.1 Síntesis de levana por *Bs-SacB* y la levana sintetizada por las mutantes H243L y S164A

Con el fin de caracterizar el comportamiento de la levana en medio acuoso, así como el efecto de las propiedades fisicoquímicas de la levana en su propia síntesis, se trabajó inicialmente en condiciones de síntesis de levanas con distribución monomodal de peso molecular, variando algunos parámetros de reacción y purificando las levanas producidas. Estas condiciones fueron resultado de la revisión de la literatura. Así, se empleó lo que denominamos una concentración de enzima elevada (55 µg/mL, equivalente a **10 U/ml de *Bs-SacB***) a 37°C y 600 g/L de sacarosa, con el fin de sintetizar exclusivamente levana de bajo peso molecular, levana que identificamos como BPM-SacB. Otra condición con la que se puede modular el peso molecular de la levana en reacciones con *Bs-SacB* es la temperatura. Basados en estos antecedentes de igual forma se definieron condiciones de reacción de **1 U/mL** a 100 g/L de sacarosa utilizando **45°C** para llevar a cabo la síntesis de levana **APM-SacB**. Finalmente, la levana con una distribución bimodal de pesos moleculares, conteniendo tanto levana de alto como de bajo peso molecular se sintetizó en las condiciones descritas en la sección anterior (**1 U/mL 45°C y 600 g/L** de sacarosa).

La levana producida por la mutante **H243L** se sintetizó empleando **1 U/ml**, a 37°C y 600 g/L de sacarosa (APM-H243L). Tal como se ha reportado, la mutante **H243L** en estas condiciones de reacción produce exclusivamente levana de alto peso molecular. La mutante **S164A**, solo produce levana de bajo peso molecular (BPM-S164A) cuando lleva a cabo la síntesis a razón de **1 U/ml**, a 37°C y 600 g/L de sacarosa. La figura 17 muestra el perfil de peso molecular de las levanas sintetizadas en esta sección y que son la base de los estudios estructurales que a continuación se describen.

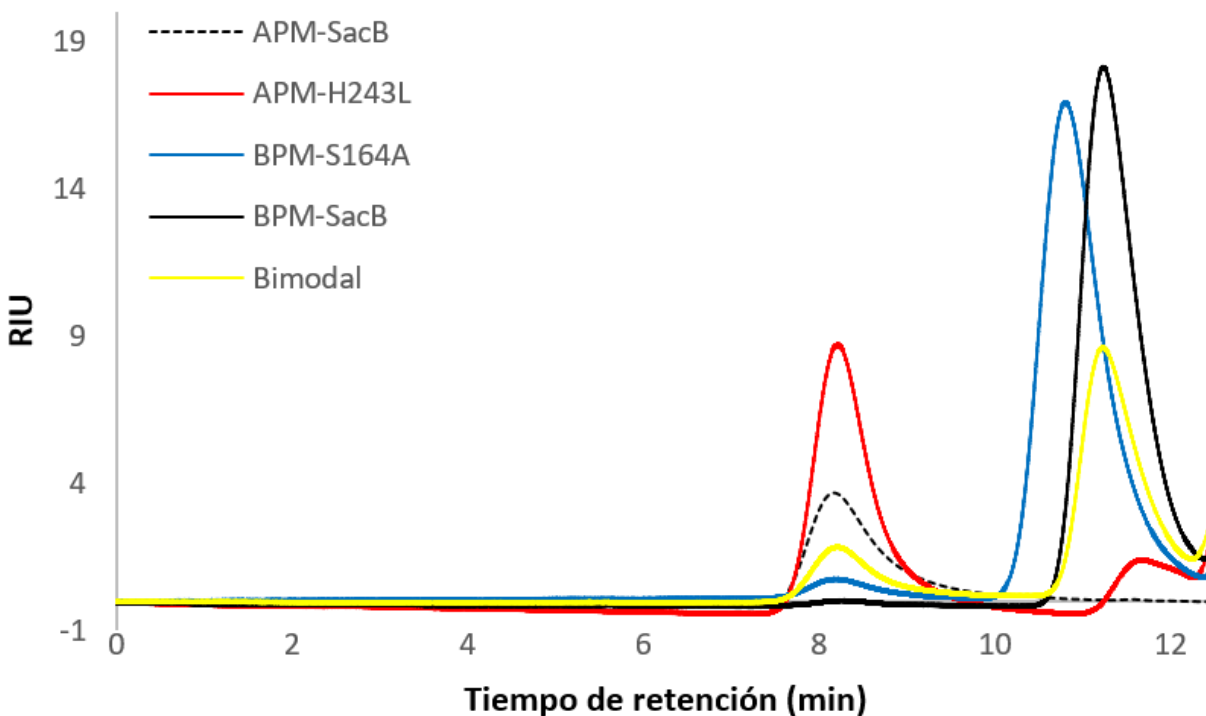


Figura 6. Distribución de pesos moleculares de la levana sintetizada por *Bs-SacB*, las mutantes H243L y S164A. En líneas discontinuas negras se muestra la levana de APM-SacB; en amarillo se muestra levana con distribución bimodal sintetizada por *Bs-SacB*; en línea continua negra se muestra la levana de BPM-SacB; en rojo la levana de APM-H243L; en azul la levana BPM-S164A. Las condiciones de síntesis se describen en la sección 8.2.1

8.2.2 Tamaño de partícula de las levanas

El análisis del tamaño de partícula de las levanas es una tarea esencial para cumplir uno de nuestros objetivos, en el sentido de que las moléculas de levana se agregan a tal grado de formar una partícula cuando está en solución, y que este fenómeno afecta su elongación. Con este fin, se analizó el tamaño de partícula de la levana por medio de la técnica de dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering o DLS). Se analizó la levana sintetizada por *Bs-SacB*, así como la sintetizada por las mutantes **H243L** y **S164A**. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 18, en la que podemos observar la distribución del tamaño de partícula de las levanas sintetizadas, purificadas y resuspendidas en agua. Estos resultados muestran que su tamaño es similar en todos los casos, a pesar de la gran diferencia en el peso molecular promedio entre levanas de

alto y bajo peso molecular. En efecto, en el caso de la levana de **BPM-SacB** el diámetro de partícula promedio corresponde aproximadamente a **113 nm**, aunque la distribución es heterogénea e incluye diámetros de hasta 250 nm. Por otro lado, la levana de **APM-SacB** muestra diámetro de **174 nm**, aunque en la distribución, se observa que el tamaño puede llegar hasta 500 nm, un nivel de dispersión que no ocurre con la levana BPM-SacB.

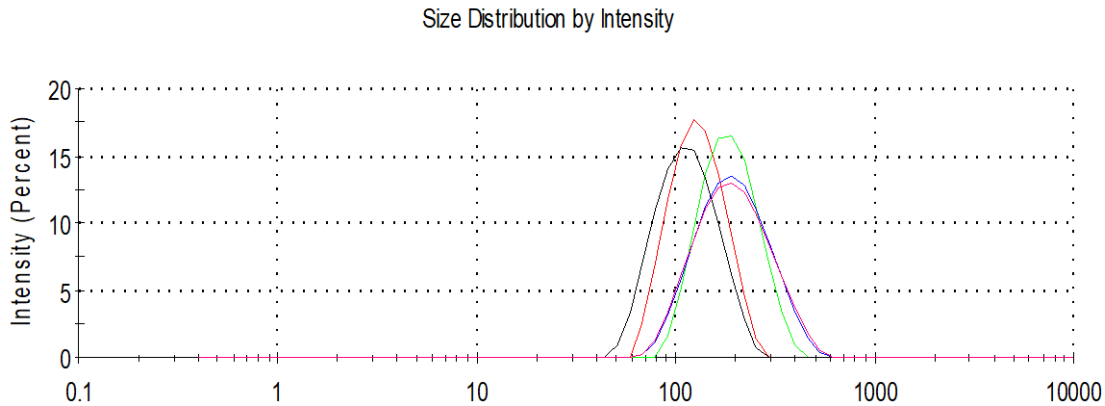


Figura 7. Distribución del tamaño de partícula por DLS de las levanas sintetizadas por *Bs-SacB* y sus mutantes. (---rojo---) levana de BPM-SacB; (---negro---) levana de APM-H243L; (---rosa---) levana de APM-SacB; (---verde---) levana de BPM-S164A y (---azul---) levana con una distribución bimodal de peso molecular sintetizada por *Bs-SacB*

Las partículas de levana de **APM-H243L** presentan un diámetro promedio de **107 nm**, resultando ser más pequeña que las de APM-SacB. Un aspecto sumamente interesante, es el hecho de que a pesar de tener una distribución de pesos moleculares muy parecida a la levana de APM-SacB, su diámetro, así como su distribución, se asemejan más a una levana de bajo peso molecular. Por otro lado, las partículas de levana de **BPM-S164A** tienen un tamaño promedio de **174 nm**, un comportamiento similar a la levana de APM-SacB. Finalmente analizamos también la levana con una distribución de peso molecular **bimodal** (alto y bajo peso molecular) que resultó estar constituida por partículas con un diámetro promedio muy similar a la APM-SacB (**174 nm**), es decir, a pesar de estar constituida por levanas con una distribución de peso molecular bimodal, solo se observa una distribución monomodal en el tamaño de partícula, muy similar a la observada para la levana APM-SacB. Estos resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Tamaño de partícula de la levana sintetizada por *Bs*-SacB y sus mutantes. El peso molecular fue analizado por SEC-RI y el tamaño de partícula por DLS

| Levana | Peso molecular (KDa) | Tamaño de partícula promedio (nm) | Distribución (nm) |
|-----------|----------------------|-----------------------------------|-------------------|
| BPM-SacB | 8.3 | 133 | < 250 |
| APM-SacB | >> 2,200 | 174 | < 500 |
| Bimodal | 8.3 y 2,200 | 174 | < 500 |
| APM-H243L | 2,200 | 103 | < 200 |
| BPM-S164A | 8.3 | 174 | < 350 |

Estos datos sugieren que la levana de bajo peso molecular forma agregados al igual que la levana de alto peso molecular, siendo la única forma de poder explicar el tamaño de partícula observado de más de 100 nm para cadenas de levana de aproximadamente 52 unidades de fructosa. Proponemos que las moléculas de levana se agregan interactuando entre ellas para formar nanopartículas. Posiblemente esto dé lugar a que, durante la reacción, al agregarse la levana, quede inaccesible para la enzima, deteniendo la elongación. Un análisis más profundo de la levana de bajo peso molecular por medio de microscopía electrónica de transmisión permitió confirmar la morfología de los agregados de levana de bajo peso molecular.

8.2.3 Nanopartículas de levana

Si bien el análisis del tamaño de partícula por DLS nos permite tener una aproximación de su diámetro, se trata de una aproximación, ya que su morfología tendría que ser totalmente esférica. Para confirmar la morfología de los agregados la levana en solución, analizamos levana **BPM-SacB** por microscopía electrónica de transmisión. En la figura 19 podemos observar nanopartículas esféricas, amorfas, de tamaños variados, pero que están dentro de la distribución medida por DLS.

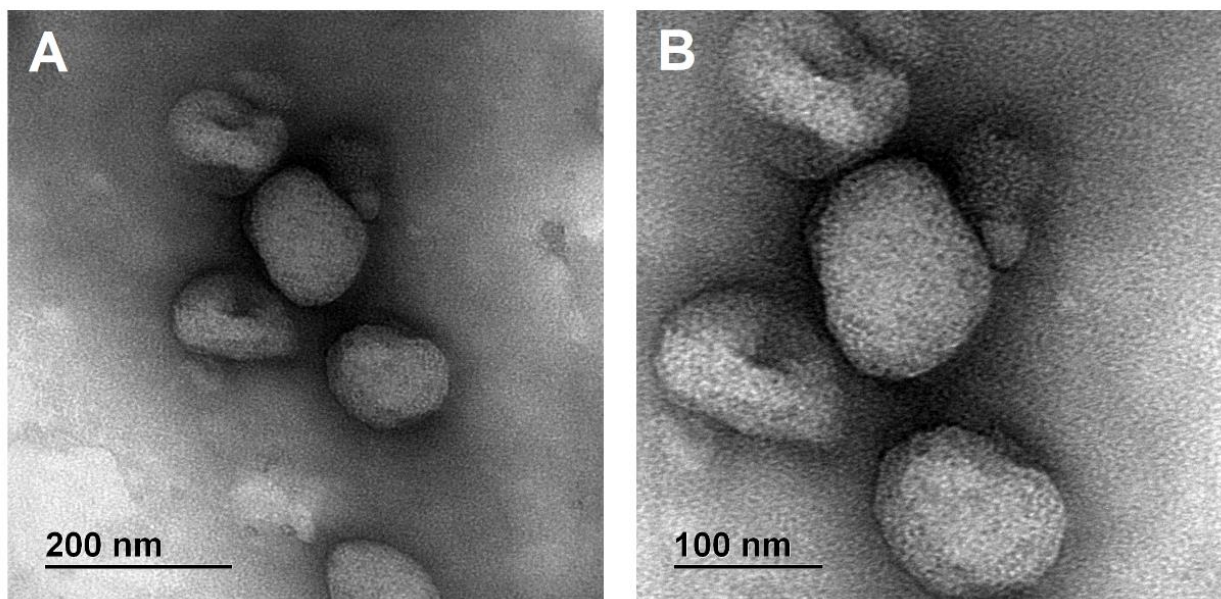


Figura 8. Nanopartículas de levana de BPM-SacB, analizadas por microscopia electrónica de transmisión después de 1 hora de reacción (10 U/mL, 100 g/L de sacarosa, 37°C). A) 35,000X B) 50,000X.

De igual manera, la levana BPM-SacB analizada por microscopia electrónica de transmisión fue analizada por DLS, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de permeación en gel para demostrar que, aunque vemos una partícula de alrededor de 100 nm, se trata de moléculas de levana de un peso molecular aproximado a los 8.3 kDa (~52 unidades de fructosa). Con estos datos podemos inferir que las cadenas de levana de bajo peso molecular interactúan entre sí, colapsando en un agregado o nanopartícula. Sorprendentemente, dado que el tamaño de la partícula es similar para las partículas de levana de alto peso molecular, una explicación razonable considerando la diferencia de peso molecular, es que el número de cadenas de levana por partícula, sea aproximadamente 265 veces mayor en el caso de BPM-SacB que para el caso de la levana de alto peso molecular.

El coeficiente de Huggins (k_H) es un parámetro empleado para describir la naturaleza de las interacciones o la afinidad en un sistema polímero-solvente, aunque también se emplea para describir la calidad de un solvente. Este coeficiente proviene de la pendiente obtenida al graficar correlación entre η_{esp}/C y la C . Donde η_{esp} es la viscosidad específica y C es la concentración, de ahí resulta su carácter adimensional. Por ejemplo, en un buen solvente se presentan valores del coeficiente de Huggins de entre 0.3 - 0.4, lo que indica una buena interacción entre el solvente y el polímero; valores de 0.5 a 0.7 sugieren

interacciones equivalentes entre polímero-polímero y polímero-solvente; y valores superiores a 0.8 indican interacciones dominantes entre polímero-polímero. Ehrlich et al. (1974) reportaron para la levana *Streptococcus salivarius* un valor para el coeficiente de Huggins (en agua) de alrededor de 1, lo que indicaría que la levana tiende a interactuar preferentemente con otras moléculas de levana que, con el solvente, provocando este colapso que da lugar a nanopartículas esféricas. Un factor que impacta en el coeficiente de Huggins es el nivel de ramificaciones, ya que afecta el tamaño del polímero. Por ello será importante analizar el nivel de ramificación de las levanas, y asociar a esta característica del polímero al coeficiente de Huggins correspondiente.

8.2.4 Autoensamble de nanopartículas de levana y su estabilidad

La información obtenida en la sección anterior que sugiere que la levana de bajo peso molecular al igual que la de alto peso molecular interactúan y se agregan colapsando en nanopartículas de al menos 100 nm, nos lleva a la siguiente incógnita, la dinámica de formación de nanopartículas, es decir, definir el momento en el que las nanopartículas se ensamblan durante la reacción, si se encuentran presentes desde el inicio de la reacción o si el ensamblaje es un proceso asociado a la cinética de la reacción. De esta última forma, sería claro el hecho de que el colapso en nanopartículas pudiera estar regulando el peso molecular que alcanza la levana durante la síntesis.

Para analizar esta propuesta, se estudió la cinética de formación de nanopartículas, en la cual analizamos si existe la presencia de nanopartículas a medida que avanza la reacción. Como podemos observar en la figura 20B, para el caso de la levana de bajo peso molecular, las nanopartículas se forman desde los primeros tiempos de la reacción (5 minutos). Dicho de otra manera, se necesita muy poca levana para iniciar su agregación. Sin embargo, con estos datos aun no podemos aseverar que esto sea un factor predominante en la elongación de la levana, debido a que, como mencionamos anteriormente, existen condiciones en las que la levana puede ser elongada hasta obtener un polímero de alto peso molecular. Por ello, se analizó también el tamaño de partícula durante la síntesis de levana con distribución bimodal, durante la cual sabemos que la síntesis de levana de alto y bajo peso molecular se lleva a cabo de manera simultánea. Estos resultados se presentan también en la figura 20A. Se encontró que, al

igual que en la condición anterior se observa que la aparición de agregados ocurre desde el inicio de la reacción (5 min). En ambos casos el tamaño de partícula de los agregados no parece cambiar, manteniéndose desde el inicio de la reacción y hasta el final de la reacción, con un tamaño promedio de 200 nm. Existe una diferencia entre las mediciones del tamaño de partícula con la levana purificada (114 nm para levana de bajo peso molecular y 174 nm para levana con distribución bimodal) y la levana en el medio de reacción (200 nm). Esta diferencia en el tamaño de partícula puede ser explicada por la presencia de moléculas presentes durante la reacción y su posterior análisis (sacarosa residual, monosacáridos, FOS, etc), ya que la presencia de moléculas en la muestra a analizar afectan la medición de DLS (Bhattacharjee, 2016).

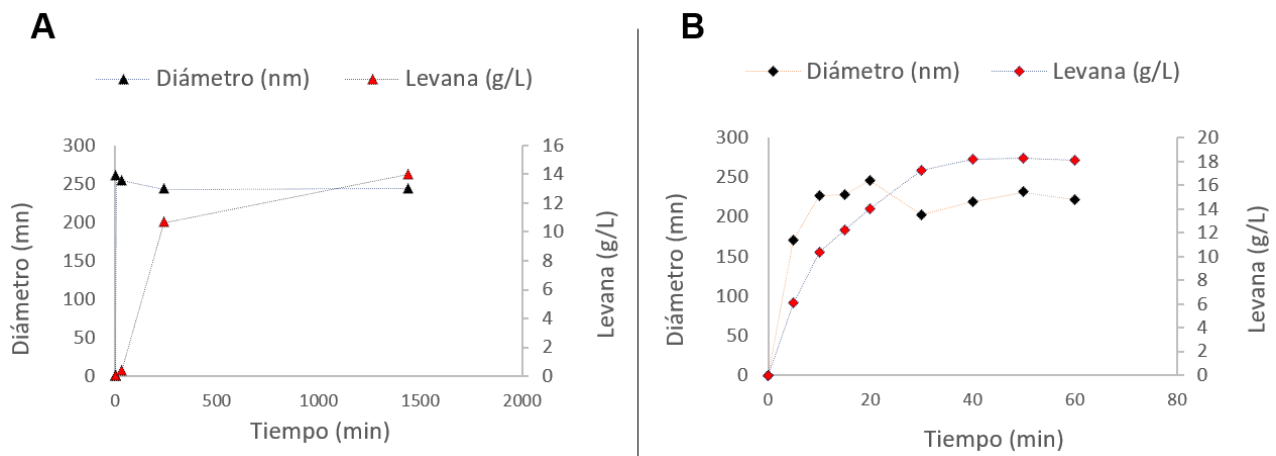


Figura 9. Cinética de formación de nanopartículas. A) Síntesis de levana de bajo peso molecular durante la reacción (10 U/mL, 100 g/L de sacarosa, 37°C). B) Síntesis de levana con distribución bimodal de pesos moleculares durante la reacción (1 U/mL, 100 g/L de sacarosa, 37°C).

Los datos anteriores demuestran la presencia de nanopartículas casi desde el inicio de la reacción, incluso en condiciones donde sabemos que existe la síntesis simultánea de levana de alto y bajo peso molecular. Sin embargo, estos resultados no permiten tener una respuesta a la posible relación entre la formación de nanopartículas y el proceso de elongación que da lugar a levanas de distinto peso molecular. Se ha constatado que, para el caso de la levana de bajo peso molecular, el mecanismo de elongación es no

procesivo, es decir tenemos cadenas de levana de peso molecular creciente durante la reacción. Si tomamos en cuenta que casi desde el inicio de la reacción, las cadenas de levana tenderán a colapsar en nanopartículas, creemos que será muy difícil que una vez colapsada estas sean elongadas por la enzima. Esta pudiera ser también la respuesta a un fenómeno conocido desde hace décadas consistente en el hecho de que cuando se agrega levana de bajo peso molecular como aceptor a una reacción, esta no es tomada como aceptor para ser elongada.

Por esta razón analizamos la estabilidad de las nanopartículas en presencia de diversas moléculas con el objetivo de desestabilizarlas o evitar su interacción, con la intención de mantener las cadenas de levana libres, y analizar si en estas condiciones podrían actuar como aceptores de la reacción y ser elongadas. Para tal efecto, utilizamos sustancias tales como SDS, Triton X-100 y Tween 80, para afectar las interacciones entre moléculas de levana, que se sospecha son de naturaleza hidrofóbica, puentes de hidrógeno, o interacciones de Van der Waals, entre otras. Los resultados obtenidos sugieren que las nanopartículas son muy estables, ya que no podemos ver un cambio significativo del tamaño de partícula en presencia de alguna de estas moléculas, pues en todos los casos seguimos observando la presencia de nanopartículas. Sin embargo, dado que estos datos fueron obtenidos por medio de DLS, no podemos cuantificar el número de nanopartículas y, sobre todo, saber si algún porcentaje de las nanopartículas fue disgregado. Para analizar esta posibilidad llevamos a cabo la síntesis de levana de bajo peso molecular en presencia de levana como aceptor y en presencia también de los aditivos disgregantes durante la síntesis (figura 21). De existir moléculas de levana no asociadas a las nanopartículas, estas podrían entonces ser elongadas. Sin embargo, en los experimentos realizados no observamos que la levana fuese utilizada como aceptor, lo que sugiere que las moléculas que seleccionamos (SDS, Triton X-100 o Tween 80) no desagregan las nanopartículas de levana. Otra opción sería que la levana de bajo peso molecular no pueda ser reconocida por la enzima a pesar de no estar asociada a partículas, debido a otra condición estructural como lo pudieran ser moléculas muy ramificadas.

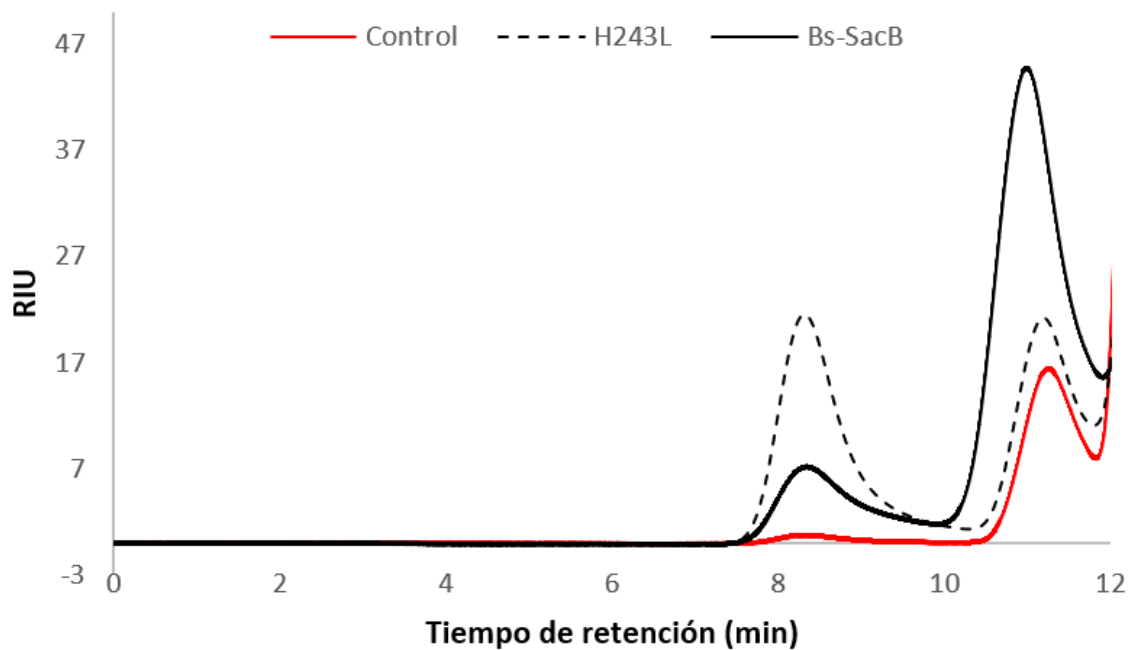


Figura 10. Comportamiento de la levana BPM-SacB en presencia de Triton X-100 como aceptor. En rojo se muestra el tiempo inicial de la reacción; en negro con líneas discontinuas la reacción con la mutante H243L a 1 U/mL; en línea negra continua la reacción con *Bs-SacB*. Las reacciones fueron llevadas a cabo a 100 g/L, 37 °C, 1 % de levana de BPM-SacB y 5% de Triton X-100.

Estos resultados nos confirman que las nanopartículas están presentes desde tiempos iniciales de reacción y muy particularmente que su tamaño no varía considerablemente durante la reacción, lo que nos llevó a plantear dos posibles hipótesis referentes a la cinética de formación de las nanopartículas:

1. El número de nanopartículas es constante durante la reacción: es decir, las cadenas de levanas que recién se sintetizan se agregan en una de las nanopartículas ya formadas, haciendo que su densidad aumente (mayor número de cadenas de levana/nanopartícula), sin que cambie su tamaño.
2. La formación de nuevas nanopartículas se da paralelamente a la síntesis de cadenas de levana, aumentando el número de partículas a medida que avanza la reacción.

En ambos casos, existe la posibilidad de que en estas nanopartículas queden embebidas cadenas de levanas con diversos grados de polimerización que, una vez dentro de la nanopartícula, difícilmente podrán ser elongadas. Para poder comprobar una de nuestras hipótesis cuantificamos el número de nanopartículas durante la reacción.

8.2.5 Cuantificación de nanopartículas

La técnica de Análisis de Rastreo de Nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés) nos permitió cuantificar el número de nanopartículas durante la reacción de síntesis de levana. En los resultados mostrados en la figura 22, se puede apreciar la distribución del tamaño de partícula de medios de reacción que resultan de síntesis empleando 10 U/mL, condición que da lugar a la síntesis exclusiva de levana de bajo peso molecular. La distribución del tamaño de partícula mostrado en la figura 22 corresponde a reacciones al 50% (A) y 75% (B) de conversión de sustrato. Podemos observar que los tamaños de partícula concuerdan con los que determinamos por DLS para una levana de bajo peso molecular. Observamos también como a medida que avanza la reacción, suceden cambios tanto en el promedio como en la distribución del tamaño de partícula. En la reacción a 50% de conversión el promedio del tamaño de partícula es de **102 nm**, En el caso de la reacción a 75% de conversión, el promedio del tamaño de partícula aumentó a **143 nm**.

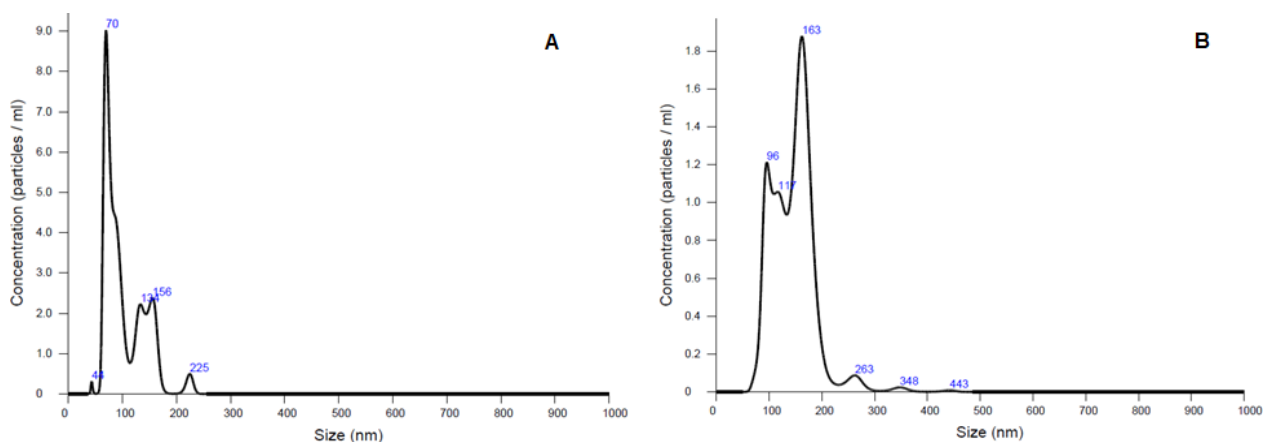


Figura 11. Distribución del tamaño y número de partículas analizado por NTA. Reacciones de *Bs-SacB* a 10 U/mL, 100 g/L de sacarosa y 37°C. En A) la reacción a 50 % de conversión: B) la reacción a 75 % de conversión.

Los datos de cuantificación de nanopartículas se muestran en la tabla 3, en la que podemos observar primeramente que el número de partículas aumenta a medida que avanza la reacción, al pasar de 1.31×10^{13} (50% de conversión) a 6.95×10^{13} (75% de conversión). Con estos datos y la cuantificación de levana de bajo peso molecular, se calculó el número de moléculas que en teoría existirían agregadas en cada nanopartícula, así como el número de residuos de fructosa por nanopartícula. Tomando el peso molecular de la levana de bajo peso molecular (8.3 KDa), tendríamos en promedio al “50% de conversión” alrededor de 15,000 cadenas de levana por nanopartícula, equivalentes a alrededor de 789,000 residuos de fructosa por nanopartícula. Para el caso de la reacción al “75% de conversión” el número de moléculas por nanopartícula sería de alrededor de 13,000 y el número de residuos de fructosa sería de 663,000. Al analizar estos datos, es necesario tomar en cuenta la distribución del tamaño de partícula que existe en cada caso (figura 22), ya que podría pensarse que con el avance de la reacción las partículas se hacen más grandes (de 102 a 146nm) y más abundantes (de 1.31 a 6.95×10^{13}), pero con menor número de cadenas de levana. Así, los datos de la tabla 4 son solo una referencia de lo más significativo, es la fotografía final que se tiene del resultado de la síntesis. La dinámica mediante la cual crecen y aumentan de tamaño las partículas es un tema quizás más complejo que la formación de las nanopartículas mismas.

Tabla 4. Tamaño, concentración y contenido de cadenas de levana y residuos de fructosa de nanopartículas sintetizadas por Bs-SacB en condiciones de síntesis de levana de bajo peso molecular (10 U/mL, 100 g/L de sacarosa y 37°C).

| | Tamaño de partícula promedio por NTA (nm) | Nanopartículas/mL | Moléculas /nanopartícula | Residuos de fructosa/ NP |
|-----------------------------|---|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Bs-SacB</i> 10 U/mL 50 % | 102 | 1.31×10^{13} | 15,472 | 789,076 |
| <i>Bs-SacB</i> 10 U/mL 75 % | 146 | 6.95×10^{13} | 13,009 | 663,496 |

El mismo análisis fue realizado para condiciones de síntesis exclusivamente de levana de alto peso molecular (0.1 U/mL), reacción relativamente lenta (7 días). Se analizaron muestras tomadas a las 24 h, cuando la reacción apenas ha avanzado un poco y a las 120 h, a las que consideramos que la reacción ha terminado (figura 23). Encontramos que, al igual que en el caso anterior, los tamaños de partícula medidos mediante NTA, corresponden a los medidos por DLS para una levana de alto peso molecular y se registran cambios durante la reacción, tanto en el promedio como en la distribución del tamaño de partícula. A las 24 h de reacción el promedio del tamaño de partícula es de **165 nm** con tamaños de hasta 286 nm. Después de 120 h de reacción, se observa una distribución más homogénea con partículas casi de un solo tamaño (121nm), un promedio es **146 nm**, y una pequeña población de partículas más grandes, de 278 nm.

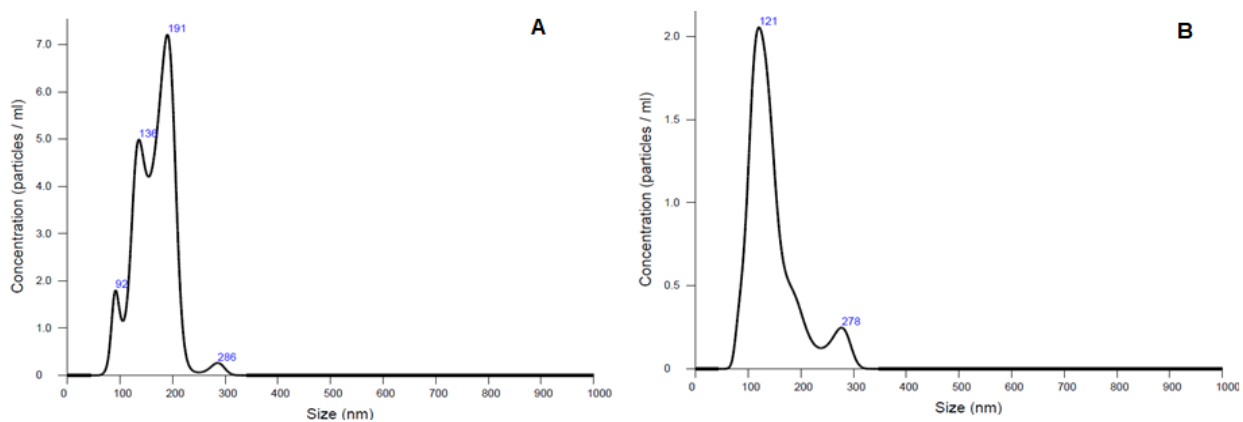


Figura 12. Distribución del tamaño y número de partículas analizado por NTA. Reacciones a 0.1 U/mL, 100 g/L de sacarosa y 37°C. En A) 24 h de reacción; B) 120 h de reacción.

Los datos de la cuantificación de nanopartículas para esta reacción se muestran en la tabla 5, en la que podemos observar que, al igual que en el caso anterior, el número de partículas aumenta a medida que avanza la reacción, al pasar de 2.78×10^{13} (24 h de reacción) a 3.38×10^{14} (120 h de reacción), mientras que el tamaño promedio disminuye.

El cálculo del peso molecular de la levana se realizó empleando dos métodos de detección: SEC-RI y SEC-MALS. De manera general los resultados mostrados en SEC-MALS, un método absoluto para determinar el peso molecular, muestran que la levana

de alto peso molecular podría tener un peso molecular de 35,600 KDa, un tamaño mucho mayor al obtenido con SEC-RI. Es a partir de estos datos que se llevaron a cabo los cálculos para determinar el número de moléculas que se encuentran agregadas y el número de residuos de fructosa por nanopartícula. Así, si consideramos 35,600 KDa, como el peso molecular promedio de la levana de alto peso molecular, tendríamos en promedio 1.78 cadenas de levana por nanopartícula y unos 392,000 residuos de fructosa por nanopartícula a las 24 h de reacción. A las 120 h de reacción, el número de moléculas habría disminuido en promedio a 0.57 y el número de residuos de fructosa a 124,000 por nanopartícula (todo esto asumiendo que toda la levana se encuentra en nanopartículas sin tener cadenas libres).

Tabla 5. Tamaño, concentración y contenido de cadenas de levana y residuos de fructosa de nanopartículas sintetizadas por *Bs-SacB* en condiciones de síntesis de levana de alto peso molecular (0.1 U/mL, 100 g/L de sacarosa y 37°C)

| | Promedio (nm) | Nanopartículas/mL | Moléculas /nanopartícula | Residuos de fructosa/NP |
|-------------------------------|---------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>Bs-SacB</i> 0.1 U/mL 24 h | 164.8 | 2.78E+13 | 1.78 | 392297 |
| <i>Bs-SacB</i> 0.1 U/mL 120 h | 146 | 3.83E+14 | 0.57 | 124788 |

Es decir, de acuerdo con estos cálculos, lo que observamos como una nanopartícula de levana de alto peso molecular, correspondería a una cadena de aproximadamente 219,750 (considerando el peso molecular de 35,600 KDa) residuos de fructosa que, de alguna manera, tendría que interaccionar intramolecularmente para adquirir la morfología de esfera con un tamaño de 150 nm de diámetro. Esta posibilidad se ha tomado en cuenta por otros investigadores: por ejemplo: Arvidson y colaboradores en 2006 utilizaron los datos de viscosidad intrínseca de la levana (producida por la enzima de *Bacillus* sp.), así como el tamaño de partícula para determinar su peso molecular. Partiendo de la ecuación

de Einstein para una suspensión diluida de esferas densas y de la ecuación para describir la relación entre la viscosidad de un polímero y la viscosidad de un solvente puro, además de ciertas consideraciones, se obtiene la ecuación 1, en la que asume que cadena de levana constituye una partícula:

$$[\eta] = \frac{10 \pi}{3} N_A \frac{R_H^3}{M}$$

ecuación 1

donde:

* $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca,

* N_A es el número de Avogadro,

* R_H el radio hidrodinámico

* M el peso molecular.

El radio que utilizaron fue de 95 nm y la viscosidad intrínseca de 0.14 dL/g, obteniendo como resultado un peso molecular para la levana de 386,000 kDa, 10 veces mayor al peso calculado por MALS para nuestra levana. El tamaño del polímero así calculado contrasta con el peso molecular que obtuvieron con SEC-RI, que fue de 1,000-2,000 KDa. De igual forma, los datos del peso molecular calculado exclusivamente a partir del tamaño de partícula para la levana sintetizada por las levansacarosas de *B. subtilis*, *Z. mobilis*, *E. herbicola* son 31,000 KDa, 226,000 KDa, 276,000 KDa respectivamente (Benigar et al. 2014), que, al igual que en el caso anterior, fueron calculados considerando a la nanopartícula como una cadena de levana. Los datos del peso molecular de la levana sintetizada por *B. subtilis* en el reporte de Benigar et al. (2014) concuerda con nuestros datos mostrados en MALS, aunque en su caso, el tamaño de partícula es mucho mayor (340 nm). Cabe mencionar que esta levana fue obtenida y purificada a partir de una biopelícula de exopolisacáridos producida por *B. subtilis*. Es claro que, con la información hasta aquí obtenida, no podemos aseverar que una cadena de levana se integre en una sola partícula, y aunque los datos apoyan esa hipótesis, es necesario profundizar en el análisis de la estructura para corroborarla.

Recientemente se reportó una concentración crítica de agregación (CCA) de 0.24 mg/mL para la levana producida por la enzima de *B. subtilis* NATE-1384. Esta concentración representa la cantidad mínima de levana que se necesita en solución para que tenga lugar la agregación (González-Garcinuño et al. 2019). Estos autores proponen que las cadenas de levana se encuentran libres y no asociadas hasta que se alcanza la CCA y colapsan, en un proceso reversible. Esto concuerda con nuestros datos, los cuales sugieren que se necesita una mínima cantidad de levana para iniciar el auto ensamblaje de las nanopartículas. Sin embargo, la cuantificación de nanopartículas en el NTA requiere de muestras muy diluidas para poder obtener una medición clara, diluciones que en nuestro caso alcanzaron tasas de hasta 1/50,000 y 1/250,000. Esto no concordaría con lo que postulan González-Garcinuño et al. (2019), quienes efectúan diluciones que los llevan a concentraciones de levana de hasta 0.000048 mg/mL aproximadamente, concentraciones a las cuales nosotros aun observamos nanopartículas, sugiriendo primeramente que el proceso no es reversible, y que desde que se sintetiza una cadena de levana esta adquiere la estructura de nanopartícula inmediatamente. Esto concuerda con lo que hemos planteado para la síntesis de levana de bajo peso molecular, en el sentido de que, una vez formada la nanopartícula, lo que ocurre inmediatamente, las cadenas no pueden ya ser elongadas por la enzima. Para el caso de la levana de alto peso molecular su síntesis podría ser explicada mediante un mecanismo de elongación de cadenas totalmente procesivo, en el que solo hasta alcanzar cierto tamaño (35,000 kDa) deja de interactuar con la enzima, momento en el cual la cadena puede tener interacciones intramoleculares y dar lugar a la estructura de nanopartícula.

Por lo antes expuesto, nos dimos a la tarea de analizar el mecanismo de síntesis de levana de alto peso molecular, que presentamos en la siguiente sección.

8.2.6 Precipitación fraccionada de levana de alto peso molecular

Se ha propuesto que la elongación de la levana de alto peso molecular se lleva a cabo por un mecanismo *procesivo*, derivado del hecho de que en el medio de síntesis - analizado por cromatografía en capa fina o mediante HPAEC-PAD- solo se observan las levanas del más alto peso molecular, sin los intermediarios que sí se observan en la síntesis de levana de bajo peso molecular. Sin embargo, esto puede deberse a que, por su tamaño, los intermediarios que llevan a la levana de alto peso molecular no se puedan

observar sino hasta que se acumulen al final de la síntesis. El que no se observen los intermediarios mediante dichas técnicas, especialmente en SEC-RI, no significa que no existan, considerando la tendencia que tienen las levanas en solución de formar nanopartículas en la que existe la posibilidad de agrupar intermediarios de la reacción de diversos tamaños dentro de la nanopartícula. Esta idea la soporta también el fenómeno observado en este trabajo, en el que detectamos que las cadenas de levana libres tienden a integrarse en nanopartículas inmediatamente después de formadas, desde el inicio de la reacción.

La precipitación fraccionada de levanas ha sido empleada desde hace años para la separación de levanas de diversos tamaños (Ehrlich et al. 1974), y más recientemente por Hundschell et al. (2019). Estos últimos autores realizaron una precipitación con diferentes volúmenes de etanol para obtener levanas de diversos pesos moleculares, para posteriormente analizar su comportamiento como nanopartícula, encontrando que no existe gran diferencia en el tamaño de partícula a pesar del analizar levanas de muy distinto peso molecular. En la sección anterior, reportamos un resultado similar al estudiar muestras de levana de bajo y alto peso molecular.

Sin embargo, uno de los objetivos adicionales que perseguíamos al abordar la caracterización de las nanopartículas mediante esta estrategia, era la búsqueda de intermediarios de reacción. Como se describe en la sección de métodos, se partió de una solución de levana de alto peso molecular, la cual fue sometida a 5 pasos de precipitación fraccionada con cantidades crecientes de etanol como solvente. Cada una de las fracciones fue analizada por SEC-RI.

Una característica que encontramos en general fue la dispersión de tamaños de las fracciones, particularmente las fracciones III y IV. La tabla 6 muestra los resultados obtenidos para cada fracción donde se puede observar que la fracción I contiene -como es de esperarse- las moléculas de levana de más alto peso molecular, aunque con presencia importante de levanas de un peso molecular menor. Como veremos más adelante, estas levanas bien podrían corresponder a intermediarios en la síntesis de levana de alto peso molecular, ya que existen también en las fracciones subsecuentes, precipitadas con mayor cantidad de alcohol, particularmente en la fracción III.

Tabla 6. Análisis por SEC-RI de fracciones de levana obtenidas a partir de una levana de alto peso molecular, mediante precipitación fraccionada.

| Fracción | Volumen de etanol (mL) | Concentración (g/L) | % en masa | Mw (KDa) |
|----------|------------------------|---------------------|-----------|----------|
| FI | 83 | 27.8 | 56.87 | 2365 |
| FII | 17.5 | 26.2 | 11.31 | 1334 |
| FIII | 25 | 35.8 | 22.09 | 1203 |
| FIV | 23 | 14.3 | 8.12 | 324 |
| FV | 33 | 2 | 1.59 | 4.7 |

Los resultados son sorprendentes, en el sentido de que permitirían plantear un mecanismo *no procesivo* de síntesis de levana, al encontrar los intermediarios que hasta la fecha no habían sido reportados.

Las muestras descritas en la Tabla 6 fueron analizadas también por el método de detección, MALS (Multi-Angle Light Scattering), para corroborar el peso molecular de cada fracción, pero utilizando el mismo método de separación. Los pesos moleculares determinados para las levanas de cada fracción obtenidos mediante este equipo se reportan en la Tabla 7, de la que se desprenden dos observaciones interesantes:

Lo primero es que, los pesos moleculares obtenidos con este detector son un orden de magnitud mayores que los obtenidos por SEC-RI, es decir para una levana de alto peso molecular corresponde un peso molecular de $\gg 2,000$ kDa a partir de una curva de calibración elaborada con dextranas, el detector MALS asigna un peso molecular alrededor de 35,620 kDa.

Lo segundo es que, al igual que con SEC-RI, confirmamos la presencia de levana con una gama de diversos pesos moleculares formando parte de una muestra de levana de alto peso molecular. En efecto, la **fracción I** presenta un peso molecular igual al que se determinó para la levana de alto peso molecular **sin fraccionar** (39,000 kDa aproximadamente) con índice de polidispersidad de 1.39 - el cual nos indica el grado de variación de pesos moleculares en la muestra- aunque también podemos observar una sub-fracción de un menor peso molecular (1,700 kDa aproximadamente) pero con un porcentaje de masa del 17.4% e índice de polidispersidad de 10, es decir, esta sub-

fracción presenta una distribución más amplia de pesos moleculares mucho mayor, sugiriendo la presencia de los muchos intermediarios de la reacción.

La **fracción II** está compuesta a su vez por dos sub-fracciones, una de un peso molecular alto (50,000 kDa aproximadamente) representando el 10.4 % de la muestra y con un índice de polidispersidad de 1.25 y otra que representa la mayor parte de la levana, es decir un 89.6 % con un peso molecular de 217 kDa aproximadamente. En este último pico el índice de polidispersidad es de 6. El error en ambos parámetros es muy grande (80-100 %) lo que al igual que en la muestra anterior, resulta probablemente de la presencia de múltiples intermediarios de diferentes tamaños también en esta muestra. En la **fracción III** se aprecian 3 distribuciones, una de alto peso molecular (24,000 kDa aproximadamente) con un índice de polidispersidad de 1.25 pero que representa solo el 4.2 %. La segunda con un peso molecular de 69 kDa que representa el 50.9% con un índice de polidispersión de 3, una distribución similar a la que se observa en la fracción II, pero con una menor dispersión. La tercera distribución representa el 44.8% de la muestra inyectada, y tiene un peso molecular promedio de tan solo 0.69 kDa, por lo que podría considerarse que contiene FOS.

La **fracción IV** contiene cadenas de levana distribuidas de una forma muy similar a la fracción III, es decir, tres distribuciones de las cuales la primera con un alto peso molecular pero que contiene la menor cantidad de levana, la segunda que contiene casi la mitad de la masa de la fracción, y la tercera que también contiene una masa importante de la fracción, pero que, como en el caso anterior, dado su peso molecular muy probablemente este constituida por FOS.

Existen diversos reportes de la caracterización de levanas producidas por levansacarasas de múltiples fuentes, sin embargo, la información sobre su peso molecular ha sido obtenido por diversas técnicas (SEC-RI y SEC-MALS principalmente) o bien mediante cálculos teóricos, pero hasta ahora, en ningún reporte se ha hecho un estudio comparativo entre las diversas técnicas. Sin embargo, dada la naturaleza de las moléculas de levana y su peculiar comportamiento, es evidente que su comportamiento en solución no corresponde al de los estándares que normalmente se emplean para calibrar los equipos con detectores de índice de refracción. En cambio, la técnica que emplea como detector un MALS, no requiere de estándares de calibración pues el método para medir el peso molecular es absoluto. Para corroborar que no es una diferencia

provocada por el método, se analizaron los estándares de dextrana tanto por SEC-RI, como por SEC-MALS, encontrándose, como era de esperarse, que este último permitió determinar el peso molecular de nuestros estándares con exactitud. En consecuencia, podemos tener relativa seguridad al afirmar que el peso molecular de la levana de alto peso molecular producida por *Bs-SacB* podría ser de 35,600 KDa.

Tabla 7. Precipitación fraccionada de la levana de alto peso molecular analizada por SEC-MALS. Se muestran los datos del peso molecular y el porcentaje que representa cada pico encontrado. En donde: Mw es el peso molecular; Mw/Mn es el índice de polidispersidad

| <i>Fracción</i> | <i>Pico 1</i> | | | <i>Pico 2</i> | | | <i>Pico 3</i> | | |
|-------------------|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|----------------------|-------------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| | Mw (kDa) | Mw/Mn | Masa del pico (%) | Mw (kDa) | Mw/Mn | Masa del pico (%) | Mw (kDa) | Mw/Mn | Masa del pico (%) |
| <i>LEVANA APM</i> | 35,620 (±3.544%) | 1.075 (±5.325%) | 94 | 4,901 (±2.944%) | 7.515 (±5.609%) | 6 | | | |
| <i>FI</i> | 39,860 (±7.006%) | 1.395 (±9.603%) | 82.6 | 1,709 (±3.336%) | 10.111 (±34.023%) | 17.4 | | | |
| <i>FII</i> | 50,020 (±1.545%) | 1.250 (±2.449%) | 10.4 | 217.9 (±82.901%) | 6.100 (±102.446%) | 89.6 | | | |
| <i>FIII</i> | 24,930 (±2.660%) | 1.257 (±3.802%) | 4.2 | 69.18 (±12.537%) | 3.636 (±21.610%) | 50.9 | 0.69 (±79.539%) | 1.445 (±105.465%) | 44.8 |
| <i>FIV</i> | 14,060 (±5.072%) | 2.085 (±7.381%) | 1.4 | 83.19 (±53.388%) | 3.370 (±68.981%) | 57.9 | 0.94 (±29.505%) | 1.027 (±38.788%) | 40.7 |

Los datos obtenidos en esta sección sugieren que, contrario a lo que se ha reportado con anterioridad (Raga-Carbajal et al. 2016; Ozimek et al. 2006), el mecanismo de elongación de levana de alto peso molecular es no *procesivo*, ya que aquí mostramos que la levana de alto peso molecular está constituida por una amplia gama de cadenas de levana de diversos pesos moleculares integradas en las nanopartículas. Es solo cuando la levana se fracciona con etanol que se logra apreciar esta diversidad, caracterizada también por una amplia polidispersión, en este caso, particularmente en las fracciones III y IV. Esto concuerda con la dificultad que implicaría un proceso en el que una enzima de 52 kDa pueda sintetizar la levana de tan alto peso molecular en forma *procesiva*, dando lugar a una molécula producto gigantesca comparada con la enzima. Para ser procesivo, además, la cadena tendría que estar permanentemente asociada a la enzima, dificultando el crecimiento por el extremo reductor, así como realizar las ramificaciones.

A pesar de haber generado esta valiosa y novedosa información, no es posible establecer de forma clara o concreta, la influencia de la formación de las nanopartículas en la síntesis de levana, y menos aún si el fenómeno de agregación afectaría los límites de elongación. No obstante, descubrimos que en la síntesis de levana de bajo peso molecular, las nanopartículas se forman desde el inicio de la reacción, por lo que se podría sugerir que, una vez liberada la cadena de levana, dependiendo de otros factores como en este caso es la concentración de enzima, esta se agregará inmediatamente en una nanopartícula, haciendo difícil su elongación por la enzima.

Por otro lado, en las condiciones de síntesis de levana de alto peso molecular, en las que de igual manera existe la formación de nanopartículas desde el inicio de la reacción, y donde los datos sugieren que se trata de un mecanismo no procesivo, tendríamos cadenas de levana que si son elongadas hasta obtener una molécula de 35,600 KDa.

Lo anterior nos lleva a pensar que podría existir otro factor muy importante para este caso, como lo pueden ser las ramificaciones en la estructura de la levana, algo que hasta ahora nadie ha tomado en cuenta en el proceso de elongación y agregación y que podría dar respuesta a algunas de estas incógnitas. Una pregunta que surge de estas conclusiones es el requisito en términos de ramificaciones que podría tener una cadena de levana para colapsar y formar nanopartículas.

9 CONCLUSIONES

El efecto de la concentración de enzima en el peso molecular de la levana sintetizada es similar entre *Bs-SacB* y las mutantes **H243L** y **S164A**

Se demostró que la interacción enzima-levana-enzima o enzima-enzima es esencial para evitar que las cadenas de polímero crezcan hasta tamaños característicos de las levanas de alto peso molecular. Esto se logró mediante la inmovilización de la enzima en esferas de agarosa Ni-NTA

Tanto la levana de bajo peso molecular como la de alto peso molecular forman nanopartículas en solución con un tamaño de partícula de al menos 100 nm

El autoensamble de nanopartículas de levana en la reacción ocurre desde el inicio de reacción y a concentraciones muy bajas de levana, tanto para levana de bajo como de alto peso molecular, además de que estas nanopartículas son muy estables y difíciles de desensamblar.

El número de nanopartículas aumenta a medida que avanza la reacción, y al parecer hay cambios en la distribución de pesos moleculares.

Existen intermediarios de reacción en la síntesis de levana de alto peso molecular que solo pueden ser observados mediante una precipitación fraccionada de levana lo que sugieren la síntesis mediante un mecanismo no *procesivo*

El peso molecular de la levana, hasta ahora reportado para *Bs-SacB* de 2,200 KDa, según determinaciones por SEC-RI, resulta ser de al menos 35,000 KDa mediante SEC-MALS.

10 BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Fattah, A. F., Mahmoud, D. A. & Esawy, M. A., 2015. Production of Levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and Enzymic Synthesis of Levan and Fructo-Oligosaccharides. *Current Microbiology*, 51 , p. 402–407.

Arvidson, S. A., Rinehart, T. & Gadala-Maria, F., 2006. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp.. *Carbohydrate Polymers*, 65 , p. 144–149.

Bazani Cabral de Melo, F. C. y otros, 2015. Study of levan productivity from *Bacillus subtilis* Natto by surface response methodology and its antitumor activity against HepG2 cells using metabolomic approach. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 28, pp. 1917-1926.

Beine, R. y otros, 2008. Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering. *Journal of Biotechnology*, 138 , p. 33–41.

Benigar, E. y otros, 2014. Structure and Dynamics of a Polysaccharide Matrix: Aqueous Solutions of Bacterial Levan. *Langmuir* , 30(14), p. 4172–4182 .

Bhattacharjee, S., 2016. DLS and zeta potential—What they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release*, 235, pp. 337-351.

Carriere, C. J., Amis, E. J. & Schrag, J. L., 1993. Dilute-solution dynamic viscoelastic properties of xanthan polysaccharide. *Journal of Rheology*, 37 (3), pp. 469-478.

Chambert, R. & Petit-Glatron, M. F., 1991. Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal*, 276 (1), pp. 35-41.

Chambert, R., Treboul , G. & Dedonde, R., 1974. Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 41, pp. 285-300.

Davies, G. J., Wilson, K. S. & Henrissat, B., 1997. Nomenclature of sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321 , pp. 557-559.

Ehrlich, J. y otros, 1974. Levans:I. Fractionation, solution viscosity, and chemical analysis of Levan produced by *Streptococcus salivarius*. *Journal of Dental Research*, 54, p. 290–297.

González-Garcinuño , Á. y otros, 2019. Differences in levan nanoparticles depending on their synthesis route: Microbial vs cell-free systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, pp. 62-68.

González-Garcinuño, Á. y otros, 2018. Levan and levansucrases: Polymer, enzyme, microorganisms and biomedical applications. *Biocatalysis and Biotransformation*. 36, pp. 233-244.

Held, D. & Kilz, P., 2014. GPC/SEC as a key tool for assessment of polymer quality and determination of macromolecular properties. En: W. F. REED & A. M. ALB, edits. *Monitoring Polymerization Reactions: From Fundamentals to Applications*. New Orleans, Louisiana: Wiley, pp. 171-200.

Hundschell, C.S.; Jakob, F.; Wagemans, A.M. Molecular Weight Dependent Structure and Polymer Density of the Exopolysaccharide Levan. arXiv 2019, arXiv:1909.07737

Hill, A. y otros, 2019. Discovery of new levansucrase enzymes with interesting properties and improved catalytic activity to produce levan and fructooligosaccharides. *Catalysis Science & Technology*, 9, pp. 2931-2944.

Homann, . A. y otros, 2007. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *The Biochemical Journal*, 407, pp. 189-198.

Jang, K.-H.y otros, 2006. High-Level Production of Low-Branched Levan from *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 for the Production of di-β-D-Fructofuranose Dianhydride IV. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (1), p. 102–108.

Jumel , K. y otros, 1996. Molar mass and viscometric characterisation of hydroxypropylmethyl cellulose. *Carbohydrate Polymers* 29 , pp. 105-109.

Liua, Q. y otros, 2017. Efficient biosynthesis of levan from sucrose by a novel levansucrase from *Brenneria goodwinii*. *Carbohydrate Polymers*, 157, pp. 1732-1740.

Lu, L. y otros, 2014. A recombinant levansucrase from *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1 catalyzes versatile transfructosylation reactions. *Process Biochemistry*, 49, pp. 1503-1510.

Meng , G. & Fütterer , K., 2003. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Natural Structural & Molecular Biology*, 10, pp. 935-941.

Meng, G. & Fütterer , K., 2008. Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BCM Structural Biology*, 8 (16).

Nakapong, S. y otros, 2013. High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, pp. 30-36.

Newbrun, E., Lacy, R. & Christie, T. M., 1971. The Morphology And Size Of The Extracellular Polysaccharides From Oral Streptococci. *Archives of Oral Biology* 16, pp. 863-872.

Olvera, C., Castillo, E. & López-Munguía, A., 2008. Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. En: *Una ventana al quehacer científico*. Cuernavaca, Morelos: UNAM, Instituto de biotecnología, pp. 327-342.

Öner, E. T., Hernández , L. & Combie, J., 2016 . Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*, 34, pp. 827-844.

Ortiz-Soto, M. E. y otros, 2018. Product-Oriented Chemical Surface Modification of a Levansucrase (SacB) via an Ene-type Reaction. *Chemical Science*, 9 (24), pp. 1-11.

Ortiz-Soto, M. E., Porras-Domínguez, J. R., Seibel, J. & López-Munguía, A., 2019. A close look at the structural features and reaction conditions that modulate the synthesis of low and high molecular weight fructans by levansucrases. *Carbohydrate Polymers*, 219, p. 130–142.

Ortiz-Soto, M. E. y otros, 2008. Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering, Design & Selection*, 21, p. 589–595.

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*, 152, pp. 1187-1196.

Porras Domínguez, J. R. y otros, 2015. Bacillus subtilis 168 levansucrase (SacB) activity affects average levanmolecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 132 (5), pp. 338-344.

Raga-Carbajal, E. y otros, 2016. Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in Bacillus subtilis levansucrase. *Glycan Synthesis*, 26, pp. 377-385.

Raga-Carbajal, E., López-Munguia, 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*, Volumen 8, 15035.

Rhee, S. y otros, 2005. *Levan Biopolymers Online*. s.l.:Steinbüchel .

Ritsema, T. & Smeekens, S. C. M., 2003. Engineering fructan metabolism in plants. *Journal of Plant Physiology*, 160, p. 811–820 .

Santos-Moriano, P. y otros, 2015. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from Zymomonas mobilis: Effect of reaction conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 119, pp. 18-25.

Seibel, J. y otros, 2006. Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of Bacillus subtilis fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydrate Research*, 341, p. 2335–2349.

Sezer, A. D. y otros, 2017. Development and characterization of vancomycin-loaded levan-based microparticulate system for drug delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22, pp. 627-634 .

Sezer, A. D., Kazakb, H., Önerb, E. T. & Akbuğa, J., 2011. Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: Optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 84, p. 358–363.

Striolo, A. y otros, 2001. Dilute-solution properties of arborescent polystyrenes: further evidence for perturbed-hard-sphere behavior. *Polymer* 42, pp. 2579-2584.

Tanaka, T., Oi, S. & Yamamoto, T., 1980. The Molecular Structure of Low and High Molecular Weight Levans Synthesized by Levansucrase. *Journal Of Biochemistry* 87, pp. 297-303.

Ullrich, M., 2009. *Bacterial polysaccharides: Current innovations and future trends*. Norfolk, UK: Horizon Scientific Press.

Wichienchot, S. y otros, 2011. Extraction and analysis of prebiotics from selected plants from southern Thailand. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33 (5), pp. 517-523.

Xu, W. y otros, 2018. Physicochemical properties of a high molecular weight levan from *Brenneria* sp. EniD312. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, pp. 810-818.