



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA SOBRE EL TAMAÑO Y LA
DISTRIBUCIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA LEVANA SINTETIZADA POR SACB DE

Bacillus subtilis 168

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
SOL CASTREJÓN CARRILLO

DR. AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

DRA. NINA PASTOR COLÓN
[Universidad Autónoma del Estado de Morelos](#)

DRA. GLORIA SAAB RINCÓN
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. Mayo, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

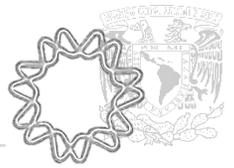


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

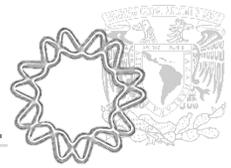
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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 y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Doctor Agustín López Munguía.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante la beca de maestría con número 958042 y se desarrolló en el marco del proyecto de Ciencia Básica CONACYT AS-S-21209, sobre funcionalidad de glicosiltransferasas.



Miembros del jurado

Presidente: Dra. Claudia Martínez Anaya
Instituto de Biotecnología, UNAM

Secretaria: Dra. Wendy Xolalpa Villanueva
Instituto de Biotecnología, UNAM

Vocal: Dr. Ernesto Ortiz Suri
Instituto de Biotecnología, UNAM

Vocal: Dr. Miguel Costas Basín
Facultad de Química, UNAM

Vocal: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
Facultad de Química, UNAM



Agradecimientos académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Biotecnología, de donde me siento orgullosa de pertenecer.

Al *Doctor Agustín López Munguía*, por aceptarme en su grandioso equipo de trabajo, apoyarme en cada momento y brindarme su confianza para iniciar este increíble proyecto. Gracias por transmitirme el gusto y sus conocimientos del complejo y maravilloso mundo de las enzimas.

A la *Doctora Nina Pastor Colón* y a la *Doctora Gloria Saab* por sus consejos, enseñanzas y sus aportaciones continuas a este proyecto.

A la *M.C. María Elena Rodríguez Alegría*, por todo su apoyo técnico a lo largo del proyecto. Gracias por compartirme sus conocimientos, experiencias y grandes ideas que contribuyeron a este trabajo.

A *Fernando González Muñoz*, por su apoyo técnico y enseñanzas en el uso de los equipos. Gracias por su paciencia y ayuda.

Al *Doctor Ernesto Ortiz Suri*, a la *Doctora Wendy Xolalpa Villanueva*, a la *Doctora Claudia Martínez Anaya*, a la *Doctora Maricarmen Quirasco Baruch* y al *Doctor Miguel Costas Basín*. Gracias por su dedicación y el tiempo invertido en la revisión de este documento. Sus aportaciones fueron muy valiosas para el enriquecimiento de mi informe.

Al *M.C. Eliseo Molina*, por su excelente asesoría en técnicas de Biología Molecular y por las grandes enseñanzas.

Al *Doctor Jaime Porras*, por su apoyo en los análisis computacionales con MOE y compartirme sus conocimientos.

Al *Doctor Sabino Pacheco*, por su invaluable apoyo y su tiempo para llevar a cabo los experimentos de FRET.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBt, particularmente al *Dr. Rubén Paul Gaytán Colín* y el *M.C. Eugenio López Bustos*, por su profesionalismo y apoyo con la secuenciación y la síntesis de oligonucleótidos.

A *Aurelia Ocampo Vargas* y *Judith Uribe Soriano*, por su apoyo en la preparación de soluciones y la limpieza del laboratorio y del material.

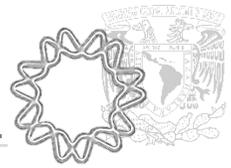
A *Lic. Antonio Bolaños Guillen*, por su apoyo administrativo y humano.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado, PAEP. Por la beca otorgada para la presentación de este trabajo en: International Meeting on Structural Biology. Structure, Dynamics and Interactions.



Índice

1. Resumen.....	12
2. Introducción	13
3. Generalidades.....	15
3.1 Levanas y levansacararas.....	15
3.2 Levansacarasa <i>Bs</i> -SacB	16
3.3 Efecto de las condiciones de reacción en el peso molecular de la levana	18
3.3.1 Efecto de la concentración de enzima en el medio de reacción.....	19
3.3.2 Inmovilización de la enzima	21
3.3.3 Modificación química de levansacararas.....	22
3.4 Estudios de la relación <i>estructura-función</i> en levansacararas	22
3.4.1 Estructura cristalográfica de las LS	22
3.4.2 Unión a otros ligandos	23
3.4.3 Mutagénesis sitio dirigida en elementos estructurales de la enzima.....	24
3.4.4 Nuevos sitios externos de unión a fructosa identificados en <i>Bs</i> -SacB y su variante S164A ...	26
3.4.5 Efecto de la fusión de dominios terminales a SacB.....	27
3.5 Efecto de la etiqueta de histidinas en la función de algunas enzimas.....	28
3.6 Interacciones proteína-proteína.....	29
3.6.1 Transferencia de resonancia de Förster (FRET)	30
3.6.2 Probables interacciones proteína-proteína involucradas en el proceso de alargamiento de la levana	32
4. Hipótesis	34
5. Objetivo.....	34
5.1 Objetivos particulares	34
6. Métodos.....	35
6.1 Eliminación de etiqueta His ₆	35
6.2 Selección de sitios a mutar.....	36
6.3 Mutagénesis	36
6.4 Obtención de enzimas	37
6.5 Ensayo de actividad de levansacarasa.....	38
6.6 Síntesis de levana	38
6.7 Cuantificación de azúcares	39
6.8 Análisis del peso molecular de levana	39
6.9 Ensayo de transferencia de resonancia de Förster	39



6.10 Análisis estructural.....	40
7. Resultados y discusión.....	42
7.1 Efecto de la etiqueta de histidinas en la especificidad de SacB.....	42
7.2 Estudio de la modificación del SEUF-1, SEUF-2 y SEUF-3	46
7.2.1 Estudio del sitio externo de unión a fructosa (SEUF) 1.....	47
7.2.2 Estudio del sitio externo de unión a fructosa (SEUF) 2.....	50
7.2.3 Estudio del sitio externo de unión a fructosa (SEUF) 3.....	55
7.3 Análisis de la interacción proteína-proteína mediante FRET	59
7.4 Análisis estructural.....	63
7.5 Propuesta de mecanismo de elongación de la levana por <i>Bs</i> -SacB	71
8. Conclusiones	73
9. Perspectivas.....	75
10. Referencias.....	76
11. Anexo	80



Figura 1. Estructura química de la levana	15
Figura 2. Mecanismo de reacción de <i>Bs</i> -SacB.	16
Figura 3. Síntesis de intermediarios de la reacción de producción de levana de bajo peso molecular, a partir de sacarosa por <i>Bs</i> -SacB. (Traducido de Ortiz-Soto et. Al., 2019).....	18
Figura 4. Efecto de la concentración de enzima en la distribución de peso molecular de levana. (A-C) Perfil de polímero analizado por HPSEC. (A'-C') Perfil de fructooligosacáridos analizado por HPAEC-PAD. A-A') 0.55 µg/mL B-B') 5.5 µg/mL y C-C') 55.0 µg/mL de SacB ⁸ . HMW: levana de alto peso molecular, LMW: levana de bajo peso molecular.	20
Figura 5. Comparación de los perfiles finales de levana obtenidos por SacB, complementados con proteínas distintas. Las reacciones de SacB emplean 0.1 U/mL de enzima activa complementadas con lisozima, albúmina o la doble mutante inactiva hasta alcanzar 55 µg/mL de proteína total.....	21
Figura 6. Estructura cristalográfica de SacB expresada por <i>Bacillus subtilis</i> (PDB:1OYG).....	23
Figura 7. Sitios de unión potenciales de β-fructofuranosa en la superficie de <i>Bs</i> -SacB. A-B) Se identificaron dos subsitios en la misma región de SacB WT (PDB: 1OYG) y variante S164A (PDB: 6PWQ) mediante experimentos de acoplamiento molecular entre <i>Bs</i> -SacB y S164A con fructosa. C) SEUF-3 identificado en S164A (PDB: 6PWQ). D) Estructura cristalográfica de SacB WT (PDB: 1OYG). Cada SEUF está marcado con un color correspondiente, así como el sitio catalítico y el N y C terminal.....	27
Figura 8. Fundamentos FRET: (a) Representación esquemática de FRET. El donante excitado (D) transfiere energía por un proceso no radiativo al receptor cercano (A), haciendo que emita fluorescencia. La distancia entre fluoróforos no debe exceder los 10 nm; (b) El pico de emisión del donante debe solaparse con el de excitación del receptor. El área gris corresponde a la región de superposición.....	31
Figura 9. Los principios básicos de fluorescencia y FRET. (A) Diagrama de Jablonski, que explica el efecto de la fluorescencia. (B) Diagrama de Jablonski que explica el efecto de FRET.....	32
Figura 10. Representación de la técnica utilizada para eliminar la etiqueta His ₆ . A) Diseño de oligonucleótidos en el vector pEt22b-SacB, la etiqueta His ₆ se presenta en color azul x6H). B) Vector obtenido a partir de la PCR inversa (pEt22b-SacBSHT). La región morada contiene el nuevo sitio de corte para XbaI. C) Oligonucleótidos directo y reverso, la región morada se diseñó para ser complementaria una de otra y así circularizar el vector. (La representación de los fragmentos es descriptivo, no corresponden al tamaño real).....	35
Figura 11. Geles de agarosa para análisis de mutagénesis por PCR inversa.....	43

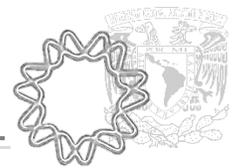
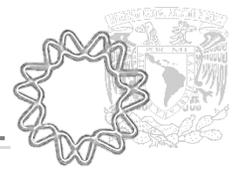


Figura 12. LS analizadas por SDS-PAGE 10% A) SacB WT y SacBSHT B) SacB WT y variante E275A C) SacB WT y variantes K148A y D83A expresadas en <i>Escherichia coli</i> BL21. (Marcador de peso molecular PageRuler).....	43
Figura 13. Relación <i>Hidrólisis/Transfructosilación</i> de la LS SacB WT y SacBSTH evaluadas con 100 g/L de sacarosa, a 37°C, empleando diferentes concentraciones de enzima	44
Figura 14. Distribución del peso molecular de la levana producida por SacB WT (línea continua) y SacBSTH (línea discontinua), empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa, a 37°C y pH 6. A) Reacción con 0.55 µg/mL de enzima equivalente a 0.1 U/mL, B) Reacción con 5.5 µg/mL de enzima equivalente a 1.0 U/mL, C) Reacción con 55.0 µg/mL de enzima equivalente a 10 U/mL.....	45
Figura 15. LS analizadas por SDS-PAGE 10% A) SacB WT y variante E275A B) SacB WT y variantes K148A y D83A expresadas en <i>Escherichia coli</i> BL21. (Marcador de peso molecular PageRuler).....	47
Figura 16. Relación <i>Hidrólisis/Transfructosilación</i> de la LS SacB WT y mutante E275A a 100 g/L de sacarosa y 37°C a diferentes tiempos y concentraciones de enzima	48
Figura 17. Distribución del peso molecular de la levana producida por SacB WT (línea continua) y mutante E275A (línea punteada), empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa, a 37°C y pH 6. A) Reacción con 0.55 µg/mL de enzima equivalente a 0.1 U/mL, B) Reacción con 5.5 µg/mL de enzima equivalente a 1.0 U/mL, C) Reacción con 55.0 µg/mL de enzima equivalente a 10 U/mL.....	49
Figura 18. Relación (<i>Hidrólisis/Transfructosilación</i>) de la LS SacB WT y mutante K148A evaluada a 100 g/L de sacarosa y 37°C a diferentes tiempos y concentraciones de enzima.....	50
Figura 19. Distribución del peso molecular de la levana producida por SacB WT (línea continua) y mutante K148A (línea punteada), empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa, a 37°C y pH 6. A) Reacción con 0.55 µg/mL de enzima equivalente a 0.1 U/mL, B) Reacción con 5.5 µg/mL de enzima equivalente a 1.0 U/mL, C) Reacción con 55.0 µg/mL de enzima equivalente a 10 U/mL.....	51
Figura 20. Relación <i>Hidrólisis/Transfructosilación</i> de la LS SacB WT y mutante K148A/D145A evaluada a 100 g/L de sacarosa y 37°C a diferentes tiempos y concentraciones de enzima.....	54
Figura 21. Distribución del peso molecular de la levana producida por SacB WT (línea continua) y mutante K148A/D145A (línea punteada), empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa, a 37°C y pH 6. A) Reacción con 0.55 µg/mL de enzima equivalente a 0.1 U/mL, B) Reacción con 5.5 µg/mL de enzima equivalente a 1.0 U/mL, C) Reacción con 55.0 µg/mL de enzima equivalente a 10 U/mL.....	55
Figura 22. Análisis de la actividad específica respecto al tiempo de la variante D83A a 28 y 37°C.....	57
Figura 23. Ubicación de D83A en SacB WT (PDB:1OYG) en relación con los aminoácidos en el sitio activo. Visualización obtenida a través de PyMOL Molecular Graphics System, Versión 2.3.4. A) SacB WT se presenta en color azul y D83A en verde. Los residuos que forman parte de la catálisis se encuentran en color	



negro. Superposición de ambas estructuras. B) Posición de D83. El cambio por alanina provoca pérdida de la hoja beta. C) Interacciones entre D83 y aminoácidos a 4 Å de distancia..... 59

Figura 24. Relación *Hidrólisis/Transfructosilación* de la LS SacB WT y mutante D83A evaluada a 100 g/L de sacarosa y 28°C a las 24h de reacción, empleando 1.0 U/mL (equivalente a 16.5 µg/mL de D83A y 5.5 µg/mL de SacB WT)..... 60

Figura 25. Distribución del peso molecular de la levana producida por SacB WT (línea continua) y mutante D83A (línea punteada), empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa, a 28°C y pH 6. A) Reacción a 1.0 U/mL, equivalente a 5.5 µg/mL de SacB WT y 16.5 µg/mL de D83A, B) Reacción a 10 U/mL, equivalente a 55.0 µg/mL de SacB WT y 165.0 µg/mL de D83A..... 61

Figura 26. SDS-PAGE revelados por medio de un transiluminador de luz UV, los pesos moleculares se identificaron al revelar el mismo gel en azul de Comassie. A) Se presenta el marcaje de SacB WT con el fluoróforo AF546 en donde se observaron dos bandas, una a 52 kDa y la otra a 110 kDa aproximadamente. B) Marcaje de SacB WT con AF647. En ambos geles se incluyó SacB WT sin tratamiento de marcaje, así como el marcador de peso molecular PageRuler y se observa fluoróforo no unido en la parte inferior del gel..... 62

Figura 27. Efecto de la derivatización de SacB con los fluoróforos AF546 (rojo) y AF647 (verde) en el perfil de productos obtenidos empleando 1 U/mL de enzima, 37°C, pH 6. Se observa la misma distribución de peso molecular en un cromatograma de GPC. En la tabla de la izquierda se reporta la actividad específica global de cada una de las variantes de SacB marcadas con el fluoróforo respectivo..... 62

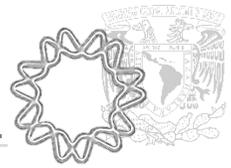
Figura 28. Espectros de emisión de fluorescencia de AF546-SacB WT, AF647-SacB WT y mezcla. La longitud de onda de excitación fue de 546 nm, El tiempo de integración se mantuvo constante y fue de 20 µs. A) Análisis con sacarosa 100 g/L B) Ensayo sin presencia de sustrato. 63

Figura 29. Análisis de la distribución del peso molecular de levana en condiciones de ensayo FRET, a diferentes proporciones de SacB-AF647 (aceptor). Reacciones en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6, sacarosa 100 g/L, 37°C, 60 min. Las concentraciones de enzima por proporción fueron las siguientes 41.3 µg/mL (1:0.5), 55.0 µg/mL, (1:1), 82.5 µg/mL (1:2) y 137.5 µg/mL (1:4)..... 64

Figura 30. Espectros de emisión de fluorescencia de AF546-SacB en presencia de diferentes proporciones de AF647-SacB (1:0.5, 1:1, 1:2 y 1:4). La longitud de onda de excitación fue de 546 nm, El tiempo de integración se mantuvo constante y fue de 20 µs..... 64

Figura 31. Acoplamiento molecular proteína-proteína. Interpretación “equilibrada”. Modelo del **grupo 0**. La cadena A se encuentra en color blanco y la cadena B en color negro. Los SEUF se encuentran indicados por el color correspondiente A) Presenta el modelo estructural de la interacción del grupo 0 de 167 miembros. B) Acercamiento a la zona de interacción. C) Tabla de contribuciones energéticas por cada par de aminoácidos que interactúa en el modelo. Los datos se obtuvieron por medio de MOE..... 67

Figura 32. Acoplamiento molecular proteína-proteína. Interpretación “equilibrada”. Modelo del **grupo 1**. La cadena A se encuentra en color blanco y la cadena B en color negro. Los SEUF se encuentran indicados por el color correspondiente A) Presenta el modelo estructural de la interacción del grupo 1 de 112 miembros. B)



Acercamiento a la zona de interacción. C) Tabla de contribuciones energéticas por cada par de aminoácidos que interactúa en el modelo. Los datos se obtuvieron por medio de MOE..... 68

Figura 33. Acoplamiento molecular proteína-proteína. Interpretación “equilibrada”. Modelo del **grupo 2**. La cadena A se encuentra en color blanco y la cadena B en color negro. Los SEUF se encuentran indicados por el color correspondiente y los aminoácidos que conforman el sitio catalítico se encuentran en color amarillo A) Presenta el modelo estructural de la interacción del grupo 2 de 88 miembros. B) Acercamiento a la zona de interacción. C) Tabla de contribuciones energéticas por cada par de aminoácidos que interactúa en el modelo. Los datos se obtuvieron por medio de MOE..... 69

Figura 34. Acoplamiento molecular proteína-proteína. Interpretación por interacciones hidrofóbicas. Modelo del **grupo 0**. La cadena A se encuentra en color blanco y la cadena B en color negro. Los SEUF se encuentran indicados por el color correspondiente. A) Presenta el modelo estructural de la interacción del grupo 0 de 254 miembros. B) Acercamiento a la zona de interacción. C) Tabla de contribuciones energéticas por cada par de aminoácidos que interactúa en el modelo. Los datos se obtuvieron por medio de MOE..... 70

Figura 35. S164A. A) Cristal de variante S164A PDB:6PWQ B) Se muestra sombreado un primer plano de las interacciones de empaque del cristal. La cadena A (verde) y B (azul) con residuos que interactúan se muestran como palos. Los enlaces de hidrógeno se muestran como líneas discontinuas negras. El ion sulfato está en barras amarillas y las moléculas de agua están en esferas rojas..... 70

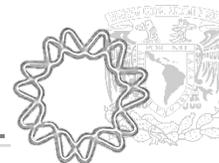
Figura 36. A) Cristal de variante S164A (PDB:6PWQ). Se presenta en azul la cadena A y en blanco la cadena B de SacB. Los aminoácidos en amarillo forman parte de la IPP, como D117, G184 y Y237. B) Cristal de SacB con cadena de oligosacárido de 6 fructosas (PDB:6VHQ). Se muestran los enlaces de hidrógeno entre Y237, D117 y G184 con el oligosacárido en cadena A y B de la unidad asimétrica..... 71

Figura 37. Esquema de la propuesta del mecanismo de elongación de la levana de alto peso molecular (A) y de bajo peso molecular (B)..... 74



Índice de tablas

Tabla 1. Efecto de las diferentes condiciones de reacción en la especificidad de SacB.....	21
Tabla 2. Condiciones de PCR inversa modificado.....	38
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para mutagénesis dirigida al sitio.....	39
Tabla 4. Condiciones de PCR para mutagénesis sitio-dirigida.....	39
Tabla 5. Actividad específica de las LS construidas en el proyecto.....	49
Tabla 6. Energías de unión entre los aminoácidos del sitio SEUF-2 de SacB y la fructosa, obtenidas en MOE a partir del cristal 6VHQ.....	54
Tabla 7. Resultados de acoplamiento proteína-proteína en ClusPro.....	64
Tabla 8. Mutantes obtenidas a partir de SacB y su efecto en la síntesis de levana.....	70
Tabla A. Predicción de la estabilidad de las posibles mutantes de SacB en el SEUF-1.....	80
Tabla B. Predicción de la estabilidad de las posibles mutantes de SacB en el SEUF-2.....	81
Tabla C. Predicción de la estabilidad de las posibles mutantes de SacB en el SEUF-3.....	82



1. Resumen

La levana es un polímero de interés biotecnológico debido a que sus características bioquímicas y fisicoquímicas le confieren potencial para una gran variedad de aplicaciones. La levansacarasa producida por *Bacillus subtilis* 168 (*Bs*-SacB) tiene la capacidad de producir levana de diferentes pesos moleculares en función de las condiciones en las que se lleve a cabo la reacción. Del mismo modo, derivado de un análisis estructural de la enzima, se ha observado también que modificaciones en la superficie pueden jugar un papel importante en la distribución del peso molecular de la levana que produce. En este trabajo se evaluó, primeramente, si existe un efecto en el peso molecular de la levana que sintetiza causado por la etiqueta de polihistidinas utilizada para la purificación de esta enzima. Al eliminar la etiqueta se encontró un efecto considerable a bajas concentraciones de enzima (0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ya que a esta concentración se presenta una distribución bimodal del peso molecular de levana, mientras que la enzima con la etiqueta, sintetiza exclusivamente levana de alto peso molecular. Otras modificaciones realizadas, fueron mutaciones sencillas en aminoácidos que se encuentran en los diferentes subsitios externos de unión a fructosa (SEUF-1 a SEUF-3), descubiertos en la superficie de la enzima mediante análisis computacionales con las estructuras cristalinas 1OYG y 6PWQ. Se encontró que las variantes E245A y K148A, que forman parte de SEUF-1 y SEUF-2 respectivamente, sintetizan preferencialmente levana de alto peso molecular. Por otro lado, la mutante del SEUF-3, D83A, presentó una pérdida de actividad, probablemente por un cambio estructural que desestabilizó al sitio activo. En estudios recientes se demostró que al evitar o disminuir las interacciones entre moléculas de enzima durante la síntesis, ya sea empleando bajas concentraciones de *Bs*-SacB, o inmovilizándola por enlace covalente a un soporte, se produce exclusivamente levana de alto peso molecular. Para evaluar si dichas interacciones podrían estar involucradas en el mecanismo de síntesis de levanas de bajo peso molecular, su existencia se determinó mediante la transferencia de resonancia de Förster. En este trabajo se presenta la primera evidencia de interacciones proteína-proteína y su probable relación con el mecanismo de síntesis de levana de bajo peso molecular.

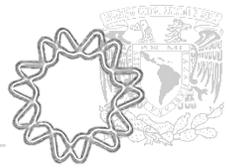


2. Introducción

La levansacarasa (EC2.4.1.10), que es codificada en *Bacillus subtilis* por el gen *sacB*, es una enzima que pertenece a la familia 68 de las glicosil hidrolasas (GH68). En presencia de sacarosa, la levansacarasa forma un complejo fructosilo-enzima, que posteriormente da lugar a dos tipos de reacciones: *transfructosilación*, cuando el residuo de fructosilo se transfiere a otra molécula de sacarosa, a la cadena de levana en crecimiento o a otra molécula aceptora agregada al medio de reacción, e *hidrólisis*, cuando el residuo fructosilo se transfiere al agua. La levana es un polímero de fructosa compuesto por enlaces β 2–6 en la cadena principal con ramificación en enlaces β 2–1. Dependiendo del peso molecular, la levana cubre una amplia gama de aplicaciones, tales como transportador y liberador de fármacos (DDS), agente formador de bio-películas o nanopartículas, agente viscosante, entre otras. Dada su capacidad antiinflamatoria, su uso potencial como prebiótico, antitumoral y antioxidante, es muy prometedor para aplicaciones en las industrias alimentaria, médica y farmacéutica¹.

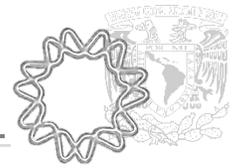
Durante años de investigación, se ha demostrado que el peso molecular que alcanza el polímero durante la síntesis enzimática depende de la estructura de la enzima, a su vez asociada al microorganismo que la expresa^{2,3,4,5,6,7}. Se ha demostrado también, que el peso molecular del polímero depende de las condiciones de reacción tales como la temperatura⁸, la fuerza iónica⁹, la presencia de disolventes¹⁰, el estado de la enzima –soluble o inmovilizada-¹¹, la concentración de enzima y de sustrato⁸.

Recientemente se demostró que el mecanismo de reacción mediante el cual SacB sintetiza polímeros de bajo peso molecular es *no procesivo*, al observar en el medio de reacción la presencia de intermediarios de peso molecular creciente, resultado de un proceso intermitente de adición de moléculas de fructosa a las cadenas de polímero en la síntesis¹². Por el contrario, para el caso de la levana de alto peso molecular, existe aún la hipótesis de que la síntesis se lleva a cabo mediante un mecanismo *procesivo*, mediante el cual la cadena de polímero sería alargada de forma continua, probablemente asociada a la enzima, liberándose al medio al final de la síntesis cuando se alcanza el máximo tamaño. Esto se concluye al no haberse observado hasta ahora intermediarios de la síntesis en el medio de reacción. Para tratar de comprender de forma integral los mecanismos de elongación del polímero, se han propuesto hipótesis basadas en interacciones proteína-proteína o proteína-levana. Sin embargo, en la búsqueda de dichas interacciones, se demostró a través de experimentos de calorimetría y cristalografía, que la enzima



permanece como un monómero en un amplio intervalo de concentraciones de proteína y que existe una afinidad débil (M^{-1}) entre la levana sintetizada y la enzima⁸.

Así, existe interés por dilucidar el mecanismo de polimerización de levana, no solo para comprender la dinámica del proceso de síntesis, sino eventualmente, para poder controlarlo, asegurando así una producción eficiente de levana de un peso molecular controlado que, de acuerdo con sus propiedades fisiológicas, fisicoquímicas y reológicas, resulte de interés para aplicaciones industriales o farmacológicas específicas.



3. Generalidades

3.1 Levanas y levansacarosas

La levana, junto con la inulina, forma parte de las llamadas fructanas, homopolímeros conformados por unidades de fructosa que tienen reconocimiento por su amplia gama de aplicaciones. Su estructura consiste en unidades de fructosa unidas mediante enlaces glicosídicos tipo β -2,6 y puede presentar ramificaciones mediante enlaces β -2,1 (figura 1). Este polímero es sintetizado por las enzimas levansacarosas (LS), fructosiltransferasas que pertenecen a la familia 68 de las glicosil hidrolasas. Hasta ahora se ha predicho que la conformación de la levana es helicoidal y se compacta en nanopartículas¹³. Dentro de las fuentes de este interesante polímero, se encuentran las plantas y los microorganismos. La levana sintetizada por LS provenientes de diferentes organismos posee un grado de polimerización particular y provee distintas funciones, como formador de biopelículas, como protector contra la desecación o como reservorio de nutrientes extracelulares. Actualmente, se explora su gran potencial en aplicaciones biotecnológicas debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad, además de ofrecer un conjunto de propiedades fisicoquímicas de interés (baja viscosidad, alta solubilidad acuosa y adherencia). Cabe mencionar que, de acuerdo al peso molecular de la levana, sus características se modifican y determinan el tipo de aplicación al que pueda dirigirse. Por ejemplo, recientemente se ha encontrado que la levana de alto peso molecular presenta propiedades antitumorales y anti-hipercolesterolémicas, mientras que la levana de bajo peso molecular tiene potencial como transportador/liberador de fármacos, así como propiedades prebióticas y antioxidantes¹. Se ha encontrado que la levana es capaz de auto-ensamblarse con la finalidad de reducir los contactos hidrofóbicos en el agua, lo que da lugar a la formación de nanopartículas, capacidad que se le atribuye a su naturaleza anfifílica. Esta característica particular le confiere su potencial aplicación como agente transportador y liberador de fármacos¹⁴.

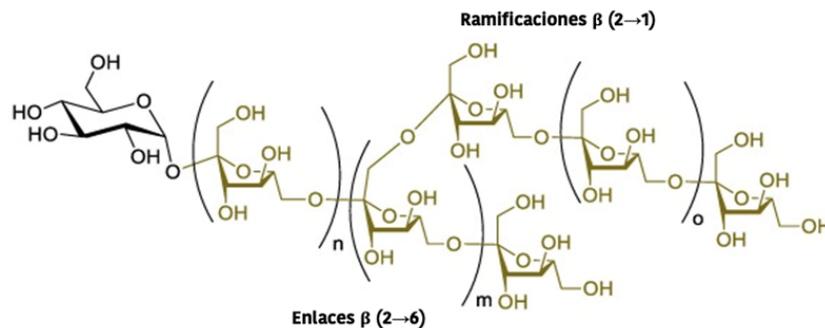
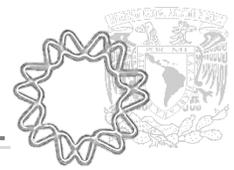


Figura 1. Estructura química de la levana¹⁵.



3.2 Levansacarasa *Bs*-SacB

Dentro de los productores más estudiados de las LS, se encuentra una gran variedad de microorganismos, destacando bacterias Gram negativas como *Gluconobacter*, *Zymomonas* y *Erwinia*, y Gram positivas como *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Leuconostoc*, entre otras. La LS producida por *Bacillus subtilis* (*Bs*-SacB) con 52 kDa y 473 aminoácidos en su estructura, posee propiedades particulares tales como la producción de un polímero con una amplia distribución de pesos moleculares dependiendo de las condiciones de reacción. Es importante resaltar que, cuando las reacciones de síntesis se llevan a cabo con 0.3 M de sacarosa, a 37°C y pH 6.0, *Bs*-SacB sintetiza tanto levanas de bajo (8.3 kDa), como de alto peso molecular (3500 kDa), lo que se describe como levana con una “distribución bimodal de pesos moleculares”^{3,4}. La síntesis de levana se lleva a cabo mediante un mecanismo de tipo ping-pong, que involucra la participación de un intermediario fructosilo-enzima obtenido a partir de la sacarosa (figura 2)¹⁶. En este mecanismo participan directamente tres aminoácidos: D86 como nucleófilo, D247 como estabilizador de dos estados de transición y E342 como catalizador ácido-base⁷. Al formarse el complejo fructosilo-enzima se pueden presentar dos tipos de reacción: *transfructosilación* e *hidrólisis*. En la reacción de *transfructosilación*, el residuo de fructosilo se transfiere a una molécula aceptora en el medio de reacción. La reacción de *hidrólisis* ocurre cuando el residuo de fructosilo se transfiere al agua, produciéndose fructosa y glucosa¹⁷.

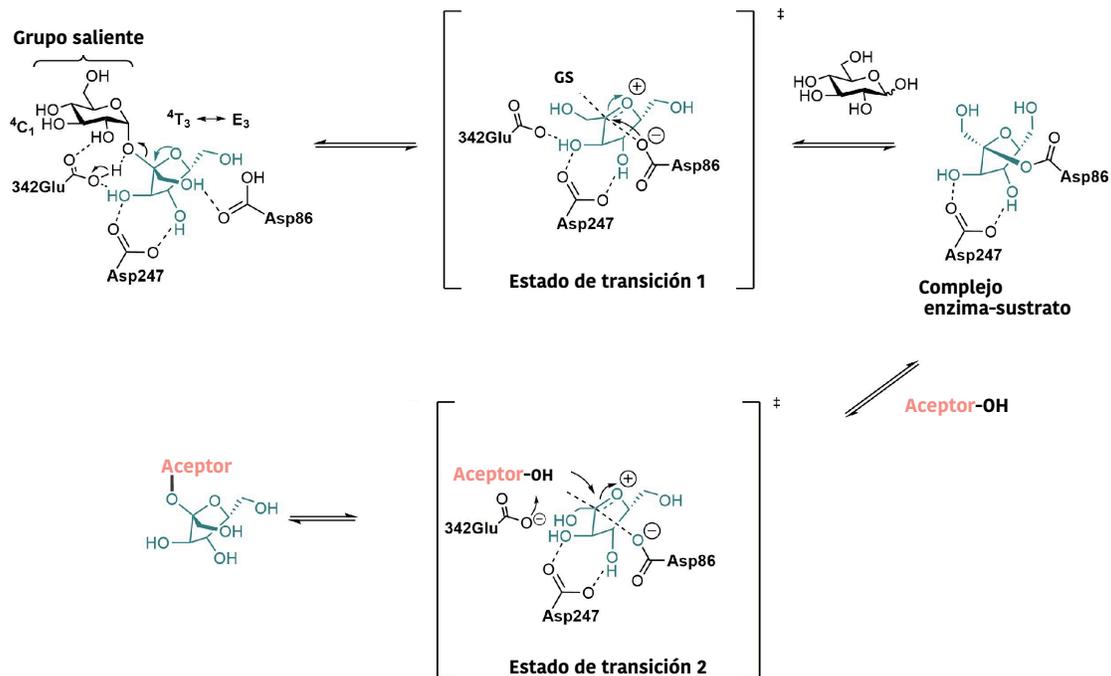


Figura 2. Mecanismo de reacción de *Bs*-SacB⁷.



El mecanismo de síntesis de levana de bajo peso molecular ha sido elucidado con detalle¹², definido en tres etapas: inicial, tardía y de agotamiento de la sacarosa (figura 3). En la etapa inicial, se lleva a cabo la reacción de *hidrólisis* de la sacarosa, formando glucosa y fructosa. Además, en esta primera etapa también se lleva a cabo la reacción de *transferencia*, donde la sacarosa es aceptor del grupo fructosilo. Es decir, cuando la sacarosa dona su grupo fructosilo, éste se transfiere a otra molécula de sacarosa formando un trisacárido con 3 posibles estructuras dependiendo del carbono de la sacarosa al que se transfiere; 1-questosa (carbono 1 de la fructosa), 6-questosa (carbono 6 de la fructosa) o neoquestosa (carbono 6 de la glucosa). En la etapa tardía, las moléculas producidas anteriormente funcionan como aceptoras y dan lugar a series de fructooligosacáridos (FOS) intermediarios. En esta etapa, también se produce blastosa, levanbiosa e inulobiosa, a partir de la glucosa y la fructosa producidas inicialmente por la *hidrólisis* de sacarosa. Finalmente, en la etapa de agotamiento de la sacarosa, se identifican series heterogéneas de levana con grados de polimerización que van de 2 a 50 unidades de fructosa. La presencia de estos productos de reacción mostraron que la síntesis de levana de bajo peso molecular por *Bs-SacB* se realiza a través de un mecanismo de elongación *no procesivo* de las cadenas de levana¹².

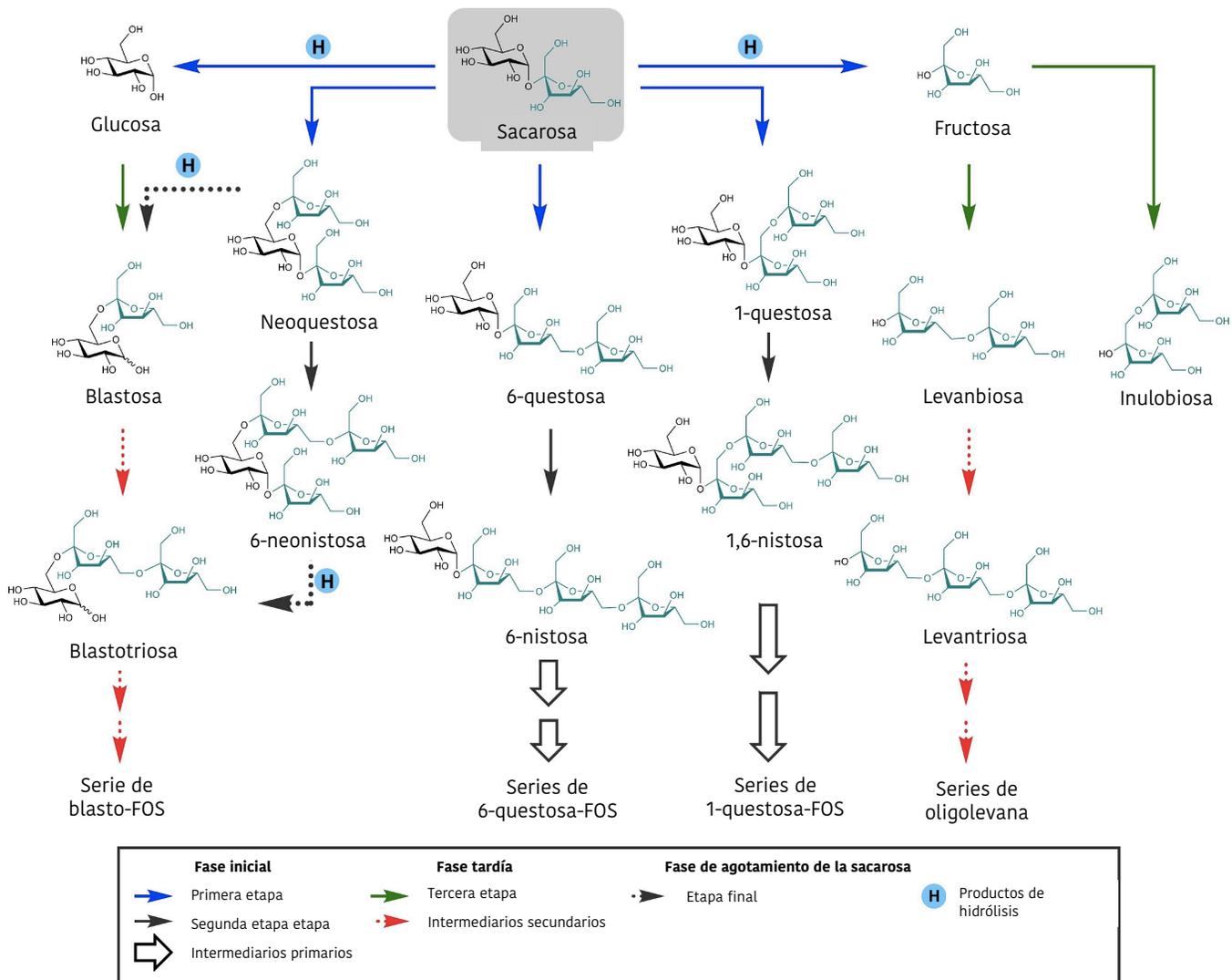
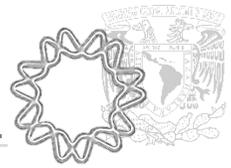


Figura 3. Síntesis de intermediarios de la reacción de producción de levana de bajo peso molecular, a partir de sacarosa por *Bs-SacB*²⁵.

3.3 Efecto de las condiciones de reacción en el peso molecular de la levana

Un tema importante abordado por diversos grupos de investigación, se refiere a las condiciones de reacción que definen la especificidad de reacción en términos de *hidrólisis/transferencia*. Esta especificidad de reacción está en función de la afinidad por las moléculasceptoras y se refiere a la capacidad de la enzima para llevar a cabo la reacción de *hidrólisis* o de *transferencia*. Las enzimas que tienen mayor afinidad por moléculas de agua son mayormente *hidrolíticas*, y aquellas que tienen alta afinidad por los otros aceptores poseen mayor especificidad por la reacción de *transferencia*. Así, se ha estudiado el efecto de múltiples variables y condiciones en las que se lleva a cabo la reacción,



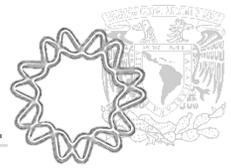
caracterizándose así la actividad de *hidrolasa* y la de *transferasa* de SacB. Al estudiar estas condiciones, se ha concluido que las diferentes actividades de la LS pueden ser moduladas por factores tales como la concentración de sacarosa, la temperatura, la fuerza iónica, el medio de reacción (acuoso o en solvente orgánico), así como el estado de la enzima (inmovilizada o libre en solución) y la concentración de la misma. En este escenario, es importante señalar que estos parámetros no solo influyen en la tasa de *hidrólisis/transferencia*, sino también la especificidad de SacB determinada por la distribución del peso molecular de levana (alto peso molecular, bajo peso molecular, distribución bimodal). A continuación, se presenta en la tabla 1 los efectos de las diferentes condiciones de reacción que modulan la tasa H/T y el peso molecular de la levana.

Tabla 1. Efecto de las diferentes condiciones de reacción en la especificidad de SacB

Condición de reacción	Efecto en H/T	Efecto en peso molecular de levana	Referencias
Concentración de sustrato Temperatura	A altas concentraciones de sustrato (600 g/L) así como a temperaturas bajas (4°C), se favorece la reacción de <i>transferencia</i> .	A 45°C se favorece la síntesis de levana de alto peso molecular.	8 18
Fuerza iónica	-	Una alta concentración de sal (0.5 M NaCl) da como resultado la síntesis exclusivamente de levana de bajo peso molecular.	9 19
Disolventes orgánicos	En 2-metil-2-butanol, la reacción de <i>transfructosilación</i> comprende el 80% de la actividad total de SacB mientras que, en 1,4 dioxano, acetona y acetonitrilo la actividad hidrolítica es completamente eliminada.	La presencia de disolventes como etanol, polietilenglicol o 2 metil 2-butanol favorece la síntesis de levana de alto peso molecular.	10 20
Inmovilización enzimática	La inmovilización mejora la actividad de <i>transfructosilación</i> .	Se favorece la síntesis de levana de alto peso molecular al inmovilizar la enzima en perlas de agarosa por medio de la etiqueta de histidinas.	11
Concentración de enzima	La <i>transferencia</i> se favorece al disminuir la concentración de enzima.	A concentraciones altas de enzima (55.0 µg/mL) se favorece la síntesis de levana de bajo peso molecular, a diferencia de concentraciones bajas de enzima (0.55 µg/mL) que favorece la producción de levana de alto peso molecular.	8

3.3.1 Efecto de la concentración de enzima en el medio de reacción

Entre las condiciones de reacción estudiadas, que determinan la especificidad de *Bs-SacB*, destaca la concentración de enzima. Cuando se emplean bajas concentraciones de enzima (0.55 µg/mL equivalentes a 0.1 U/mL) se favorece la síntesis de levana de alto peso molecular, mientras que en reacciones con



concentraciones elevadas de enzima (55.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ equivalentes a 10.0 U/mL) se obtiene únicamente levana de bajo peso molecular (figura 4). Esto se demostró al realizar un experimento con *Bs*-SacB en el que se empleó una doble mutante inactiva E342A/D86A para incrementar la concentración de enzima sin alterar la actividad enzimática total, obteniéndose levana de bajo peso molecular, tal como sucede a altas concentraciones de enzima activa. También se validó que el efecto fuera específico de la concentración de *Bs*-SacB y no de un problema de difusión, complementando una baja concentración de *Bs*-SacB con otras proteínas como albúmina y lisozima, sin obtener cambios en la distribución del peso molecular de levana con respecto a la que se observa a bajas concentraciones de enzima⁸ (figura 5).

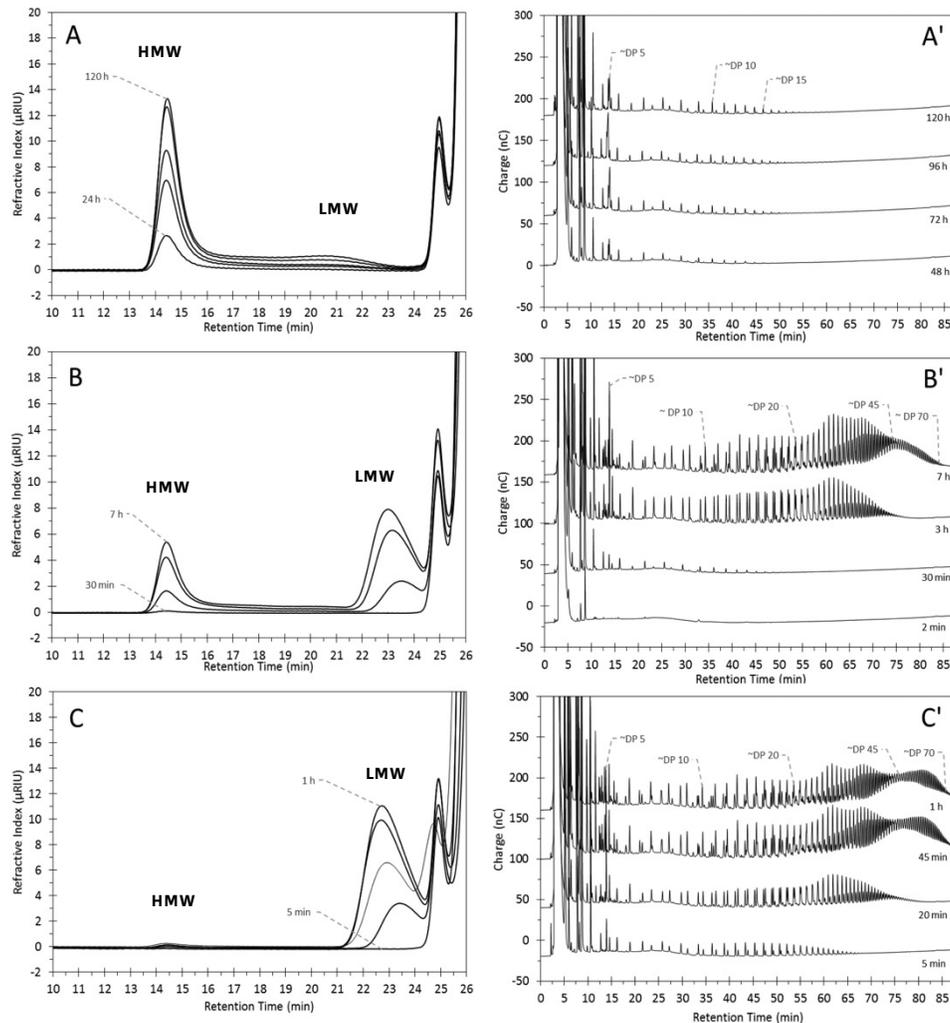


Figura 4. Efecto de la concentración de enzima en la distribución de peso molecular de levana. (A-C) Perfil de polímero analizado por HPSEC. (A'-C') Perfil de fructooligosacáridos analizado por HPAEC-PAD. A-A') 0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ B-B') 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y C-C') 55.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SacB⁸. HMW: levana de alto peso molecular, LMW: levana de bajo peso molecular.

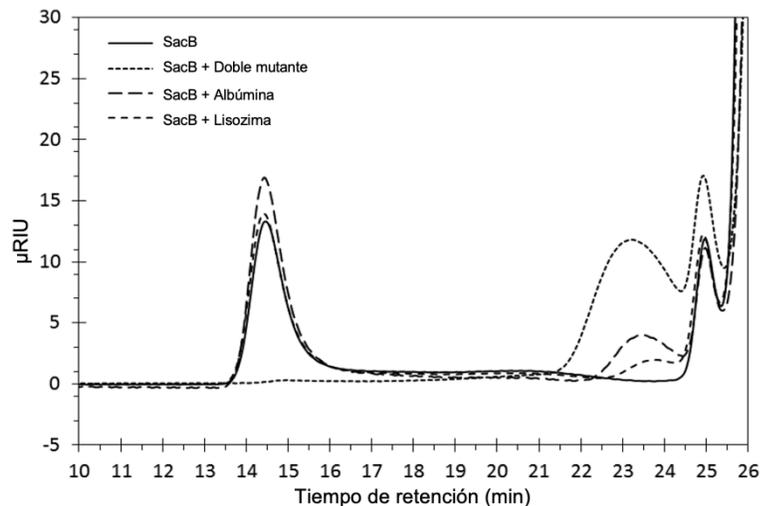
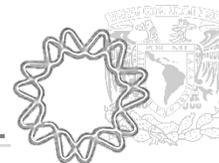
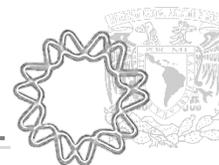


Figura 5. Comparación de los perfiles finales de levana obtenidos por SacB, complementados con proteínas distintas. Las reacciones de SacB emplean 0.1 U/mL de enzima activa complementadas con lisozima, albúmina o la doble mutante inactiva hasta alcanzar 55 µg/mL de proteína total⁸.

3.3.2 Inmovilización de la enzima

En bacterias lácticas como *Streptococcus mutans*, la LS se encuentra parcialmente unida a la pared celular y parcialmente libre en el medio de cultivo. Se planteó que el hecho de que la enzima muestre diferentes especificidades catalíticas podría estar también relacionado con las necesidades del microorganismo de usar la levana, ya sea como reservorio de energía o como protección al estrés generado por falta de hidratación y formación de biopelículas. En un estudio reportado en 1993 se analizó el comportamiento catalítico de la enzima tanto en solución como asociada a una matriz de hidroxiapatita²¹. Se observó que, debido a la inmovilización, la actividad *transferasa* se favorecía y el polímero sintetizado resultaba de alto peso molecular.

En 2020, se reportó el efecto que tiene la inmovilización de *Bs-SacB*. Para estos experimentos la enzima se inmovilizó en un soporte de agarosa que se encuentra unido a un quelante, el ácido nitriloacético. Éste a su vez retiene a través de enlaces covalentes dativos (de coordinación) iones de Ni²⁺ con los cuales la etiqueta de histidinas asociada con la enzima interactúa fuertemente. Al inmovilizar 1 U/mL de *Bs-SacB*, ésta sintetizó levana de alto peso molecular¹¹. ¿Por qué la inmovilización modificaría la especificidad de la enzima? Esta pregunta aún no tiene una explicación clara y contundente. Se ha supuesto²¹, por ejemplo, un efecto microambiental derivado de la restricción al acceso de moléculas de agua al sitio catalítico o una limitación a la difusión de las cadenas de levana en crecimiento.



3.3.3 Modificación química de levansacarosas

En 2018, para fines de ingeniería enzimática, en el grupo de investigación del profesor Jürgen Seibel en Würzburg, se realizó una modificación química selectiva de los residuos de tirosina expuestos de la LS de *Bacillus megaterium* (*Bm*-LS). Esta modificación se realizó con la intención de evitar los posibles eventos de disociación entre la enzima y los oligosacáridos durante el alargamiento del polímero. La modificación se realizó a través de la adición covalente de una cadena lateral química flexible (azido-1-desoxi- β -D-glucopiranosido) mediante una reacción de tipo Alder-*eno* (adición de un enófilo a un alqueno por transposición alílica). La *Bm*-LS no puede llevar a cabo la síntesis de levana de alto peso molecular, pero con la adición de la fracción glucopiranosido, la enzima pudo sintetizar levana de alto peso molecular. En esta investigación, demostraron que la modificación de residuos de tirosina estratégicamente situados puede cambiar la especificidad del producto de *Bm*-LS y así crear nuevos productos de polímeros al tiempo que aumenta la relación de *transferencial/hidrólisis*²⁷.

3.4 Estudios de la relación *estructura-función* en levansacarosas

Los estudios de estructura/función de SacB iniciaron cuando se publicó la primera estructura cristalográfica de una LS perteneciente a *Bacillus subtilis* (PDB: 1OYG). A partir del cristal de *Bs*-SacB en complejo con sacarosa (PDB: 1PT2) se determinaron los aminoácidos que forman parte de los subsitios -1 y +1 (sitios de unión a azúcares). El subsitio -1 está conformado por aminoácidos que participan en la unión a la unidad de fructosilo de la sacarosa y el subsitio +1 está integrado por los aminoácidos que interactúan con el grupo saliente, la glucosa¹⁷. Se han explorado los sitios subsecuentes que participan en la unión a oligosacáridos. El subsitio +2 se propuso a partir de la estructura cristalográfica de SacB en complejo con rafinosa (PDB: 3BYN)²². Y el subsitio +3 y +4 fueron elucidados recientemente mediante el cristal de *Bs*-SacB en complejo con oligosacáridos (PDB: 6VHQ)²³.

3.4.1 Estructura cristalográfica de las LS

Estructuralmente, las LS comparten un plegamiento que consiste en una β -propela de 5 hojas que adopta una topología en “W” de 4 hebras β -antiparalelas, las cuales encierran la tríada catalítica formada por dos residuos de ácido aspártico y un ácido glutámico. La topología de la β -propela forma un bolsillo central cargado negativamente, donde se unen la sacarosa y otros oligosacáridos pequeños.



Actualmente se cuenta con la estructura cristalina de las LS de *Bacillus subtilis* (*Bs*-SacB, PDB:1OYG y PDB:1PT2), *Bacillus megaterium* (*Bm*-LS, PDB:3OM2), *Erwinia amylovora* (*Ea*-LS, PDB:4D47) y *Gluconacetobacter diazotrophicus* (*Gd*-LS, PDB:1W18), las cuales han sido la base para los estudios de estructura/función sobre las enzimas de la familia GH68. Estas LS presentan un perfil de producto diferente: *Bs*-SacB (figura 6) produce levana de bajo y de alto peso molecular, *Bm*-LS produce FOS con un peso molecular promedio de 1.6 kDa², *Ea*-LS produce principalmente FOS de 2 y 3 unidades de fructosa y puede sintetizar levana de hasta 29700 kDa (a >500 mM de sacarosa)²⁴ y *Gd*-LS produce casi exclusivamente 1-kestosa y 1-nistosa⁵. Estas cuatro estructuras cristalográficas de las LS se seleccionaron para llevar a cabo una comparación detallada de sus bolsillos de unión central donde se observó que la arquitectura del sitio de unión a la sacarosa se conserva, mientras que los bucles que lo rodean son variables. Dicha variedad estructural se atribuye a bolsas centrales que exponen diferentes áreas y volúmenes superficiales. Sin embargo, se encontró que no existe una relación entre el área superficial y/o el volumen de los bolsillos de unión (binding pocket) y el perfil de producto sintetizado por cada enzima aun cuando, por ejemplo, la LS *Bm*-SacB tiene el 73% de identidad de secuencia respecto a *Bs*-SacB²⁵.

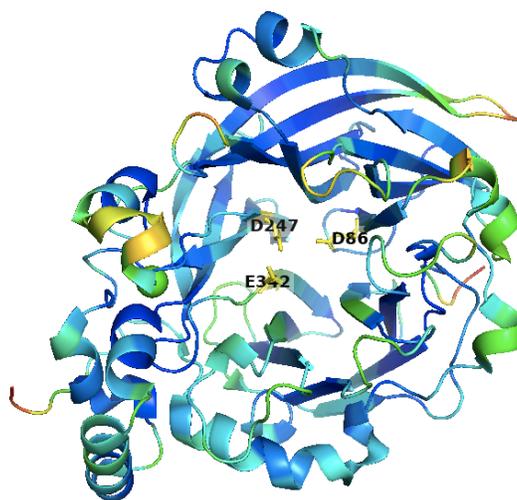
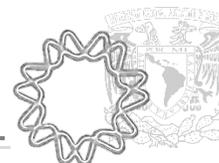


Figura 6. Estructura cristalográfica de SacB expresada por *Bacillus subtilis* (PDB:1OYG).

3.4.2 Unión a otros ligandos

En un estudio realizado en 2008, Beine et al., reportaron análogos a sacarosa como sustratos alternativos para *Bs*-SacB. En efecto, análogos como Man-Fru, Gal-Fru, Xil-Fru y Fuc-Fru, pueden ser usados como sustratos por la LS de *B. subtilis*; influyendo además en la longitud de los productos y la eficiencia de la



reacción enzimática. Como explicación a este efecto, Meng y Fütterer¹⁷ reportaron que cuando la LS actúa sobre la rafinosa, el residuo galactosilo de la rafinosa, produce enlaces de hidrógeno entre el hidroxilo en posición 6 y los residuos N242 y T237, mientras que los hidroxilos en posición 2, 3 y 4 apuntan al disolvente. En el sustrato Gal-Fru, el residuo galactosilo interactúa mediante el hidroxilo en posición 6 de la misma manera que se observa para el galactosilo de la rafinosa. De ahí se plantea que N242 ubicado en el subsitio +2 puede contribuir a la unión con el aceptor y a la coordinación de la cadena de fructanos en crecimiento. Se especula que el polímero de levana puede formarse como consecuencia de esta interacción. Por el contrario, el residuo xilosilo de Xil-Fru al no tener un grupo 6 hidroxilo, no puede coordinarse como un aceptor de la misma manera que Gal-Fru o sacarosa, lo que puede explicar la aparición exclusivamente de xilofructooligosacáridos²⁶.

3.4.3 Mutagénesis sitio dirigida en elementos estructurales de la enzima

Con el objetivo de dilucidar el mecanismo de reacción de SacB, así como los elementos estructurales que definen la actividad *hidrolasa* y la *transferasa*, varios grupos de investigación han realizado mutagénesis sitio-dirigida. Se han realizado sustituciones de aminoácidos que provocan cambios en la carga y en la polaridad de sitios específicos. Con base en los resultados reportados hasta la fecha, se propone que la polimerización para obtener levana de alto peso molecular requiere de un mecanismo de tipo *procesivo*, que obliga a una alta afinidad de la enzima por la cadena polimérica en crecimiento en los subsitios de unión a carbohidratos: -1, +1, +2 y subsecuentes. La preferencia por la síntesis de levana de alto o bajo peso molecular que presentan las variantes que diseñaron y probaron, podría resultar de la reducción de la afinidad del polímero por los subsitios, ya que las mutantes sintetizan exclusivamente oligosacáridos²⁸.

Strube et al., descubrieron que la mutación de un aminoácido de la fructosiltransferasa de *Bm*-SacB (N252A) elimina la síntesis de polisacáridos. Esto proporciona información importante ya que este aminoácido no se encuentra en el sitio activo²⁹. El análisis de la estructura cristalina de la LS de *Bacillus subtilis* en complejo con sacarosa (PDB: 1PT2) y rafinosa (PDB: 3BYN) proporcionó información sobre el papel funcional de N242 (correspondiente a N252 en *Bacillus megaterium*). El residuo N242 forma parte del subsitio +2 y puede contribuir a la coordinación de la cadena de fructanos en crecimiento. Sin embargo, hasta este reporte, no había evidencia de la existencia de elementos estructurales en la superficie de la enzima, alejados del sitio activo, que participaran en el proceso de *transfructosilación*.



Como se revisó recientemente⁷, además de las condiciones de reacción antes mencionadas, el peso molecular y las propiedades de los polímeros de fructosa u oligosacáridos, incluida la relación de *hidrólisis/transferencia*, pueden estar asociados a diferentes elementos estructurales de la enzima, incluida la geometría, volumen y composición de aminoácidos del sitio activo así como de los subsitios de unión a carbohidratos antes mencionados. También se han considerado otros factores estructurales, como la presencia de aminoácidos particulares en diferentes capas que conducen a la cadena de levana en crecimiento desde el sitio activo hasta la superficie de la enzima. En este sentido, se ha definido que el sitio de unión a sustrato se divide en tres capas; la primera capa está compuesta por los aminoácidos que interactúan mediante enlaces de hidrógeno con la sacarosa, determinando el sitio de unión a sacarosa. La segunda capa comprende aquellos residuos cercanos a la sacarosa pero que no están involucrados en contactos polares con el sustrato y la tercera capa está compuesta por los aminoácidos que participan en la unión a oligosacáridos²⁵. Así, se construyeron una serie de mutantes de SacB, modificando los aminoácidos que rodean el sitio catalítico³ donde se encontró que la mayoría de las mutantes exploradas se volvieron más hidrolíticas que la enzima silvestre, excepto la mutante S164A. La serina 164 corresponde a un residuo semi-conservado ubicado en el sitio de unión a sacarosa de las GH68. Este aminoácido tiene contacto con el nucleófilo D86 y el hidroxilo en posición 4 del fructosilo a través de enlaces de hidrógeno. Su modificación por alanina presenta una serie de particularidades, entre las que se encuentra el aumento de la *transglicosilación* alrededor de un 15%, la producción monomodal de levana de bajo peso molecular (a una concentración de enzima equivalente a 1.0 U/mL) y una preferente producción de una serie de blasto-oligosacáridos (oligosacáridos de fructosa con una molécula de blastosa en el extremo no reductor). Al analizar el comportamiento de la variante S164A también se encontró un efecto correspondiente a la concentración de enzima en la síntesis de la levana. Anteriormente se reportó que S164A sintetizaba únicamente levana de bajo peso molecular. Sin embargo, en nuestro grupo de investigación se encontró que ese comportamiento se debía a la concentración de enzima ya que la variante S164A tiene una $k_{cat}=6,4 \text{ s}^{-1}$ en contraste con $k_{cat}=164.4 \text{ s}^{-1}$ de SacB WT. En una reacción con 1.0 U/mL de enzima se necesitan 5.5 $\mu\text{g/mL}$ de SacB WT y 141.4 $\mu\text{g/mL}$ de S164A (25 veces más proteína respecto a la enzima silvestre). Cuando se realizó la reacción con *Bs*-SacB WT y S164A con concentraciones de 0.55 $\mu\text{g/mL}$ y 5.5 $\mu\text{g/mL}$, (equivalentes a 0.1 U/mL y 1.0 U/mL de SacB WT respectivamente), se observó la misma especificidad en ambas, lo que comprobó que el comportamiento previamente descrito para la



variante S164A se debió a un artefacto causado por la concentración de enzima empleada en el experimento y no al cambio de serina por alanina en la posición 164¹¹.

3.4.4 Nuevos sitios externos de unión a fructosa identificados en *Bs*-SacB y su variante S164A

Para estudiar el comportamiento de la variante S164A, anteriormente mencionada, se determinó la estructura cristalina de S164A (PDB: 6PWQ) y se realizó un estudio de acoplamiento molecular “ciego” de los cristales 6PWQ y 1OYG con moléculas de glucosa y fructosa (figura 7). Cuando la fructosa se utilizó como ligando, se encontraron interacciones con el subsitio -1 tal como se esperaba (con energías favorables que van de -5 a -6 kcal/mol), pero también se encontraron dos subsitios de interacción adicionales, no reportados hasta esa fecha. Estos sitios externos de unión a fructosa (SEUF), se ubican en la superficie de *Bs*-SacB y su variante S164A, fuera del sitio catalítico y presentan interacciones con energías de unión de -4.7 y -4.8 kcal/mol respectivamente. El SEUF-1 está conformado por los residuos: Y37, Y41, Y271, Q272, E275, S276, N279 y Y282 y el SEUF-2 por los residuos: D118, T119, S120, R141, D145, K148, Q159, T160, Q161 y E162¹¹. En el cristal de *Bs*-SacB en complejo con levanhexosa (PDB: 6VHQ) obtenido recientemente²³, se confirmó la presencia del SEUF-2 observado por el análisis de acoplamiento molecular. Este sitio, denominado OB2 (oligosaccharide binding site 2) demuestra la unión de una molécula de levanhexosa principalmente interactuando con dos de sus unidades fructosilo. Los residuos N115, D145, K148, Q159 y E162 participan estabilizando la molécula de levanhexosa a través de interacciones directas.

Adicionalmente a estos dos SEUF, se encontró un tercer subsitio de interacción en la variante S164A. El SEUF-3 está conformado por los residuos: D83, P113, T431, N432, F435, K439, Q440 y S441. El SEUF-3 parecería exclusivo de S164A, sin embargo, después del análisis de ambas estructuras cristalinas, se concluyó que el cambio en los bucles que presenta S164A respecto a *Bs*-SacB, son resultado de las condiciones en las que se obtuvieron ambos cristales y no consecuencia de la mutación, por lo que se ha considerado también como parte de *Bs*-SacB. Los tres sitios externos se muestran en la figura 6.D.

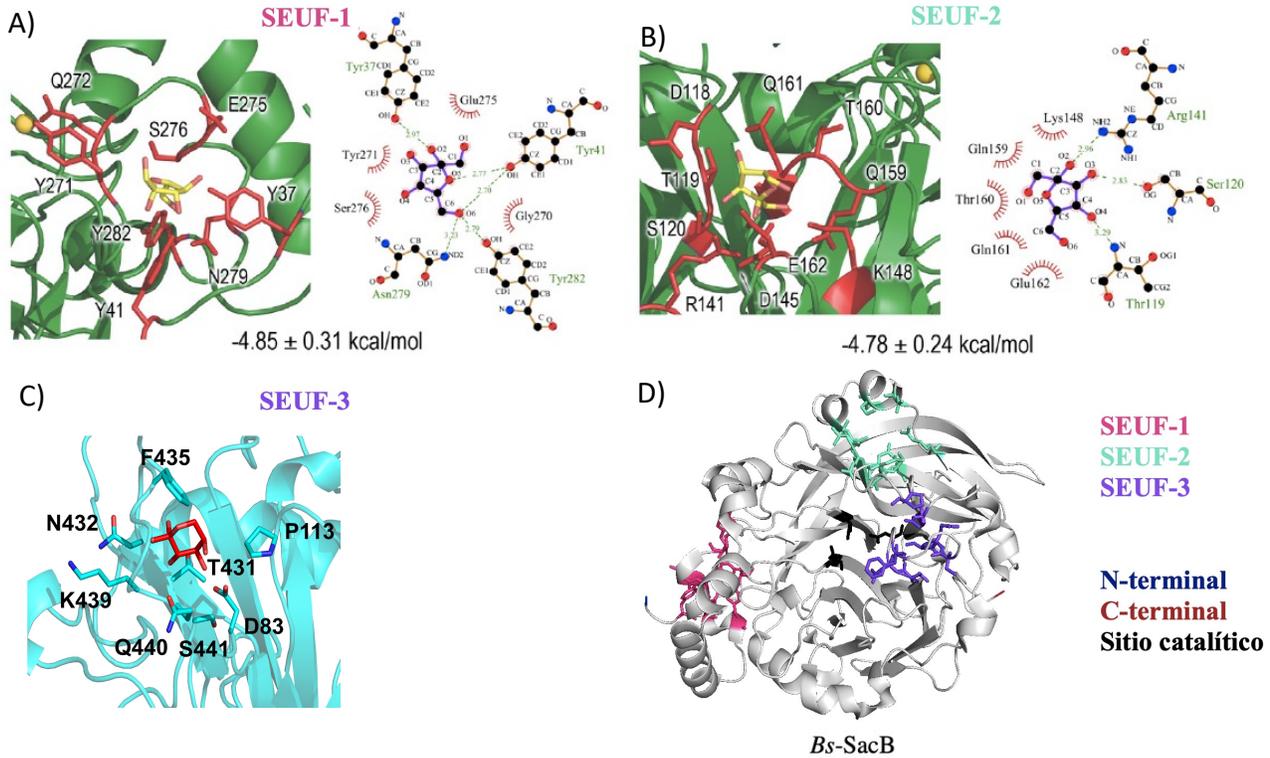
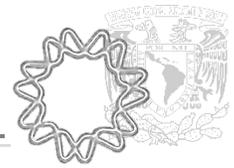
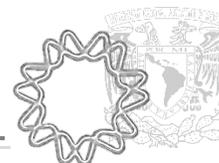


Figura 7. Sitios de unión potenciales de β -fructofuranosa en la superficie de *Bs*-SacB. A-B) Se identificaron dos subsitios en la misma región de SacB WT (PDB: 1OYG) y variante S164A (PDB: 6PWQ) mediante experimentos de acoplamiento molecular entre *Bs*-SacB y S164A con fructosa. C) SEUF-3 identificado en S164A (PDB: 6PWQ)¹¹. D) Estructura cristalográfica de SacB WT (PDB: 1OYG). Cada SEUF está marcado con un color correspondiente, así como el sitio catalítico y el N y C terminal.

3.4.5 Efecto de la fusión de dominios terminales a SacB

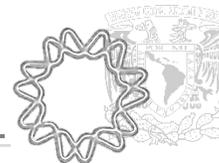
Se ha caracterizado una subfamilia de fructosiltransferasas multidominio (FTF-MD) que han adquirido dominios estructurales de las regiones N y C terminales de las glucansacarasa en *Leuconostoc spp* Gram positivas. Estas FTF-MD incluyen a la inulosacarasa (IslA) de *Leuconostoc citreum* y LS (LevS, LevC y LevL) de *L. mesenteroides*. Aunque estas enzimas no son tan estables como algunas fructosiltransferasas de bacterias Gram negativas, su conversión de sustrato por *hidrólisis* es, en el mayor de los casos, del 25%, lo que los hace productores más eficientes de fructanas en comparación con las fructosiltransferasas de dominio único, como SacB. En este contexto, pensando que la adquisición de dominios dificulta el acceso de agua, se han propuesto diferentes estrategias para reducir la actividad hidrolítica tales como el uso de disolventes orgánicos, la inmovilización de enzimas en soportes hidrofóbicos o el desarrollo de agregados de enzimas entrecruzadas. De manera similar a lo que sucede con las FTF-MD, una estrategia



propuesta en 2012, fue la construcción de cuatro LS quiméricas de SacB, en donde se adicionaron diferentes extensiones a SacB que incluían un dominio de transición (206 aminoácidos que poseen 25% de identidad con alternansacarasa) y el dominio C-terminal completo de IslA, LevC, y DsrP, una glucansacarasa de *L. mesenteroides*. En ese trabajo se encontró que, en algunos casos, la actividad hidrolítica se redujo a menos del 10% de la conversión del sustrato y que todas las construcciones eran tan estables como *Bs*-SacB. Este cambio en la tasa *hidrólisis/transferencia* de la enzima se observó incluso cuando el dominio catalítico de *Bs*-SacB se extendió solo con la región de transición encontrada en las FTF-MD. El análisis cinético específico reveló que este cambio en las construcciones quiméricas de *Bs*-SacB derivó de un aumento de cinco veces en la k_{cat} de la reacción de *transferencia* y no de una reducción de la actividad específica de *hidrólisis*, la cual se mantuvo con el mismo valor de k_{cat} . Cabe mencionar que en dicho trabajo, solo se encontró un aumento de la reacción de *transferencia* respecto a la *hidrólisis*, pero no se estudió el perfil de levana de alto o bajo peso molecular, además de que no se realizó un análisis estructural de la modificación de la superficie de la enzima al agregar las extensiones antes mencionadas³⁰.

3.5 Efecto de la etiqueta de histidinas en la función de algunas enzimas

En muchos proyectos se recurre a la estrategia de la fusión de etiquetas a proteínas, principalmente con el objetivo de facilitar el proceso de purificación. Estas etiquetas pueden tener un efecto en el comportamiento de las enzimas. Algunos grupos de investigación han realizado estudios sobre el impacto particular de la etiqueta de polihistidinas. Por ejemplo, Zang y cols., estudiaron el efecto que tiene la etiqueta His₆ en una celulasa endógena de *Coptotermes formosanus*. Las celulasas con y sin la etiqueta, mostraron actividad hidrolítica sobre sustratos celulósicos. La celulasa “nativa” (nCfEG) fue más activa y estable que la que posee la etiqueta (tCfEG), aunque esta última podía purificarse hasta casi la homogeneidad con un procedimiento simple. Las actividades diferenciales de nCfEG y tCfEG también se evidenciaron por la diferencia en los productos de hidrólisis obtenidos a partir de diferentes sustratos. Por ejemplo, en presencia de celulosa amorfa, el perfil de productos que resulta de la actividad de las enzimas fue diferente, ya que los oligosacáridos que resultaron de la *hidrólisis* con tCfEG contienen una unidad de azúcar menos que los producidos por nCfEG. Al utilizar celulosa cristalina como sustrato, los principales productos hidrolíticos de nCfEG fueron celobiosa, celotriosa y trazas de glucosa, mientras que los de tCfEG fueron celobiosa, celotriosa y trazas de celotetraosa. Por lo que, aunque sutil, se trata de un cambio de especificidad de la celulasa al contener la etiqueta His₆³¹.

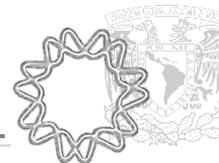


Navjit y cols., recientemente demostraron que la presencia de la etiqueta impacta en la formación de un complejo de ADN con el dominio C-terminal de la subunidad α (α CTD) de la ARN polimerasa de *Helicobacter pylori*, de una manera dependiente de metales³². La α CTD se purificó con la etiqueta His₆ escindible, y se investigó la formación del complejo entre α CTD (regulador sensible al níquel HpNikR) y el ADN utilizando ensayos de cambio de movilidad electroforético. Ellos observaron una interacción entre el α CTD marcado con la etiqueta His₆ (His α CTD) y el complejo HpNikR-DNA. Sin embargo, la interacción no se observó al eliminar la etiqueta His₆. Un análisis posterior reveló que la formación de este complejo entre His α CTD y el ADN no es específica y depende del tipo de iones metálicos presentes. En general, los resultados indicaron que la etiqueta His₆ puede modular la actividad de unión al ADN y sugiere que se debe considerar el impacto de las etiquetas de afinidad metálica al analizar las interacciones biomoleculares *in vitro* de las metaloproteínas.

A raíz de estos hallazgos, ha surgido el cuestionamiento sobre si la modificación que se realiza a la SacB recombinante, casi desde los primeros reportes de su producción en *E.coli* para su purificación (la fusión de una etiqueta His₆), podría afectar la especificidad de la enzima. Este aspecto deberá revisarse de forma prioritaria, ya que como se verá más adelante, un aspecto a revisar en detalle dentro del proyecto son las posibles interacciones proteína-proteína.

3.6 Interacciones proteína-proteína

Las interacciones proteína-proteína (IPP) se pueden encontrar en una amplia gama de procesos biológicos, incluidas las interacciones célula-célula, el control metabólico y el desarrollo celular. Al igual que para el plegamiento y el ensamblaje de proteínas, las IPP consisten en contactos no covalentes entre las cadenas de residuos laterales que inducen una variedad de interacciones y asociaciones entre las proteínas. Sobre la base de sus características estructurales y funcionales, las IPP se pueden clasificar de varias maneras. Así, de acuerdo con quiénes se presente la interacción, pueden clasificarse como homo o hetero-oligoméricas; de acuerdo con su estabilidad, pueden clasificarse como obligadas o no obligadas; si se miden de acuerdo con su persistencia, se trata entonces de IPP transitorias o permanentes. Una IPP puede darse a través de una combinación de estos tres pares específicos. Las interacciones transitorias participan,



por ejemplo, en vías de señalización, mientras que las interacciones permanentes dan lugar a la formación de un complejo proteico estable³³.

El estudio detallado de las IPP ha acelerado el modelado de vías funcionales para ejemplificar los mecanismos moleculares de los procesos celulares. El resultado de dos o más proteínas que interactúan con un objetivo funcional definido se puede establecer de varias maneras. Las IPP pueden:

- a) Modificar las propiedades cinéticas de las enzimas.
- b) Actuar como un mecanismo general para permitir la canalización del sustrato.
- c) Construir un nuevo sitio de unión para pequeñas moléculas efectoras.
- d) Inactivar una proteína.
- e) Cambiar la especificidad de una proteína por su sustrato a través de la interacción con diferentes parejas de unión³⁴.

Actualmente, una de las técnicas más utilizadas para la detección espectroscópica directa y el monitoreo de interacciones entre proteínas en células vivas es la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET por sus siglas en inglés).

3.6.1 Transferencia de resonancia de Förster (FRET)

FRET es un proceso físico dependiente de la distancia de la interacción, mediante el cual la energía se transfiere de forma no radiativa desde un fluoróforo molecular excitado (el donante) a otro fluoróforo (el receptor) a través de un acoplamiento dipolo-dipolo intermolecular de largo alcance (figura 8). Se trata entonces de un efecto que puede ser empleado para investigar una variedad de fenómenos biológicos que producen cambios en la proximidad molecular³⁵.

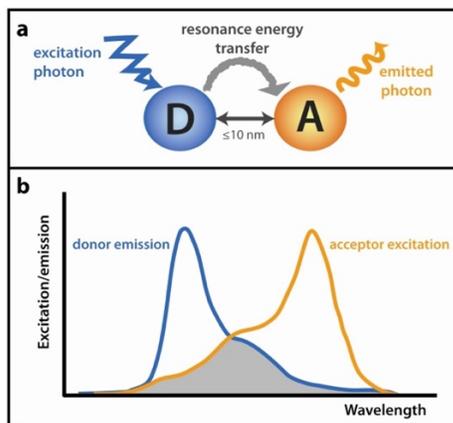


Figura 8. Fundamentos FRET: (a) Representación esquemática de FRET. El donante excitado (D) transfiere energía por un proceso no radiativo al receptor cercano (A), haciendo que emita fluorescencia. La distancia entre fluoróforos no debe exceder los 10 nm; (b) El pico de emisión del donante debe solaparse con el de excitación del receptor. El área gris corresponde a la región de superposición.

La fluorescencia es un fenómeno físico en el que un compuesto químico (fluoróforo) emite luz de una longitud de onda particular muy poco después de ser excitado por la luz de otra longitud más corta. Este proceso se divide en tres etapas. En la etapa 1 un fotón de energía $h\nu_{\text{absorción}}$ (figura 9), es suministrado por una fuente externa, como una lámpara incandescente o un láser, y es absorbido por el fluoróforo creando un estado de singlete electrónico excitado (S_1'). En la etapa 2, el estado excitado existe por un tiempo de 1 a 10 nanosegundos. Durante este tiempo, el fluoróforo sufre cambios conformacionales y también está sujeto a posibles interacciones con su entorno molecular. Estos procesos tienen dos consecuencias importantes. La primera, es que la energía de S_1' se disipa parcialmente, produciendo un estado excitado singlete relajado (S_1) a partir del cual se origina la emisión de fluorescencia. La segunda, es que algunas moléculas inicialmente excitadas por absorción (etapa 1) regresan al estado fundamental (S_0) por emisión de fluorescencia. Por último, en la etapa 3 se emite un fotón de energía $h\nu_{\text{emisión}}$, que devuelve el fluoróforo a su estado fundamental S_0 . Debido a la disipación de energía durante la vida útil del estado excitado, la energía de este fotón es menor y, por lo tanto, de mayor longitud de onda que la del fotón de excitación $h\nu_{\text{absorción}}$.

En el caso de FRET, la energía que se libera de la relajación del donante es absorbida por un aceptor adecuado que se encuentre cerca, lo que conduce a la excitación de uno de sus electrones y la posterior emisión de un fotón por el aceptor en lugar del donante^{36,37}.

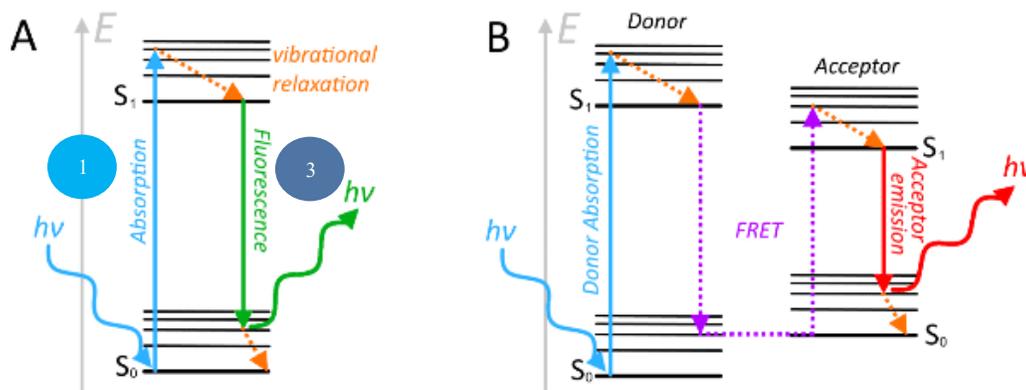
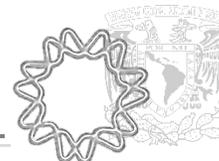


Figura 9. Los principios básicos de fluorescencia y FRET. (A) Diagrama de Jablonski, que explica el efecto de la fluorescencia. (B) Diagrama de Jablonski que explica el efecto de FRET.

FRET se ha utilizado para analizar IPP a nivel de una sola molécula, así como para medir distancias entre etiquetas al caracterizar las estructuras y la dinámica de las macromoléculas, incluidos ARN, ADN, proteínas y sus complejos moleculares³⁸.

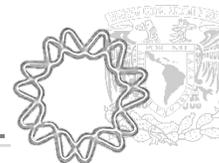
3.6.2 Probables interacciones proteína-proteína involucradas en el proceso de alargamiento de la levana

Con esta serie de observaciones del comportamiento de *Bs*-SacB (cambio en especificidad de producto de acuerdo a su estado inmovilizado y concentración de enzima, principalmente), se han planteado diversas preguntas, entre otras si *Bs*-SacB se asocia, es decir, si existen IPP que explicaran la dependencia que existe entre la concentración de la enzima y el peso molecular de la levana sintetizada. Fue así que en nuestro grupo se estudió la formación de dímeros o multímeros, a partir de la disociación de posibles oligómeros de *Bs*-SacB utilizando calorimetría de titulación isotérmica (ITC por sus siglas en inglés) al diluir soluciones de 3.5 mg/mL de proteína pura. En este ensayo no se observó cambio de entalpía, comportamiento que no concuerda con la tendencia típica de la disociación progresiva de oligómeros, donde el calor resultante de cada inyección se vuelve más bajo a medida que avanza la dilución. Por otro lado, las mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS) de muestras de *Bs*-SacB de 12 mg/mL y 55 µg/mL no mostraron la presencia de agregados, sino solo partículas pequeñas con un diámetro de 5.61 ± 0.43 nm. Estos experimentos no mostraron la presencia de multímeros⁸, lo cual es consistente con la presencia de monómeros de *Bs*-SacB de acuerdo con la estructura cristalográfica resuelta¹⁷. Por lo



anterior se podría concluir que no hay una interacción aparente proteína-proteína de la enzima en solución, pero persiste la duda de si puede haberlas durante la síntesis o si esta interacción pudiera ser transitoria.

Las interacciones proteína-levana se evaluaron también mediante experimentos de ITC⁸, empleando como ligandos: sacarosa, levana de bajo peso molecular y una mezcla de levanas cortas con grados de polimerización promedio de 16 unidades de fructosa. Los cambios asociados en la entalpía debido a la asociación de 1 mol de sacarosa, levana de bajo peso molecular y levana con un DP de 16 fructosas a 1 mol de la doble mutante inactiva de *Bs-SacB* fueron energéticamente bajos con valores de -26.0 -45.7 y -63.2 kJ/mol, respectivamente. Sin embargo, con estos experimentos no se descarta la posibilidad de que existan interacciones durante la síntesis.



4. Hipótesis

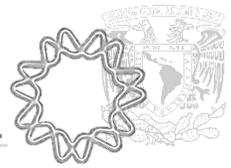
La distribución del peso molecular de levana sintetizada por SacB de *Bacillus subtilis* se ve afectada por interacciones proteína-proteína durante la síntesis de este polímero.

5. Objetivo

- Demostrar que modificaciones en la superficie de la levansacarasa de *B. subtilis* potencialmente involucradas en interacciones proteína-proteína son determinantes en la distribución del peso molecular de la levana sintetizada.

5.1 Objetivos particulares

- Determinar si la especificidad de producción de levana bimodal de *Bs*-SacB se modifica por la presencia de la etiqueta His₆.
- Estudiar por medio de mutagénesis sitio dirigida el efecto que ocasionan modificaciones en la superficie de la levansacarasa en la distribución del peso molecular de levana.
- Demostrar por medio de estudios de fluorescencia la presencia de interacciones proteína-proteína durante la reacción de producción de levana.



6. Métodos

6.1 Eliminación de etiqueta His₆

Para corroborar si la etiqueta His₆ tiene un efecto en la especificidad de *Bs*-SacB, se modificó el vector pET22b-SacB. Se utilizó un protocolo de PCR inversa modificado³⁹. La estrategia utilizada consistió en el diseño y síntesis de un par de oligonucleótidos (5'-ATGATATCGGTACCTCTAGACAATAACTAGCATAAACCCTTG-3' y 5'-TCTAGAGGTACCGATATCATGGATCCGTTTTGTAACTGTT-3') que al unirse al vector pET22b-SacB permiten la linealización del mismo, excluyendo la secuencia que codifica para la etiqueta His₆. Los extremos de los oligonucleótidos fueron diseñados para que existiera sobrelapamiento entre ellos, permitiendo así la recircularización del vector (sin la etiqueta). Adicionalmente se incluyó un sitio de corte XbaI en la secuencia de los oligonucleótidos. De tal forma que el vector pET22b-SacB tiene un único corte por XbaI en la secuencia de los oligonucleótidos. De tal forma que el vector pET22b-SacB tiene un único corte por XbaI y el vector modificado (pET22b-SacBSHT) tiene dos sitios de corte. La estrategia utilizada se ejemplifica en la figura 10 y las condiciones de la PCR se encuentran en la tabla 2.

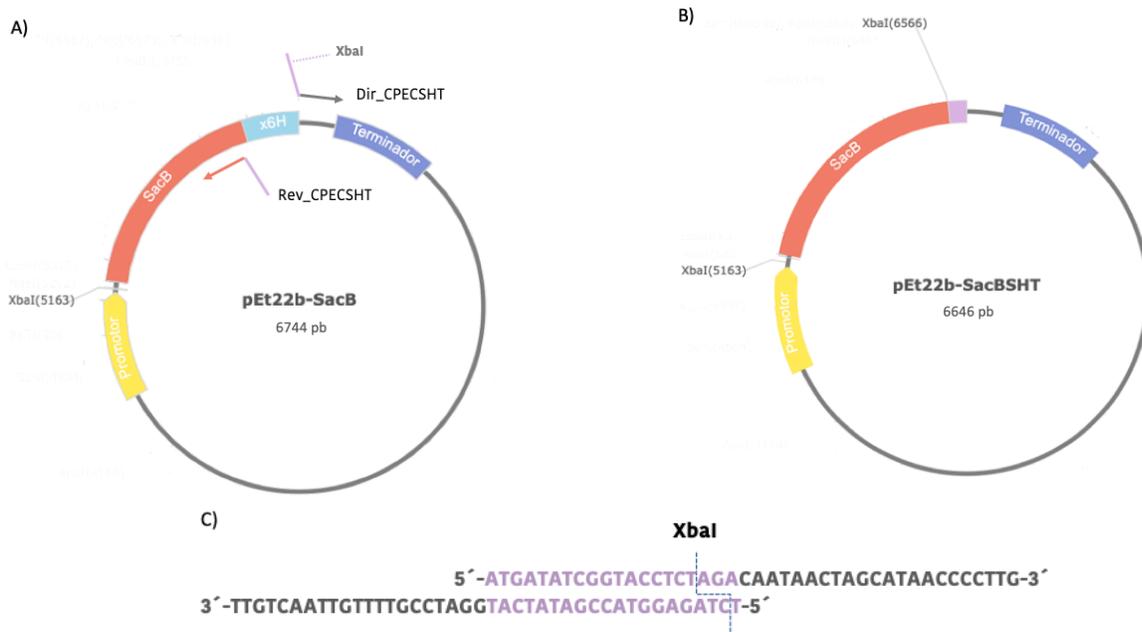


Figura 10. Representación de la técnica utilizada para eliminar la etiqueta His₆. A) Diseño de oligonucleótidos en el vector pEt22b-SacB, la etiqueta His₆ se presenta en color azul x6H). B) Vector obtenido a partir de la PCR inversa (pEt22b-SacBSHT). La región morada contiene el nuevo sitio de corte para XbaI. C) Oligonucleótidos directo y reverso, la región morada se diseñó para ser complementaria una de otra y así circularizar el vector. (La representación de los fragmentos es descriptivo, no corresponden al tamaño real).



Tabla 2. Condiciones de PCR inversa modificado

<i>Etapas</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Ciclos</i>
<i>Desnaturalización inicial</i>	98	30 s	1
<i>Desnaturalización</i>	98	30 s	
<i>Rampa de temperatura</i>		98 – 55 (0.1°C/s)	16
<i>Alineamiento</i>	55	30s	
<i>Extensión</i>	72	7 min	
<i>Extensión final</i>	72	5 min	1

El producto de PCR se transformó en células electrocompetentes *DH5α* a 1.9 v. Después de incubar durante 2 horas en medio LB, se plaquearon las células en cajas con LB y 200 µg/mL de ampicilina. Las siete colonias que crecieron se utilizaron para purificar los plásmidos y realizar una digestión con la enzima XbaI en presencia de amortiguador Tango10x por 2 horas.

El producto de digestión se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %. Esto permitió seleccionar los plásmidos que mostraron un patrón de digestión diferente al control (pET22b-SacB) al observarse dos bandas en lugar de una. Los plásmidos seleccionados se amplificaron con el oligonucleótido directo 5'-ACTCACACTTCGCTGTACCT-3' y reverso 5'-CAAGTGTAGCGGTCACGCTG-3'. El producto de PCR se mandó a secuenciar y así se corroboró la eliminación del fragmento de plásmido que corresponde a la etiqueta.

6.2 Selección de sitios a mutar

La selección de residuos específicos a mutar de los grupos que forman los SEUF identificados por (Ortiz-Soto et al., 2020), se realizó utilizando el PDB:1OYG y los softwares ProTSPoM (<https://cosmos.iitkgp.ac.in/ProTSPoM/>), iStable (<http://predictor.nchu.edu.tw/iStable/>) y Missense 3D (<http://missense3d.bc.ic.ac.uk:8080/>) considerando los siguientes parámetros: ID P05655, 37°C, pH 6.

6.3 Mutagénesis

El gen de la LS de *B. subtilis* cepa 168 se clonó anteriormente en el laboratorio en el vector pET-22b(+), bajo el control del promotor T7 (NOVAGEN). El gen *sacB* fue mutado a partir del plásmido obtenido de esa clonación (pET22b-SacB) con el protocolo de la técnica de mutagénesis sitio dirigida QuickChange para obtener las nuevas variantes⁴⁰. Los oligonucleótidos utilizados para generar las mutantes seleccionadas se reportan en la tabla 3 (los nucleótidos intercambiados se indican en minúsculas). Las condiciones de la reacción de PCR se indican en la tabla 4.



Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para mutagénesis dirigida al sitio

Oligonucleótido	Secuencia de ADN (5' a 3')
Dir-E275A	CCAAGGCGAAGAATCTTTATTTgcCAAAGCATACTATGGCAAAAGCA
Rev-E275A	TGCTTTTGCCATAGTATGCTTTGcAAATAAAGATTCTTCGCCTTG
Dir-K148A	GCGTCTTTAAAGACAGCGACgcATTTCGATGCAAATGATTC
Rev-K148A	GAATCATTTCGCATCGAAgcTGTCGCTGTCTTTAAAGACGC
Dir-D83A	CTCTTCTGCAAAAGGCCTGGcCGTTTGGGACAGCTGGCCAT
Rev-D83A	ATGGCCAGCTGTCCCAAACGgCCAGGCCTTTTGCAGAAGAG
Dir-D145A	TGGCCGCGTCTTTAAAGcCAGCGACAAATTCGATGCA
Rev-D145A	TGCATCGAATTTGTCGCTGgCTTTAAAGACGCGGCCA

Todas las mutaciones introducidas se confirmaron mediante secuenciación automatizada de ADN, en la unidad de secuenciación y síntesis del Instituto de Biotecnología.

Tabla 4. Condiciones de PCR para mutagénesis sitio-dirigida

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 s	1
Desnaturalización	98	10 s	16
Alineamiento	55	60 s	
Extensión	68	7 min	
Extensión final	72	5 min	1

El producto de PCR se digirió con DpnI en presencia de amortiguador Tango 10X durante toda la noche. Posteriormente se purificó por columna con el kit de purificación de productos de PCR marca ThermoScientific.

Se transformaron células electrocompetentes *DH5α* a 1.9 v, con el producto de PCR purificado. Después de incubar durante 1 hora en 1 mL de medio LB, se transfirió la transformación a cajas con LB con 200 µg/mL de ampicilina. Se seleccionaron 5 colonias, de las cuales se hizo extracción plasmídica y los plásmidos se mandaron a secuenciar para corroborar la mutación.

6.4 Obtención de enzimas

Para llevar a cabo la producción de la LS de *B. subtilis* se inocularon 50 mL de medio LB-ampicilina (200 µg/mL) con colonias *E. coli BL21* transformadas con el vector pET-22b-SacB (con la mutación correspondiente) y el vector pET22b-SacBSTH obtenido. Se incubaron por 18 horas a 250 rpm a 37°C. 15 mL de ese cultivo se utilizó como inóculo en 1 litro de medio LB con ampicilina 200 µg/mL, y se



incubó a 37°C y 200 rpm hasta llegar a una absorbancia de 0.5 ($\lambda = 600$ nm). Posteriormente se indujo la expresión génica con IPTG 0.2 mM (isopropil β -D-tiogalactósido) por 8 horas a 18°C y 120 rpm. Finalmente se cosecharon las células por centrifugación a 6500 rpm a 4°C durante 20 minutos, posteriormente se lavaron 3 veces con amortiguador de fosfatos 100 mM a pH 6 y se almacenaron en 5 mL del mismo amortiguador a -18°C. Las células se descongelaron y se agregó lisozima a una concentración de 1 mg/mL, para posteriormente realizar 3 ciclos de congelación-descongelación colocando la muestra en el ultracongelador a -70°C. Finalmente, se sonicó durante 40 segundos (por lapsos de 10 segundos de sonicación y 30 segundos de descanso) utilizando un sonicador Branson Sonifler 250. El sobrenadante se recuperó por centrifugación a 9500 rpm durante 40 minutos a 4°C y se cargó en una columna de CM sefarosa previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 6.0. La enzima se purificó mediante una cromatografía de intercambio iónico, con un gradiente de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 6.0 a amortiguador de fosfatos 1 M pH 6.0. Se colectaron las fracciones que contenían a la enzima, se concentraron por ultrafiltración en una unidad Amicon con una membrana Ultracel de celulosa regenerada y corte molecular de 30kDa.

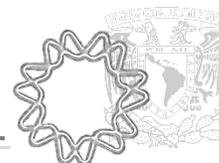
Las variantes de SacB purificadas se analizaron por SDS-PAGE utilizando el marcador RulerPage de Thermo Scientific. La concentración de proteína se midió por el método de Bradford (ensayo de proteína Bio-Rad) utilizando albúmina de suero bovino como patrón de proteína y se corroboró mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm, utilizando como coeficiente de extinción molar el valor de 1.23 (mg/mL)⁻¹ cm⁻¹, obtenido en Protparam.

6.5 Ensayo de actividad de levansacarasa

La actividad enzimática se midió siguiendo el poder reductor inicial liberado de 100 g/L de sacarosa en amortiguador de acetatos a 50 mM (pH 6) con 1 mM CaCl₂ a 37°C, utilizando el método de ácido 3,5-dinitro-salicílico⁴¹. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de equivalente de fructosa por minuto. Esto corresponde a una actividad global, ya que mide tanto la glucosa y fructosa producto de la hidrólisis, como la glucosa producto de la transferencia.

6.6 Síntesis de levana

Se realizaron reacciones de 1.5 mL a una concentración de sacarosa definida (100 g/L) en amortiguador de acetatos 50 mM a pH 6 y 37°C, variando las concentraciones de SacB (0.1, 1.0 y 10.0 U/mL



equivalentes a 0.55, 5.5 y 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enzima, respectivamente). Al concluir los tiempos de incubación (1 hora, 24 horas y 6 días, respectivamente), la enzima se inactivó en agua en ebullición durante 10 minutos. La muestra obtenida se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos para eliminar material insoluble y finalmente analizarlo por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) como se describe a continuación.

6.7 Cuantificación de azúcares

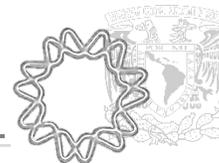
Las relaciones de *hidrólisis/transfructosilación* (H/T) y los niveles de conversión se determinaron midiendo individualmente la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa. Se realizaron curvas estándar de cada azúcar con concentraciones de 2, 4, 6 y 8 mg/mL . La glucosa y fructosa son el resultado de la actividad *hidrolítica*, mientras que la diferencia entre la concentración de glucosa y fructosa es el resultado de la actividad de *transfructosilación*. La cuantificación de azúcares se realizó mediante HPLC, elución isocrática, en un controlador del sistema Ultimate 3000 (Dionex) equipado con un detector IR Refractomax 520, Marca ERC y una columna Hypersil GOLD Amino (4.6 \times 250 mm) a 30 $^{\circ}\text{C}$, usando la fase móvil acetonitrilo/agua 75:25 (v/v) a 1 mL/min . La integración se llevó a cabo utilizando el Software Chromeleon Client 6.8, Dionex Corp.

6.8 Análisis del peso molecular de levana

El análisis de la distribución del peso molecular de la levana sintetizada por SacB WT y sus variantes se llevó a cabo en un sistema de permeación en gel (GPC) por medio de cromatografía de exclusión de tamaño con índice de refracción (SEC-RI). La columna utilizada fue Ultrahydrogel Linear (7.8 x 300 mm). Como eluyente se utilizó una solución 0.1 M de NaNO_3 a un flujo de 0.8 mL/min , manteniendo la columna a 35 $^{\circ}\text{C}$.

6.9 Ensayo de transferencia de resonancia de Förster

La LS *Bs*-SacB se conjugó de manera independiente con cada uno de los dos fluoróforos: AF546(donador) y AF647(aceptor). Para cada marcaje, se incubaron 500 μg de enzima y 50 μg de fluoróforo (ThermoFisher Scientific) a temperatura ambiente, en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.0 y en oscuridad por un tiempo de 24 horas. Estos fluoróforos se unen covalentemente a los residuos de lisina que se encuentran expuestos en *Bs*-SacB. El marcaje se comprobó con un SDS-PAGE, se visualizó por excitación del gel con un transiluminador de luz UV y se analizó en un sensor de imágenes Amersham Imager 600. El gel también se reveló con azul de Coomassie.



Después de comprobar el marcaje, el fluoróforo libre se retiró por medio de diálisis en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.0 durante 24 horas, a 4°C y con agitación constante. Para verificar que esta unión no interviniera con la actividad de SacB, se llevó a cabo un análisis por GPC y de actividad con DNS de cada enzima derivatizada. El análisis del producto de reacción se realizó a 5.5 µg/mL de SacB, 100 g/L de sacarosa en amortiguador de fosfatos 50 mM, 1 mM CaCl₂ en 24 horas.

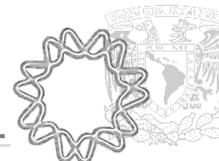
El ensayo se realizó en presencia y ausencia de sacarosa 100 g/L. Cada prueba se preparó a un volumen final de 50 µL con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6, 1 mM CaCl₂, 100 g/L de sacarosa y una concentración final de 55.0 µg/mL de enzima (27.5 µg/mL de SacB marcada con AF546 y 27.5 µg/mL marcada con AF647). Para el segundo ensayo, la concentración de enzima marcada con el fluoróforo aceptor (SacB-AF647) fue variable de acuerdo a las siguientes proporciones (1:0.5, 1:1, 1:2 y 1:4) con una concentración de enzima final de 41.3 µg/mL, 55.0 µg/mL, 82.5 µg/mL y 137.5 µg/mL, respectivamente, en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6. Las mezclas finales para el ensayo de FRET se transfirieron a placas de 96 pocillos, se incubaron durante toda la noche a 37°C y la lectura se realizó al día siguiente. Se registraron los espectros de emisión de fluorescencia por medio del espectrofluorímetro Infinite M10000 Pro, a 25 ° C y de 560 a 700 nm.

6.10 Análisis estructural

Los programas PIPER y ClusPro se utilizaron para definir la probable interacción proteína-proteína (SacB-SacB)"ligando-receptor". El servidor ClusPro (<https://cluspro.org>) realiza tres pasos computacionales de la siguiente manera:

- 1) Acoplamiento de cuerpo rígido mediante muestreo de miles de millones de conformaciones.
- 2) Agrupamiento basado en la desviación cuadrática media (RMSD) de las 1,000 estructuras generadas de menor energía, para encontrar los grupos más grandes que representarán los modelos más probables del complejo.
- 3) Refinamiento de estructuras seleccionadas usando minimización de energía.

El paso de acoplamiento de cuerpo rígido es realizado por PIPER, un programa basado en el enfoque de correlación de Transformación rápida de Fourier (FFT)⁴²⁻⁴⁴.



Se seleccionó directamente la estructura de SacB (PDB:1OYG) para realizar el análisis de IPP desde el servidor ClusPro. Los resultados se analizaron mediante PYMOL. La contribución de energía de unión por cada aminoácido, en la interacción proteína-proteína y proteína-oligosacárido del cristal PDB:6VHQ, se obtuvo usando el campo de fuerza Amber10/14EHT con un gradiente de 0.1 kcal/mol/Å², Software Molecular Operating Environment (MOE) 2019.



7. Resultados y discusión

7.1 Efecto de la etiqueta de histidinas en la especificidad de SacB

Hemos descrito en las generalidades del proyecto, cómo se ha demostrado que el comportamiento de *Bs*-SacB depende de factores fisicoquímicos y, sobre todo, de la concentración de enzima. Además, se han observado también cambios en las propiedades de *Bs*-SacB derivados de las modificaciones estructurales, particularmente de extensiones en el C terminal, incluyendo la construcción de una enzima de fusión como SacB-IslA. Los efectos en las propiedades de SacB encontrados al modificar estructuralmente la enzima, sugieren que la extensión que representa la etiqueta de histidinas pudiera alterar su especificidad. Dado el objetivo de este proyecto de determinar si las modificaciones que involucren la estructura superficial de la enzima afectan su especificidad, resulta imperativo verificar el efecto de dicha extensión en la actividad de *Bs*-SacB. La proteína recombinante que denominamos SacB WT contiene la etiqueta de histidinas. La versión obtenida sin la etiqueta de histidinas se denominó SacBSTH.

La enzima SacBSTH se obtuvo mediante la modificación de un protocolo de PCR inversa. En la figura 11 se presenta el gel de agarosa (0.8 %) donde se verificó, por medio de un segundo sitio de corte para XbaI incluido en los oligonucleótidos diseñados, la escisión de la etiqueta de histidinas. La doble banda que se observa en la figura 11. A carril 3 y 4 mostró las colonias con la modificación. Este doble sitio de corte que evidenciaba la eficiencia del protocolo de modificación se verificó en el gel de la figura 11.B.

En la figura 12 presenta la comparación de SacB WT y SacBSTH en SDS-PAGE. La baja concentración de la muestra apenas permite observar la ligera diferencia de peso molecular que se espera al eliminar la etiqueta (0.8kDa). La actividad específica de SacBSTH fue de $158.8 \text{ U/mg} \pm 8.8$, una actividad similar a SacB WT (177.9 ± 1.1).

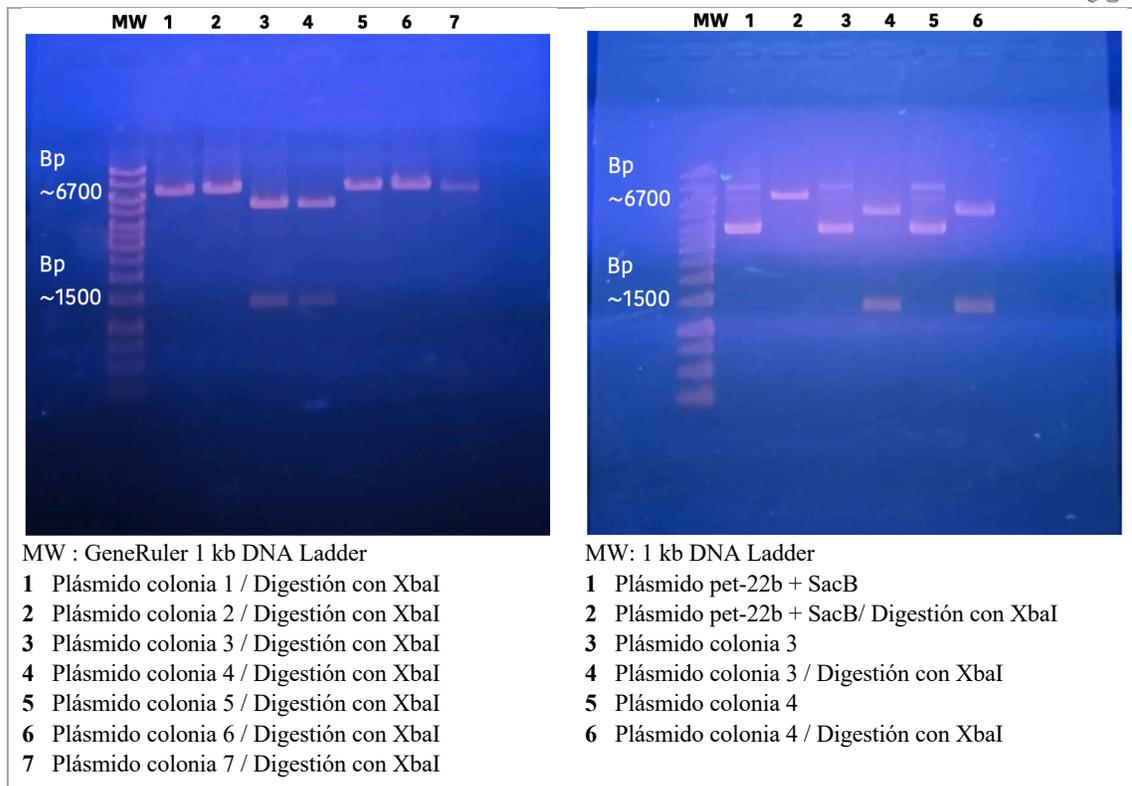
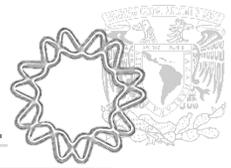


Figura 11. Geles de agarosa para análisis de mutagénesis por PCR inversa.

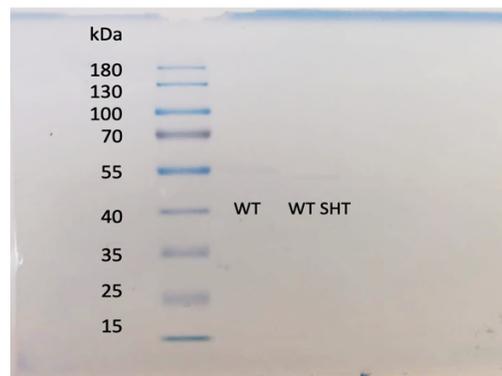
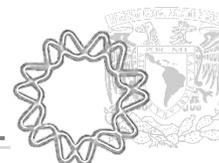


Figura 12. LS analizadas por SDS-PAGE 10% A) SacB WT y SacBSHT B) SacB WT y variante E275A C) SacB WT y variantes K148A y D83A expresadas en *Escherichia coli* BL21. (Marcador de peso molecular PageRuler).

Las etiquetas de polihistidina (His₆) se emplean comúnmente en estrategias de purificación de proteínas debido a la alta afinidad y especificidad por las columnas de metal-NTA (metal quelado por ácido nitrilotriacético acoplado a una resina de agarosa). La relativa simplicidad de dichos protocolos y el hecho de que generalmente las etiquetas His₆ no afectan la actividad nativa de las proteínas, hace que ésta sea una estrategia de uso común dentro de los trabajos de expresión/purificación de proteínas. Sin embargo,



existe una creciente evidencia de que, en ciertos casos, tales etiquetas pueden afectar la estructura y eventualmente la función de la enzima a la que se fusionan.

Al evaluar la relación H/T se observa que SacBSTH presenta una mayor actividad de *transferencia* respecto a SacB WT a 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figura 13), y solo produce levana de bajo peso molecular a esa concentración de enzima (figura 14). Además, SacBSTH presenta una mayor actividad *hidrolítica* comparada con SacB WT a 0.55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, equivalente a 0.1 U/mL. Es interesante notar que esta diferencia solo se observa a una baja concentración de enzima, que está acompañada de la producción de levana de bajo peso molecular como puede constatarse más adelante en los resultados obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño de la figura 14.

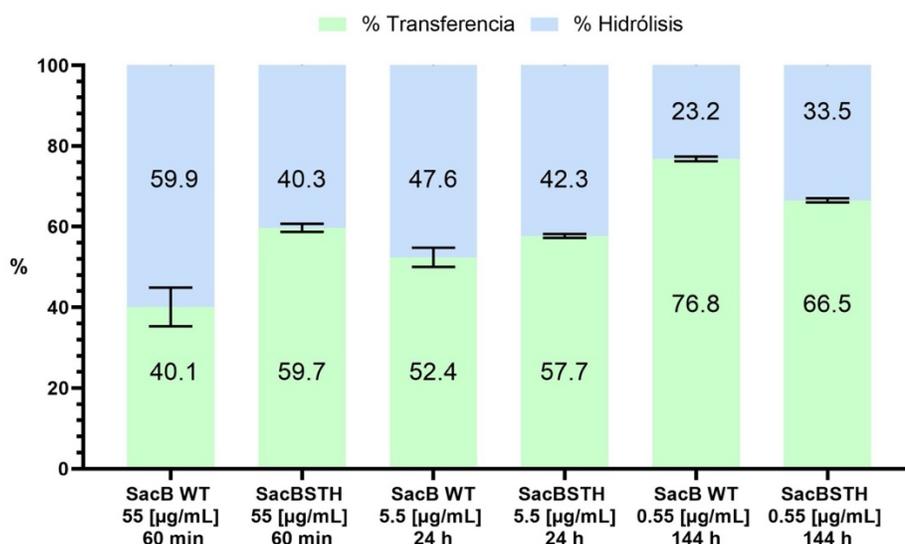
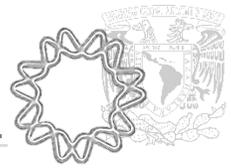


Figura 13. Relación *Hidrólisis/Transfructosilación* de la LS SacB WT y SacBSTH evaluadas con 100 g/L de sacarosa, a 37°C, empleando diferentes concentraciones de enzima.

Cuando se analizaron las levanas sintetizadas por SacBSTH se encontró que, al eliminar la etiqueta de histidinas, se obtiene un cambio en la proporción de la distribución del peso molecular, cuando ésta se analiza en las condiciones estándar de reacción: 1 U/mL a 37°C y 100 g/L de sacarosa (figura 14). Así, si bien la distribución de pesos moleculares continúa siendo bimodal, se presenta una mayor proporción de levana de bajo peso molecular con SacBSTH, con respecto a SacB WT. Cuando el ensayo se realiza a 10 U/mL de concentración de las enzimas, el comportamiento de SacBSTH es el mismo que el de SacB WT, al sintetizar preferentemente levana de bajo peso molecular, como siempre que se trabaja con altas concentraciones de enzima. Finalmente, a la más baja concentración de enzima, que corresponde a 0.1



U/mL, observamos un comportamiento diferente al de SacB WT, ya que aparece también levana de bajo peso molecular, es decir una distribución bimodal que no se había observado a tan bajas concentraciones de enzima.

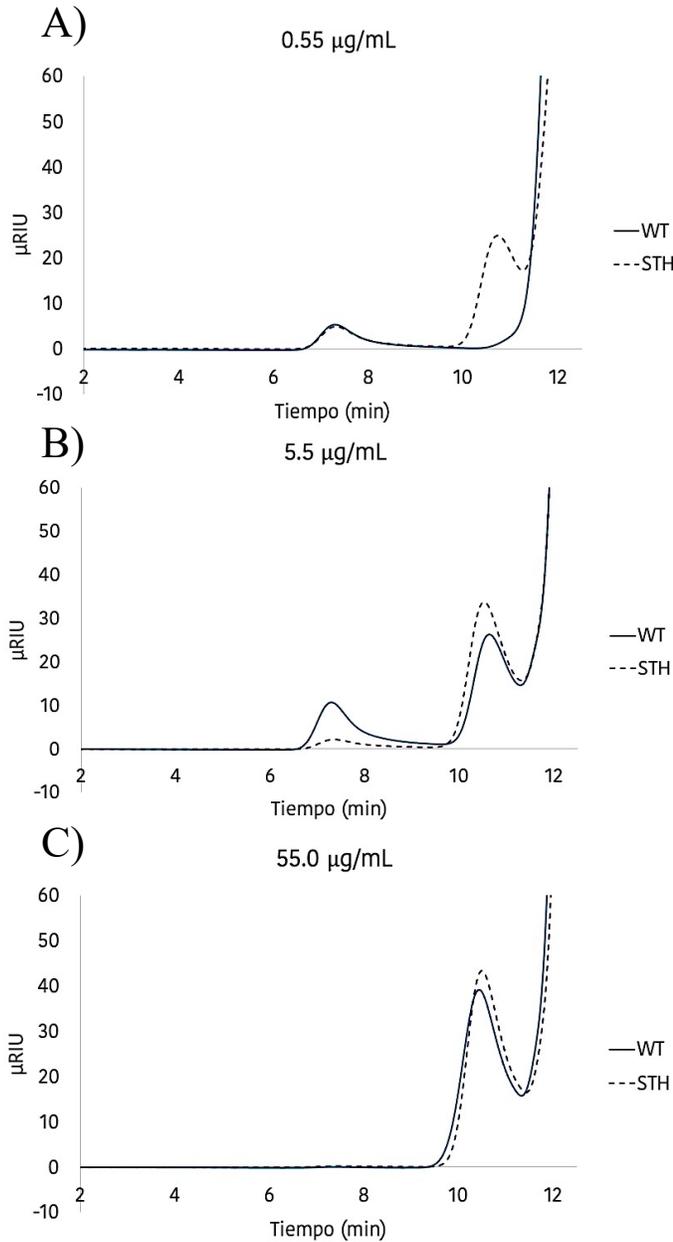
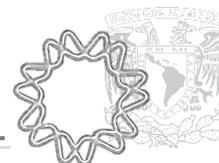


Figura 14. Distribución del peso molecular de la levana producida por SacB WT (línea continua) y SacBSTH (línea discontinua), empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa, a 37°C y pH 6. A) Reacción con 0.55 $\mu\text{g/mL}$ de enzima equivalente a 0.1 U/mL, B) Reacción con 5.5 $\mu\text{g/mL}$ de enzima equivalente a 1.0 U/mL, C) Reacción con 55.0 $\mu\text{g/mL}$ de enzima equivalente a 10 U/mL.

Si bien, se mantiene una distribución bimodal del peso molecular de levana en las condiciones estándar, podemos observar que la etiqueta sí influye en la distribución del peso molecular del polímero, particularmente al modificar la concentración de enzima. Es probable que al agregar la extensión que involucra la etiqueta His₆, se afecten las IPP, favoreciendo la síntesis de polímero de alto peso molecular



y viceversa; al eliminar la etiqueta His₆, se favorezcan la IPP por lo que se favorece la producción de levana de bajo peso molecular. Sin embargo, no hay evidencia suficiente que concuerde con esta hipótesis y pueden existir otras razones que expliquen este comportamiento, ya que se ha reportado que el etiquetado de proteínas con esta técnica provoca variaciones en la estructura terciaria⁴⁵. Es interesante que la condición de baja concentración de enzima que se ha reportado para la obtención exclusiva de levana de alto peso molecular, no se observa si la enzima no está modificada con la extensión de histidinas (figura 14). Resulta de gran interés analizar si la versión SacBSTH puede dar lugar exclusivamente a levana de alto peso molecular en otras condiciones de reacción ya evaluadas para SacB WT con la extensión, tales como la presencia de disolventes o su inmovilización covalente a un soporte sólido.

7.2 Estudio de la modificación del SEUF-1, SEUF-2 y SEUF-3

A partir de la identificación de los sitios externos de unión a fructosa, se elaboró una hipótesis en la que se plantea que el mecanismo de reacción de *Bs*-SacB y la especificidad que conduce a cambios en la distribución del peso molecular, pueden ser el resultado de un tipo de IPP y/o proteína-fructana que probablemente involucren a los SEUF identificados por Ortiz et al., 2020¹¹. Para estudiar su participación en el comportamiento de *Bs*-SacB, se eligieron los siguientes aminoácidos para realizar la mutación por alanina: E275 de SEUF-1, K148 de SEUF-2, D83 de SEUF-3. Estos aminoácidos presentan interacciones con la molécula de fructosa, del tipo Van der Waals y enlaces de hidrógeno por parte de su cadena lateral correspondiente. Se realizó una predicción de la estabilidad, usando los softwares ProTSpom, iStable y Missense 3D, para cada posible mutante, como otro criterio de selección. La tabla con esta información se encuentra en el anexo. Las variantes diseñadas contienen la etiqueta de histidinas debido a que, como se presentó en la sección 7.1, no se detectaron cambios contrastantes de acuerdo al peso molecular de la levana sintetizada por SacBSTH que afectarían las observaciones del comportamiento de estas variantes.

En la figura 15 se muestra el SDS-PAGE de las LS SacB WT, E275A, K148A y D83A. Como se puede apreciar, las enzimas poseen el mismo peso molecular esperado de 52 kDa.

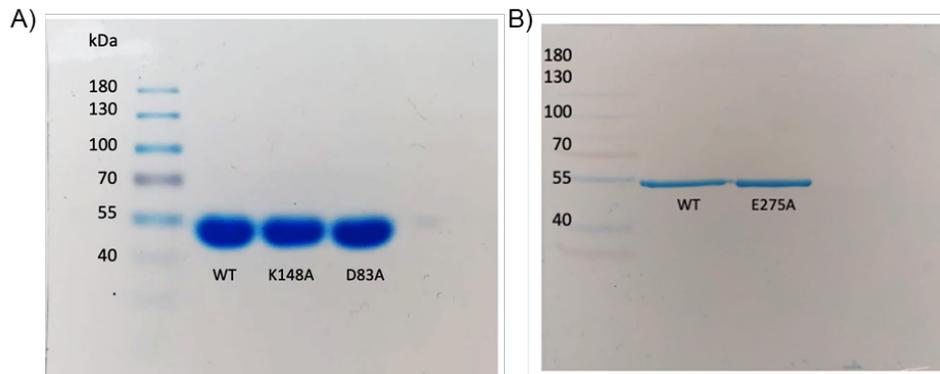
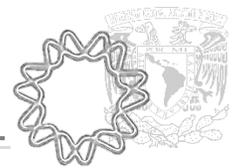


Figura 15. LS analizadas por SDS-PAGE 10% A) SacB WT y variante E275A B) SacB WT y variantes K148A y D83A expresadas en *Escherichia coli* BL21. (Marcador de peso molecular PageRuler).

La actividad específica se reporta en la tabla 5, en donde se muestra que las variantes tienen una actividad similar a SacB WT a 37°C, con excepción de la mutante D83A que tiene una actividad específica considerablemente menor.

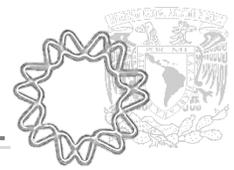
Tabla 5. Actividad específica de las LS construidas en el proyecto.

Variante	Actividad específica U/mg
SacB WT	177.9 ± 1.1
SacB E275A	182.6 ± 3.8
SacB K148A	167.0 ± 11.8
SacB K148A/D145A	164.7 ± 1.7
SacB D83A	71.1 ± 1.5
SacB D83A*	60.4 ± 2.5

*Ensayo de actividad a 28°C

7.2.1 Estudio del sitio externo de unión a fructosa (SEUF) 1

En la caracterización del efecto de la mutación E275A, que pertenece al SEUF-1 en *Bs*-SacB se encontró que, de acuerdo a la relación H/T, en condiciones de reacción estándar (1 U/ mL, 100 g/L de sacarosa y 37 ° C), la variante se comporta más como *hidrolasa* (H) que como *transferasa* (T) presentando una relación de (H/T = 60.8/39.2) como se presenta en la figura 16. También se ha observado el efecto directo de la concentración de la enzima sobre la relación H/T, que resulta en una mayor tasa de *hidrólisis* cuando la concentración de la enzima aumenta (55.0 µg/mL equivalente a 10 U/mL con H/T = 55.8/44.2), siendo



solo del 34% cuando la concentración de enzima es muy baja (0.1 U/mL de actividad con H/T = 34.3/63.6). Este comportamiento es el mismo que para SacB WT (mayor *hidrólisis* a mayor concentración de enzima).

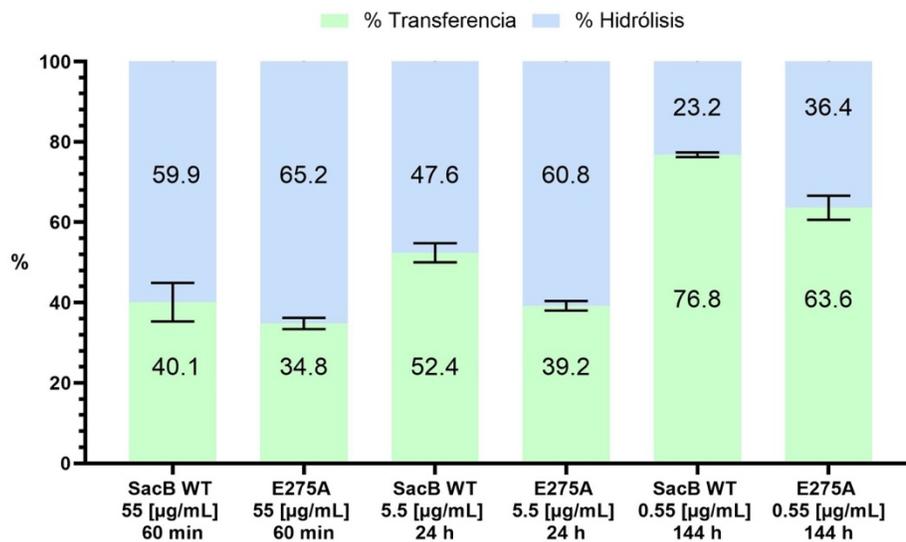


Figura 16. Relación *Hidrólisis/Transfructosilación* de la LS SacB WT y mutante E275A a 100 g/L de sacarosa y 37°C a diferentes tiempos y concentraciones de enzima.

Al analizar la distribución del peso molecular de la levana producida por la variante E275A a distintas concentraciones (figura 17), se observó que, el comportamiento de la variante es el mismo que SacB WT cuando la reacción se lleva a cabo a 0.55 µg/mL de enzima, sin embargo, al analizar las concentraciones de azúcares, observamos que en estas condiciones, la conversión de sacarosa fue total (> 98 %) a diferencia del comportamiento que se observa con SacB WT con la que normalmente no se alcanza más de un 80% de conversión. Esa observación puede explicar la mayor producción de levana de alto peso molecular de E275A con respecto a SacB WT en condiciones de baja concentración de enzima. Cuando la concentración de enzima es de 5.5 µg/mL, E275A muestra el mismo perfil de producto que SacB WT, pero con mayor producción de levana de alto peso molecular (figura 17. B). Por otro lado, para una concentración de 55.0 µg/mL (figura 17. C) detectamos escasa presencia de levana de alto peso molecular, que no se observa en SacB WT.

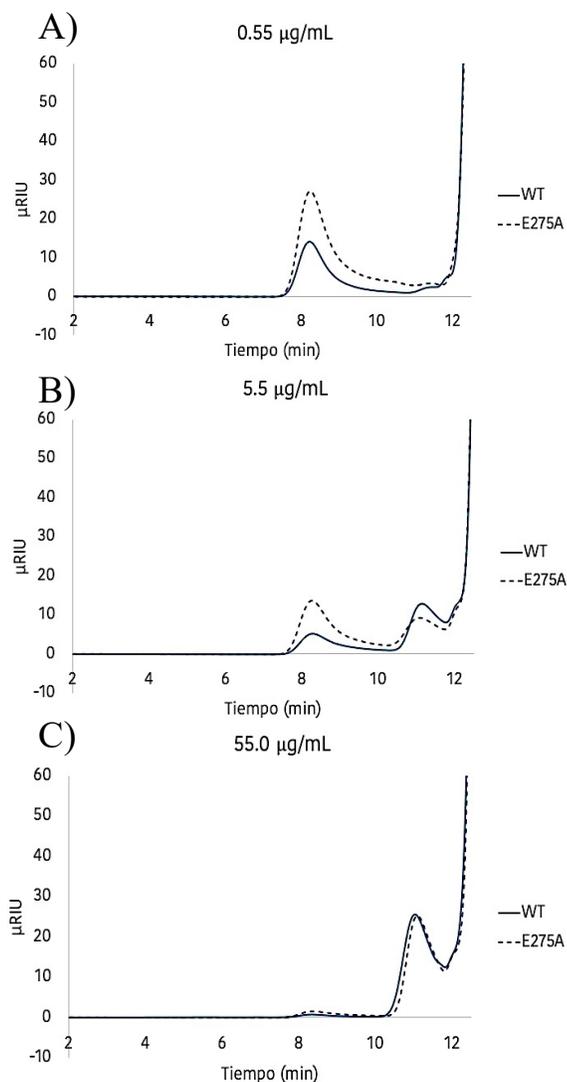
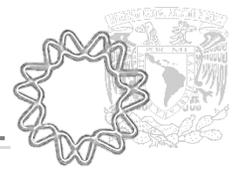


Figura 17. Distribución del peso molecular de la levana producida por SacB WT (línea continua) y mutante E275A (línea punteada), empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa, a 37°C y pH 6. A) Reacción con 0.55 $\mu\text{g/mL}$ de enzima equivalente a 0.1 U/mL, B) Reacción con 5.5 $\mu\text{g/mL}$ de enzima equivalente a 1.0 U/mL, C) Reacción con 55.0 $\mu\text{g/mL}$ de enzima equivalente a 10 U/mL.

Es probable que el efecto de la mutación no sea suficiente para causar un efecto significativo cuando la reacción se lleva a cabo a altas concentraciones de enzima, es decir que E275 no es el principal residuo que contribuye en la energía de unión enzima-fructosa. De acuerdo al acoplamiento molecular¹¹, E275 presenta interacciones de tipo hidrofóbico, a diferencia de los demás aminoácidos que podemos encontrar en SEUF-1, como Y37, Y41 y Y282 que interactúan a través de enlaces de hidrógeno que se establecen entre la fructosa y los fenoles de las tirosinas. El residuo E275 fue elegido a partir de las predicciones de estabilidad de la enzima, como se muestra en anexo, Tabla A.



7.2.2 Estudio del sitio externo de unión a fructosa (SEUF) 2

Para explorar la influencia del sitio SEUF-2 en el mecanismo de elongación de las cadenas de levana, se construyó la mutante K148A debido a que K148 es un aminoácido que interactúa con la fructosa y su modificación por alanina no alteraría de forma considerable la estabilidad de la LS, tal como se presenta en una predicción mostrada en anexo, tabla B. Se encontró que el comportamiento de esta mutante relativo a la tasa de H/T, es el mismo que para SacB WT (mayor *hidrólisis* a mayor concentración de enzima) pero que, a diferencia de ésta, la mutante K148A posee un mayor porcentaje de *transfructosilación* que de *hidrólisis*, tendencia que se observa en las tres concentraciones de enzima exploradas. Los resultados se obtuvieron una vez que se alcanzaron conversiones de sacarosa superiores al 80%, para el caso de las concentraciones de 55.0 y 5.5 $\mu\text{g/mL}$. Para 0.55 $\mu\text{g/mL}$ el resultado se reporta para un 55% de conversión (figura 18).

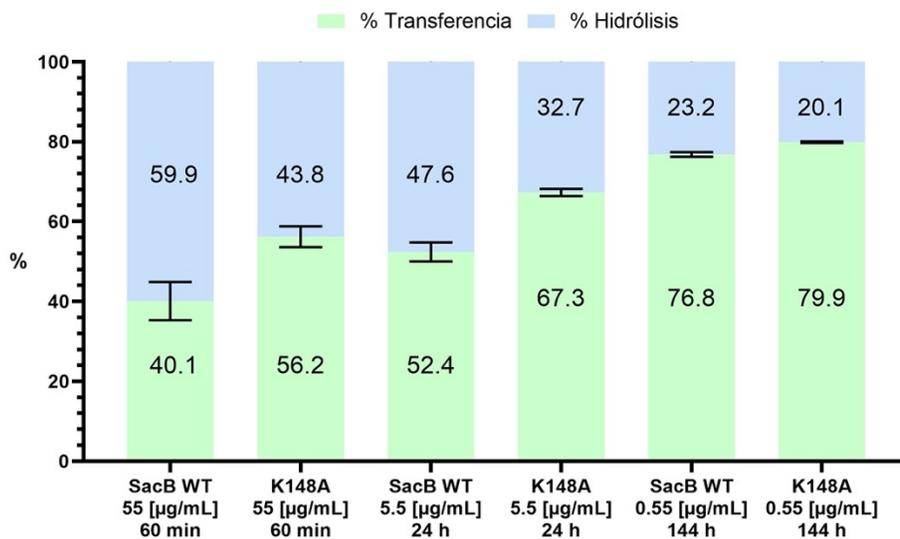


Figura 18. Relación (*Hidrólisis/Transfructosilación*) de la LS SacB WT y mutante K148A evaluada a 100 g/L de sacarosa y 37°C a diferentes tiempos y concentraciones de enzima.

Como se muestra en la figura 19, a una concentración de 5.5 $\mu\text{g/mL}$ de la mutante K148A, se observa preferentemente la síntesis de levana de alto peso molecular. Con este resultado podríamos formular la hipótesis de que al sustituir el residuo K148, clave en el subsitio, las IPP se desfavorecen, y derivado de esto, se desfavorecen también las interacciones con el polímero en crecimiento, evitando un efecto de "secuestro" de las cadenas de fructo-oligosacáridos, y como resultado, un aumento en la proporción de levana de alto peso molecular promedio.

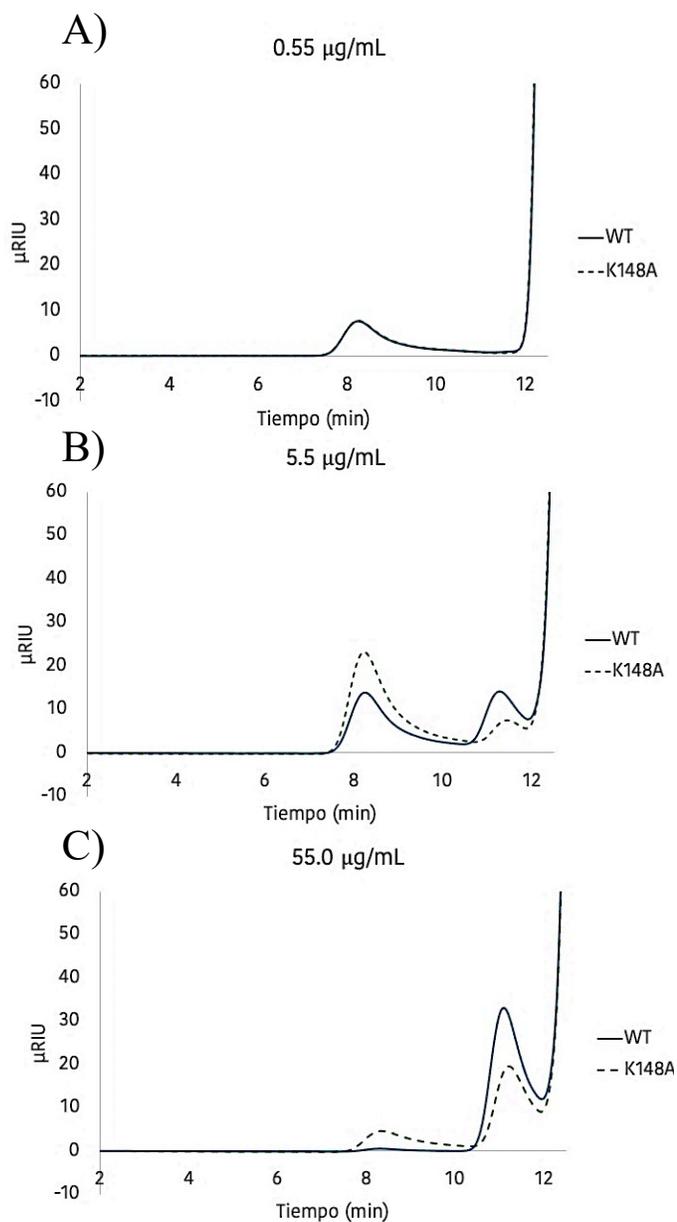
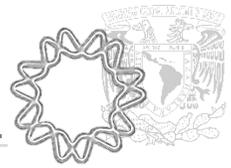


Figura 19. Distribución del peso molecular de la levana producida por SacB WT (línea continua) y mutante K148A (línea punteada), empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa, a 37°C y pH 6. A) Reacción con 0.55 $\mu\text{g/mL}$ de enzima equivalente a 0.1 U/mL, B) Reacción con 5.5 $\mu\text{g/mL}$ de enzima equivalente a 1.0 U/mL, C) Reacción con 55.0 $\mu\text{g/mL}$ de enzima equivalente a 10 U/mL.

Con base en estos resultados, se espera que el aminoácido K148 sea uno de los que integren el sitio externo de unión a fructosa en SacB, el cual participaría en la IPP durante la reacción. Por lo que, el resultado observado al mutar este aminoácido, podría ser consecuencia de debilitar la IPP o proteína-levana que conlleva al secuestro de la cadena, favoreciendo la síntesis de levana de alto peso molecular, lo que es congruente con los resultados obtenidos hasta ahora. Si la hipótesis es correcta, tenemos la expectativa de que una mutación adicional en este sitio, afectaría con mayor efectividad la interacción, hasta llegar a una forma de *Bs*-SacB que solo sintetice polímero de alto peso molecular.



De acuerdo a la hipótesis antes mencionada, se decidió explorar aún más la importancia del sitio SEUF-2 construyendo la mutante D145A sobre la mutante K148A, para obtener la doble mutante K148A/D145A, ambos aminoácidos identificados en el sitio SEUF-2. Respecto a la tasa de H/T, la doble mutante presentó un comportamiento similar a SacB WT, pero a concentraciones de 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 55.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resultó ser 10 y 7 % más hidrolítica que SacB WT respectivamente (figura 20), a diferencia de la mutante sencilla K148A que presentó mayor actividad de *transferencia*.

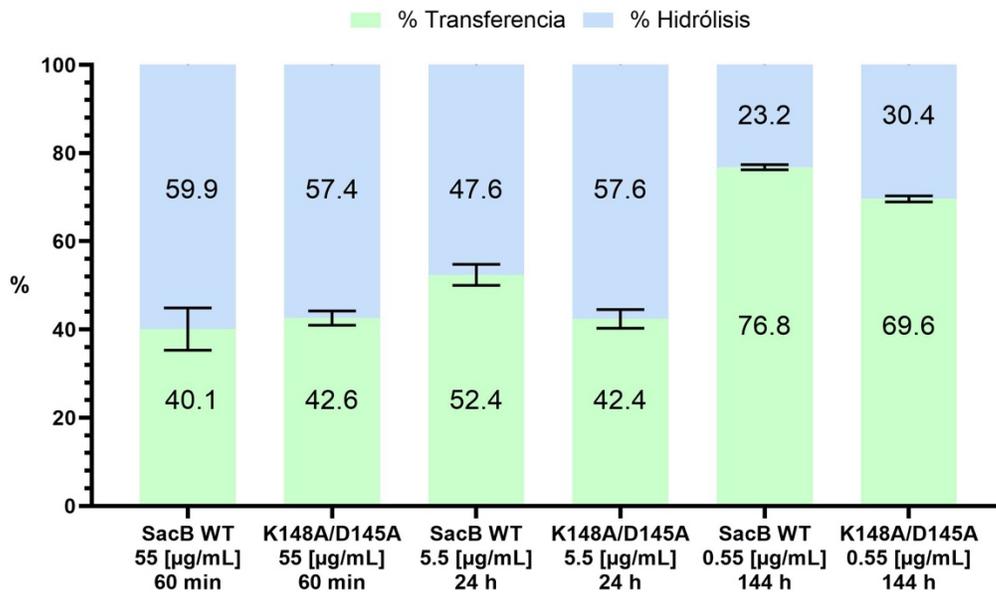


Figura 20. Relación *Hidrólisis/Transfructosilación* de la LS SacB WT y mutante K148A/D145A evaluada a 100 g/L de sacarosa y 37°C a diferentes tiempos y concentraciones de enzima.

Inesperadamente, los resultados muestran que la segunda mutación no dio lugar a cambios en la distribución del peso molecular de la levana con respecto a los obtenidos con la mutante sencilla K148A, por el contrario, en condiciones de proteína concentrada (55.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), disminuyó la producción de levana de alto peso molecular (figura 21).

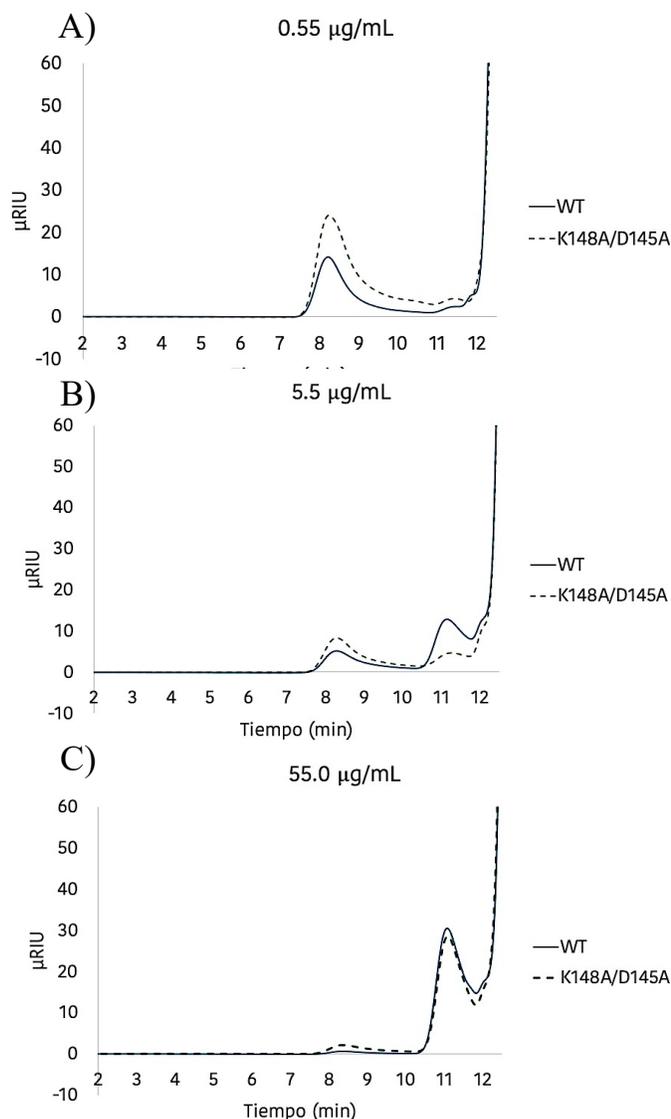


Figura 21. Distribución del peso molecular de la levana producida por SacB WT (línea continua) y mutante K148A/D145A (línea punteada), empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa, a 37°C y pH 6. A) Reacción con 0.55 μg/mL de enzima equivalente a 0.1 U/mL, B) Reacción con 5.5 μg/mL de enzima equivalente a 1.0 U/mL, C) Reacción con 55.0 μg/mL de enzima equivalente a 10 U/mL.

Recientemente, Raga y cols (2021)²³, publicaron la estructura cristalográfica de *Bs*-SacB en complejo con oligosacáridos de fructosa (PDB:6VHQ). El cristal muestra nuevos subsitios de unión a sustrato (+3 y +4) que no se habían reportado con anterioridad, además de un segundo sitio de unión a 20 Å del sitio activo. Este nuevo sitio (OB2), encontrado en el cristal, coincide con 6 de los 10 aminoácidos encontrados en SEUF-2 mediante el estudio de acoplamiento molecular entre *Bs*-SacB y fructosa.

Se realizó un análisis de la contribución de la energía de unión de cada aminoácido en la interacción con el oligosacárido de fructosa en el cristal 6VHQ por medio de MOE. La tabla 6 presenta los aminoácidos en el OB2 (cadena B) que interactúan mediante enlaces de hidrógeno con las fructosas del oligómero co-



cristalizado (cadena A), así como las energías de unión, el lugar y la frecuencia correspondientes. Como se puede apreciar, el aminoácido con mayor energía de unión a fructosa es K148 (-15.3 y -6.8 kcal/mol), cuyo efecto en la reacción hemos descrito. Además, K148 presenta interacción con dos moléculas de fructosa, a diferencia de los otros aminoácidos que participan en la interacción con solo una molécula de fructosa. El siguiente aminoácido en importancia, de acuerdo con las predicciones de energías de unión que se muestran en la tabla 6, sería justamente D145. Sin embargo, aunque la energía de unión entre la fructosa y el ácido aspártico es favorable (-5.9 kcal/mol) y se presenta con mayor frecuencia (3), la interacción con la fructosa se lleva a cabo con el esqueleto (backbone) y no con el ácido carboxílico del ácido aspártico. Esta observación podría explicar por qué la modificación del ácido aspártico por alanina no presenta mayor contribución en la especificidad de la doble mutante, ya que el ácido aspártico y la alanina comparten la misma estructura del esqueleto proteico.

Tabla 6. Energías de unión entre los aminoácidos del sitio SEUF-2 de *Bs*-SacB y la fructosa, obtenidas en MOE a partir del cristal 6VHQ

OB2

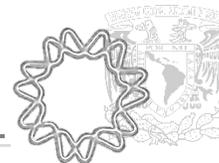
<i>Tipo</i>	Cadena A	SetA	Cadena B	SetB	Energía (kcal/mol)	Dist	BB	Frecuencia
<i>H</i>	6-6VHQ.F	FRU2	2-6VHQ.B	Arg141	-2.8	2.84	--	1
<i>H</i>	6-6VHQ.F	FRU2	2-6VHQ.B	Asp145	-5.9	3.15	✓	3
<i>H</i>	6-6VHQ.F	FRU2	2-6VHQ.B	Gln159	-2	3	--	1
<i>H</i>	6-6VHQ.F	FRU1	10-6VHQ.B	HOH636	-3.2	2.91	--	2
<i>H</i>	6-6VHQ.F	FRU1	2-6VHQ.B	Lys148	-15.3	2.97	--	2
<i>H</i>	6-6VHQ.F	FRU2	2-6VHQ.B	Lys148	-6.8	3.36	--	2
<i>H</i>	6-6VHQ.F	FRU1	2-6VHQ.B	Lys185	-0.6	3.03	--	1
<i>H</i>	6-6VHQ.F	FRU1	2-6VHQ.B	Thr160	-0.5	3.69	✓	1

FRU1: fructosa 1 de 6 del oligosacárido co-cristalizado con SacB
FRU2: fructosa 2 de 6 del oligosacárido co-cristalizado con SacB

BB: "backbone"

Dist: Distancia en Å

Además, puede existir la posibilidad de que, como consecuencia de la mutación, los aminoácidos vecinos presenten una afinidad mayor hacia la fructosa, alcanzando la energía de unión de K148. Tal podría ser el caso de Q159, E162 y T160, que podría explicar el comportamiento de la doble mutante K148A/D145A. También debemos considerar que, de acuerdo a los estudios de acoplamiento, la enzima tiene otros sitios de unión a fructosa en la superficie, que probablemente estén contribuyendo a la interacción del polímero en crecimiento que resulte en un impedimento en la síntesis de levana de alto peso molecular.



7.2.3 Estudio del sitio externo de unión a fructosa (SEUF) 3

Al construir la mutante D83A y analizar su efecto en la tasa H/T y en las reacciones de producción de levana, lo primero que observamos fue la pérdida total de actividad a partir de los 20 minutos de reacción a 37°C, lo que se corroboró al medir la actividad global por medio del ensayo de DNS. En efecto, a los 20 minutos de incubación, la enzima ya no presentaba actividad cuantificable.

Para analizar el comportamiento de esta enzima, se midió la actividad global siguiendo la aparición de azúcares reductores con el reactivo DNS, disminuyendo la temperatura de incubación y de reacción a 28°C. Se encontró que, a esta temperatura, la pérdida de actividad específica es considerablemente menor en comparación con la pérdida a 37°C. En la figura 22 se observa una pérdida de alrededor de 20 U/mg de enzima a 28°C después de las 24 horas de incubación en comparación con la pérdida total de actividad a ese tiempo cuando se incubó a 37°C. Por esta razón, se decidió llevar a cabo la caracterización de la mutante D83A a 28°C. No se optó por realizar la caracterización a una temperatura aún más baja, donde probablemente la enzima permaneciera más estable, ya que se sabe que la especificidad de *Bs-SacB* es sensible a la temperatura^{8,18}.

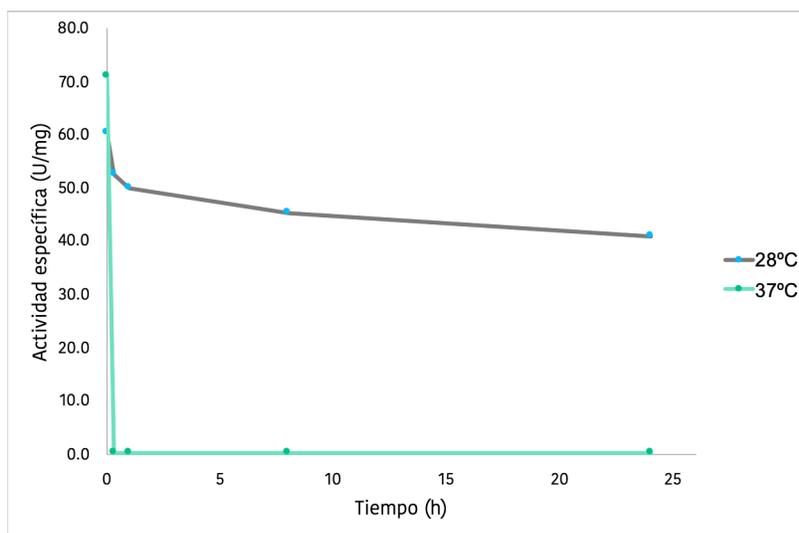


Figura 22. Análisis de la actividad específica respecto al tiempo de la variante D83A a 28 y 37°C.

Como se observó anteriormente y se confirmó con la nueva estructura reportada, la mutación S164A provoca la interrupción del papel catalítico de D86. Como nucleófilo, el residuo D86 tiene una participación esencial en la reacción, por lo que es probable que cualquier modificación en torno a esta



posición afecte la actividad de *Bs*-SacB. Este puede ser el caso de la mutación D83A, que provocó la pérdida de actividad totalmente a 37°C después de 20 minutos, de lo que se deduce que este residuo debe estar involucrado en la estabilidad termodinámica de la enzima. Para poder comprender este comportamiento, se realizó una estimación de estabilidad de la mutante D83A mediante ProTSpoM (Estimating Change in Protein Thermodynamic Stability owing to Single Point Mutation). El resultado indica para D83A una $\Delta\Delta G$ desestabilizadora (-0.76 kcal/mol) con respecto a SacB WT, además de contribuir a la desestabilización al modificarse un residuo enterrado cargado (1.8% RSA) por una alanina. Por otro lado, influye también el interrumpir todos los enlaces de hidrógeno que se forman entre las cadenas laterales y/o entre la cadena lateral y la cadena principal formada con el aspártico. Un estudio realizado por Tokuriki y cols⁴⁶, considera que las mutaciones altamente desestabilizadoras contribuyen con una $\Delta\Delta G > 3$ kcal/mol para proteínas globulares, monoméricas y de dominio único y que la estructura más afectada es la hoja beta, por lo que la pérdida estimada, resulta altamente desestabilizadora, como se constató experimentalmente.

De acuerdo con la figura 23, obtenida del análisis en MOE y visualizada en PYMOL, esta desestabilización podría atribuirse a la localización del residuo en la extremidad de la beta propela. La mutación D83A provoca una mayor flexibilidad del bucle y una pérdida de estructura secundaria y orientación de la hoja beta que forma parte de la beta propela. Esta estimación puede aproximarse a la razón por la cual la mutante pierde estabilidad, tal como muestran los resultados experimentales, ya que está directamente relacionada con la estructura de la enzima. De acuerdo con observaciones realizadas mediante PYMOL, el aminoácido D83 estabiliza mediante enlaces de hidrógeno directamente a diversos aminoácidos vecinos tales como G111, G434, S441. Estos aminoácidos estabilizan a su vez a cadenas vecinas que participan en la estructuración de la beta propela y poseen (al igual que D83) un factor B bajo, formando parte de la estructura más rígida de la enzima.

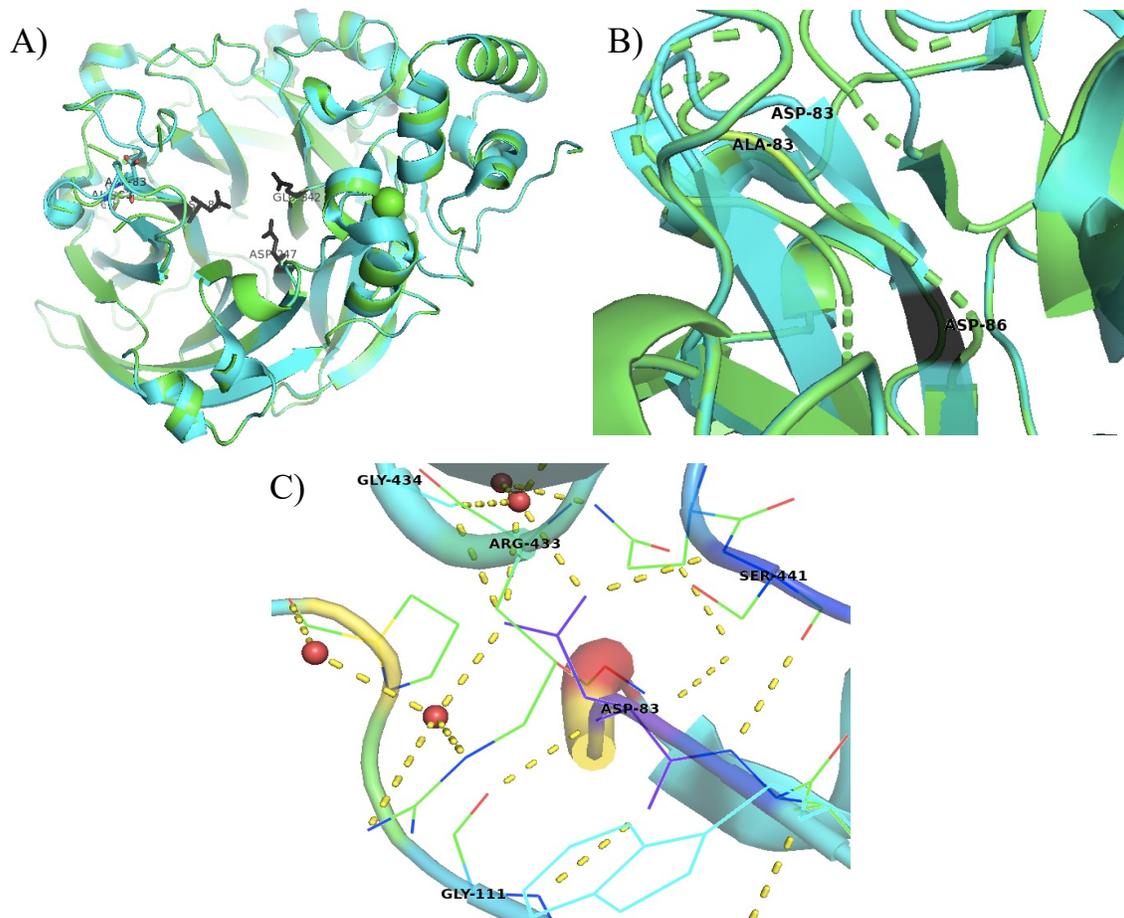
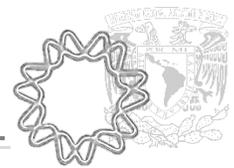


Figura 23. Ubicación de D83A en SacB WT (PDB:1OYG) en relación con los aminoácidos en el sitio activo. Visualización obtenida a través de PyMOL Molecular Graphics System, Versión 2.3.4. A) SacB WT se presenta en color azul y D83A en verde. Los residuos que forman parte de la catálisis se encuentran en color negro. Superposición de ambas estructuras. B) Posición de D83. El cambio por alanina provoca pérdida de la hoja beta. C) Interacciones entre D83 y aminoácidos a 4 Å de distancia.

En la figura 24 se presenta la tasa H/T a 28°C para la variante D83A analizada a 5.5 µg/mL y 1 U/mL. Parece ser que esta variante es más hidrolítica que SacB WT a una concentración 5.5 µg/mL para ambas, sin embargo, hay que considerar que su actividad es menor. Respecto al análisis a 1 U/mL, ambas enzimas presentan el mismo comportamiento a 28°C respecto a la relación de las reacciones de *hidrólisis* y *transferencia*.

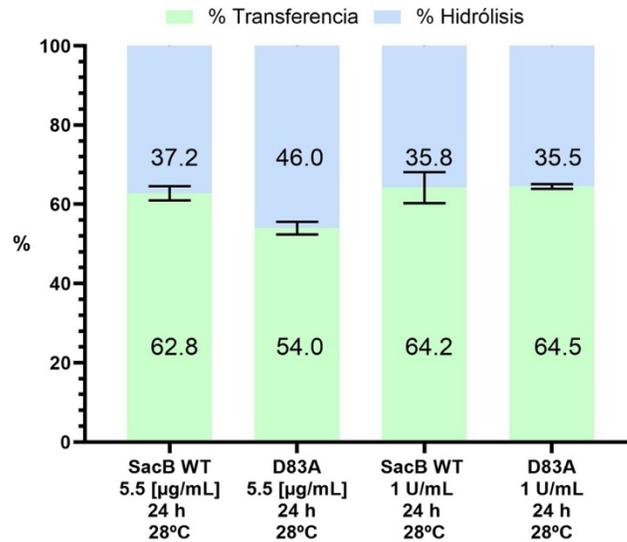
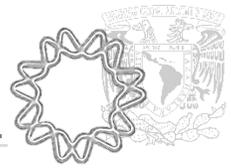


Figura 24. Relación *Hidrólisis/Transfructosilación* de la LS SacB WT y mutante D83A evaluada a 100 g/L de sacarosa y 28°C a las 24h de reacción, empleando 1.0 U/mL (equivalente a 16.5 µg/mL de D83A y 5.5 µg/mL de SacB WT).

En cuanto al análisis de la distribución del peso molecular de levana sintetizada por la variante D83A a 28°C, la figura 25 muestra que, en reacciones con 5.5 µg/mL, que corresponde al equivalente de 1 U/mL de SacB WT, no se obtuvo una producción suficiente para determinar el tipo de especificidad de D83A, por su baja actividad específica. Por esta razón se aumentó la concentración de enzima hasta 16.5 µg/mL (aproximadamente 3 veces más concentrada que SacB WT) para poder alcanzar una actividad 1 U/mL. Como se puede apreciar en la figura 25, en condiciones de 1 U/mL así como en 10 U/mL no se presentan diferencias en la distribución del peso molecular de levana, con respecto a SacB WT. Este comportamiento coincide con la tasa de H/T de cada una de las enzimas a 5.5 µg/mL y 1 U/mL, como se reporta en la figura 24. Estos resultados permiten concluir que D83 participa de manera importante en la estabilidad termodinámica de SacB por lo que, a través de su mutación, resulta complejo poder concluir algo sobre su papel en el SEUF-3. De igual forma, su eventual contribución al sitio de unión podría también estar enmascarada por la necesidad de llevar a cabo el ensayo a una alta concentración de proteína.

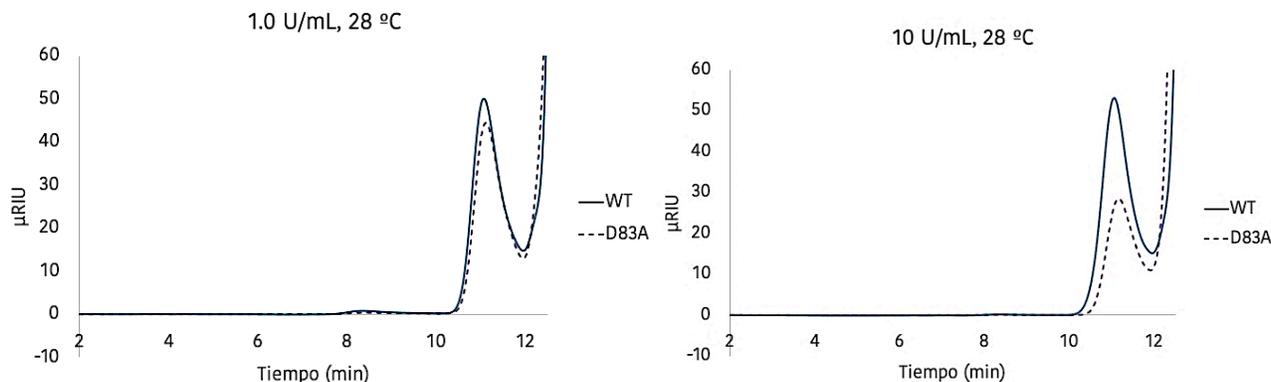
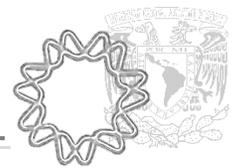


Figura 25. Distribución del peso molecular de la levana producida por SacB WT (línea continua) y mutante D83A (línea punteada), empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa, a 28°C y pH 6. A) Reacción a 1.0 U/mL, equivalente a 5.5 $\mu\text{g/mL}$ de SacB WT y 16.5 $\mu\text{g/mL}$ de D83A, B) Reacción a 10 U/mL, equivalente a 55.0 $\mu\text{g/mL}$ de SacB WT y 165.0 $\mu\text{g/mL}$ de D83A.

7.3 Análisis de la interacción proteína-proteína mediante FRET

Paralelamente a los estudios llevados a cabo mediante la modificación estructural de los sitios SEUF, que hipotéticamente podrían estar involucrados en las interacciones proteína-proteína o proteína-carbohidrato-proteína, se decidió estudiar de manera directa la interacción mediante FRET. Esta técnica permite obtener información sobre las interacciones proteína-proteína en tiempo real y en las condiciones en las que se lleva a cabo la síntesis de levana, además de brindarnos mayor sensibilidad para detectar aquellas IPP débiles o transitorias.

Para dicho estudio se seleccionaron dos fluoróforos: AF546 como donador ($\lambda_{\text{ex}} = 546\text{nm}$, $\lambda_{\text{em,máx}} = 573\text{nm}$) y AF647 como aceptor ($\lambda_{\text{ex}} = 633\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 680\text{nm}$). Este par de marcadores fluorescentes proporcionan un radio de Förster de 74 Å. Para realizar el ensayo de fluorescencia, primero se verificó que la LS SacB WT reaccionara con los fluoróforos seleccionados, probando condiciones que no afectaran la estabilidad y la actividad de la enzima de forma considerable. Al revelar el gel SDS-PAGE (figura 26), notamos que en el marcaje con AF546 se aprecian dos bandas, una de ellas ubicada en una región del gel equivalente a 110 kDa aproximadamente (SacB WT tiene un peso molecular de 52 kDa). No se espera observar una dimerización por medio de SDS-PAGE, debido a las condiciones desnaturizantes del gel. La presencia de esta banda se atribuye a un subproducto de la reacción de marcaje. En algunos casos, el gel puede revelar la formación de dímeros cuando la IPP es fuerte y estable o por la presencia de cisteínas. Sin embargo, este no es el caso de SacB. La diferencia de intensidad de las bandas en los geles se debe a que



el fluoróforo AF546 emite más del doble de los fotones absorbidos, ya que posee un rendimiento cuántico de 0.79 a diferencia de AF647 con un rendimiento cuántico de 0.33. A las enzimas derivatizadas con los fluoróforos AF546 y AF647 se les denominó SacB-AF546 y SacB-AF647, respectivamente.

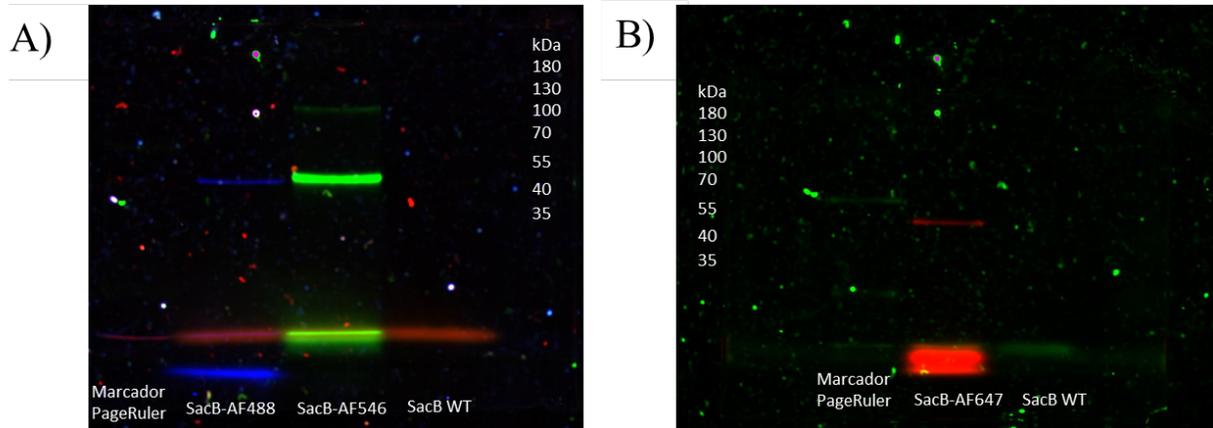


Figura 26. SDS-PAGE revelados por medio de un transiluminador de luz UV, los pesos moleculares se identificaron al revelar el mismo gel en azul de Coomassie. A) Se presenta el marcaje de SacB WT con el fluoróforo AF546 en donde se observaron dos bandas, una a 52 kDa y la otra a 110 kDa aproximadamente. B) Marcaje de SacB WT con AF647. En ambos geles se incluyó SacB WT sin tratamiento de marcaje, así como el marcador de peso molecular PageRuler y se observa fluoróforo no unido en la parte inferior del gel.

Una vez que se corroboró la unión de fluoróforos, se verificó que esa unión covalente, mediada por enlaces amida, no afectara la actividad de SacB WT, además de su especificidad, determinada por la distribución del peso molecular de levana. Como se puede observar en la figura 27, la derivatización de la enzima no afectó la distribución del peso molecular de levana. Sin embargo, la actividad específica de SacB-AF546 se redujo de forma considerable.

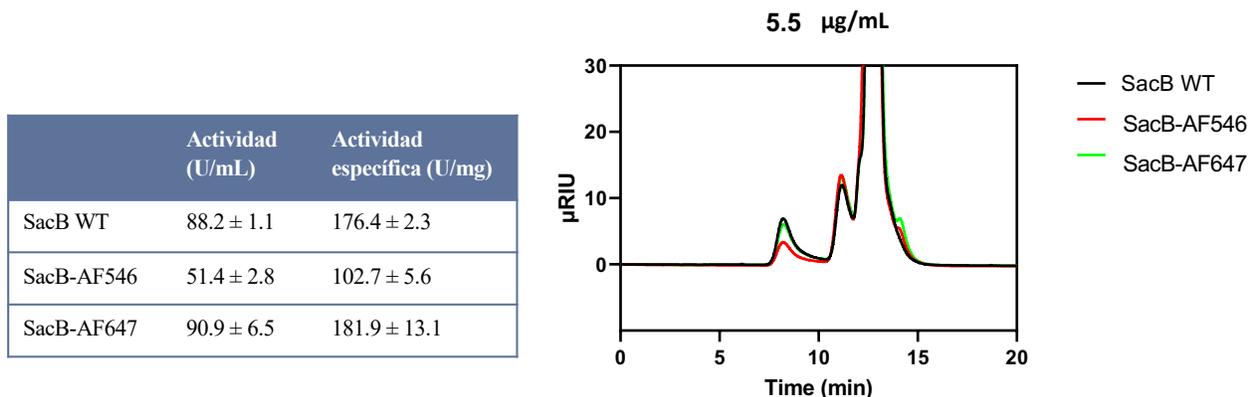
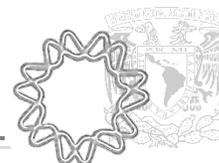


Figura 27. Efecto de la derivatización de SacB con los fluoróforos AF546 (rojo) y AF647 (verde) en el perfil de productos obtenidos empleando 1 U/mL de enzima, 37°C, pH 6. Se observa la misma distribución de peso molecular en un cromatograma de GPC. En la tabla de la izquierda se reporta la actividad específica global de cada una de las variantes de SacB marcadas con el fluoróforo respectivo.



Al llevar a cabo el ensayo en presencia de SacB-AF546 como donador y SacB-AF647 como aceptor en una proporción 1:1, se detectó una disminución de fluorescencia como se muestra en la figura 28.A. Estos resultados sugieren que existe una interacción entre ambas proteínas derivatizadas. Para saber si las IPP que se establecen durante la reacción, están mediadas por la presencia de oligómeros de fructosa, se realizó la prueba en presencia y ausencia de sacarosa. Como podemos observar en la figura 28.B, la interacción es independiente de la presencia de sacarosa en el medio (o los productos de reacción) ya que, en ambos casos, la fluorescencia del donador disminuye de igual manera en las dos condiciones de ensayo. Estos resultados representan la primera posible evidencia de la existencia de IPP en SacB, mismas que existen con o sin participación de intermediarios (sacarosa o cadenas de fructosa).

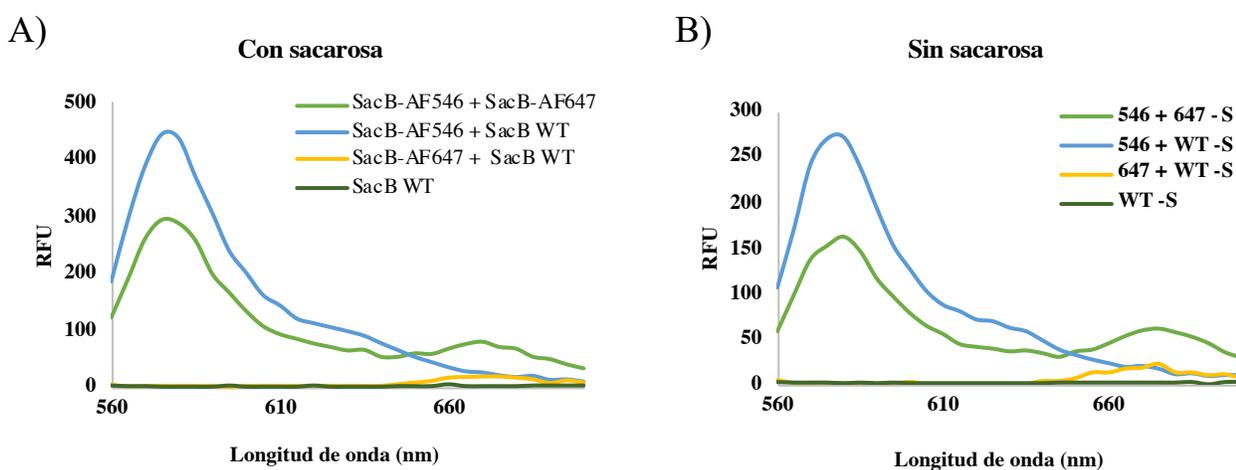
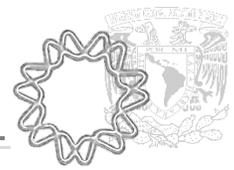


Figura 28. Espectros de emisión de fluorescencia de AF546-SacB WT, AF647-SacB WT y mezcla. La longitud de onda de excitación fue de 546 nm, El tiempo de integración se mantuvo constante y fue de 20 μ s. A) Análisis con sacarosa 100 g/L B) Ensayo sin presencia de sustrato.

Cabe mencionar que no se encontraron evidencias que permitan concluir el tipo de oligomerización que presenta SacB (dímero, trímero, multímero) debido a que esa información no la podemos obtener mediante este ensayo. Además, debemos considerar que *Bs*-SacB tiene 44 lisinas en su estructura, de las cuales solo 4 son lisinas enterradas y 40 están expuestas al solvente (de acuerdo al servidor NetSurfP -Protein Surface Accessibility and Secondary Structure Predictions-), por lo que no es posible obtener una relación estequiométrica, así como una posible zona de interacción. Sin embargo, con estos resultados logramos obtener una evidencia directa de una posible IPP, lo cual puede contribuir a la explicación de la influencia de la concentración de enzima en el mecanismo de reacción.

Con la finalidad de explorar más a profundidad el comportamiento de *Bs*-SacB, se realizó un análisis conservando la concentración de donador y modificando, proporcionalmente, la concentración de aceptor.



Al igual que en el ensayo anterior, primero se verificó que estas condiciones no modificaran la distribución del peso molecular de levana (figura 29). Al realizar las mediciones de fluorescencia en presencia de donador (SacB-AF546) y aceptor (SacB-AF647) en proporciones 1:0.5, 1:1, 1:2 y 1:4 (figura 30), obtuvimos el comportamiento esperado, en el que la señal de fluorescencia se ve disminuida proporcionalmente con el aumento de la concentración de aceptor.

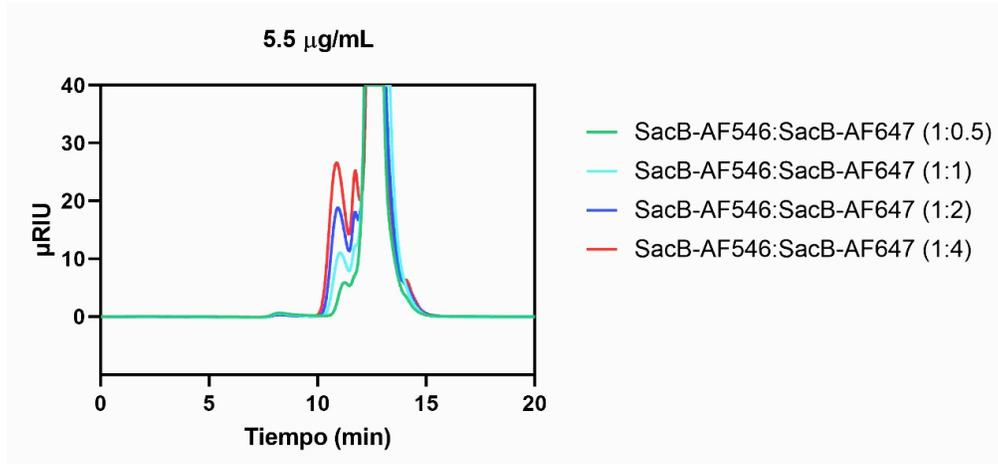


Figura 29. Análisis de la distribución del peso molecular de levana en condiciones de ensayo FRET, a diferentes proporciones de SacB-AF647 (aceptor). Reacciones en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6, sacarosa 100 g/L, 37°C, 60 min. Las concentraciones de enzima por proporción fueron las siguientes 41.3 $\mu\text{g/mL}$ (1:0.5), 55.0 $\mu\text{g/mL}$, (1:1), 82.5 $\mu\text{g/mL}$ (1:2) y 137.5 $\mu\text{g/mL}$ (1:4).

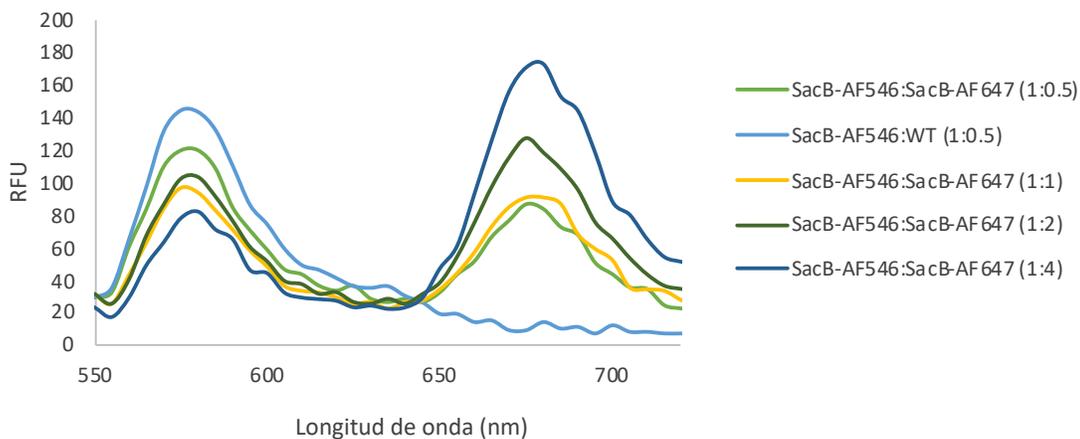
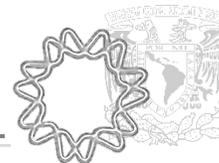


Figura 30. Espectros de emisión de fluorescencia de AF546-SacB en presencia de diferentes proporciones de AF647-SacB (1:0.5, 1:1, 1:2 y 1:4). La longitud de onda de excitación fue de 546 nm. El tiempo de integración se mantuvo constante y fue de 20 μs .



7.4 Análisis estructural

Los resultados obtenidos en el ensayo de FRET, sugieren que existe una IPP presente en *Bs-SacB*. Con la finalidad de explorar y estudiar estas posibles interacciones, se utilizó el servidor ClusPro, como herramienta adicional al estudio de las IPP. Este servidor proporciona cuatro tipos de interpretaciones diferentes, de acuerdo al conocimiento experimental de las IPP. Si no se tiene información previa acerca de la IPP de las proteínas de interés, se propone utilizar la interpretación “equilibrada” que proporciona información considerando todas las contribuciones energéticas de la interacción. Las demás interpretaciones, deben relacionarse con resultados experimentales, por ejemplo, si se ha observado que el receptor y el ligando se separan cuando se someten a una fuerza iónica *in vitro*, la interacción probablemente será favorecida electrostáticamente. En cambio, si las dos proteínas de interacción tienden a separarse cuando se someten a un ambiente de disolventes apolares, es probable que estén separados por interacciones hidrofóbicas.

Este servidor considera la contribución energética de atracción y repulsión, la energía electrostática y la energía libre generada por desolvatación para obtener una puntuación ponderada que representa la energía de interacción de las proteínas acopladas. De acuerdo con nuestros estudios y conocimiento de la enzima se sabe que, factores como la fuerza iónica y el uso de disolventes orgánicos, modifican la especificidad de la reacción. Sin embargo, no sabemos si esos factores contribuyen a la IPP o a la estructuración del polímero como tal. Por lo cual, se decidió iniciar este estudio con el análisis de la interpretación “equilibrada”. Esta interpretación asume que existe un acoplamiento favorecido por la forma de las proteínas además de una complementariedad electrostática⁴⁴. De acuerdo a los valores de IRMSD (Interface Root Mean Square Deviation) para cada par de las 1000 estructuras, se elige la que tiene el mayor número de “vecinos” dentro de un radio de 9Å. La estructura seleccionada se define como el centro del primer grupo, con una determinada energía de interacción, y así sucesivamente. En la tabla 7, se presentan los resultados de los primeros tres grupos (0-2) para cada interpretación.

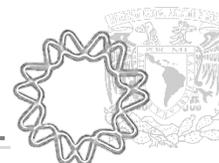
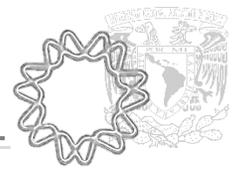


Tabla 7. Resultados de acoplamiento proteína-proteína en ClusPro.

Equilibrada			
Grupo	Miembros	Representante	Puntuación ponderada (kcal/mol)
0	167	Centro	-430.6
		Menor energía	-528.8
1	112	Centro	-449.4
		Menor energía	-503.6
2	88	Centro	-489.3
		Menor energía	-512.2
Electrostática Favorecido			
Grupo	Miembros	Representante	Puntuación ponderada (kcal/mol)
0	185	Centro	-696.3
		Menor energía	-748.6
1	108	Centro	-558.8
		Menor energía	-637.3
2	77	Centro	-746.0
		Menor energía	-746.0
Favorecida hidrofóbico			
Grupo	Miembros	Representante	Puntuación ponderada (kcal/mol)
0	254	Centro	-377.2
		Menor energía	-423.8
1	164	Centro	-485.0
		Menor energía	-485.0
2	107	Centro	-386.1
		Menor energía	-386.1
VdW + Elect			
Grupo	Miembros	Representante	Puntuación ponderada (kcal/mol)
0	81	Centro	-315.5
		Menor energía	-380.1
1	70	Centro	-330.0
		Menor energía	-355.2
2	62	Centro	-315.3
		Menor energía	-363.4

Los modelos resultantes de cada grupo se analizaron por PYMOL. Los modelos se presentan en las figuras 31-34. Se indican las zonas por colores de cada sitio externo de unión a fructosa (SEUF-1 rosa; SEUF-2 verde; SEUF-3 morado).

Analizando el grupo 0 (figura 31) del modelo equilibrado, observamos que las IPP predichas son cercanas a los SEUF-1 y SEUF-2. El grupo 0 no es el que presentó menor energía de interacción, pero sí es el que presenta el mayor número de miembros (167) por lo que es más probable que la IPP se presente con ese modelo de interacción. Dentro de los pares de aminoácidos, destaca la interacción entre K285-D403 y K329-D438, con una interacción de tipo ion-dipolo y una energía de interacción de -35.12 y -34.43 kcal/mol respectivamente. También encontramos a T40-F405, mediante un enlace de hidrógeno de -2.5 kcal/mol y a una distancia de 2.81 Å. Estas participaciones resultan importantes debido a las fuertes



energías de interacción, poco distanciamiento y alta frecuencia. Resulta interesante que los aminoácidos D438 y F405 se encuentran participando en una interacción detectada en el cristal de la mutante S164A (figura 35) como se muestra más adelante. Sin embargo, el aminoácido con el que interaccionan en la simulación de acoplamiento no concuerda con los del cristal. Un cambio importante que sufre el cristal en la variante S164A es el cambio de posicionamiento del bucle en donde participa F405, razón por la que no coincide el par de interacción.

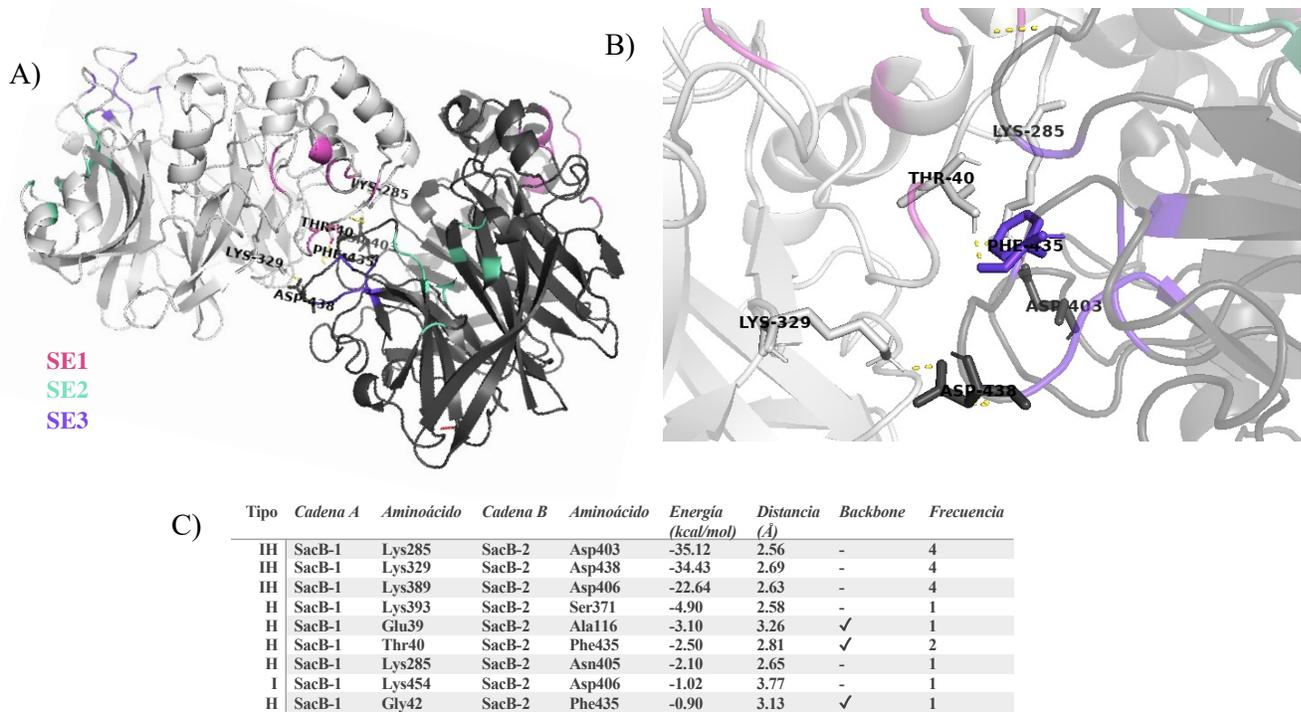


Figura 31. Acoplamiento molecular proteína-proteína. Interpretación “equilibrada”. Modelo del **grupo 0**. La cadena A se encuentra en color blanco y la cadena B en color negro. Los SEUF se encuentran indicados por el color correspondiente A) Presenta el modelo estructural de la interacción del grupo 0 de 167 miembros. B) Acercamiento a la zona de interacción. C) Tabla de contribuciones energéticas por cada par de aminoácidos que interactúa en el modelo. Los datos se obtuvieron por medio de MOE.

Para el grupo 1 (figura 32), encontramos nuevamente la participación de D403 y D438, pero con otros aminoácidos como pares de interacción, ya que se observa que la IPP se lleva a cabo en otra región de SacB cercana a SEUF-1 y alejada del sitio activo. Otro aminoácido importante es P404 que también aparece en el dímero de S164A. Cabe destacar que F435 forma parte del SEUF-3, por lo que podría estar participando en la interacción con fructosa, así como en la IPP.

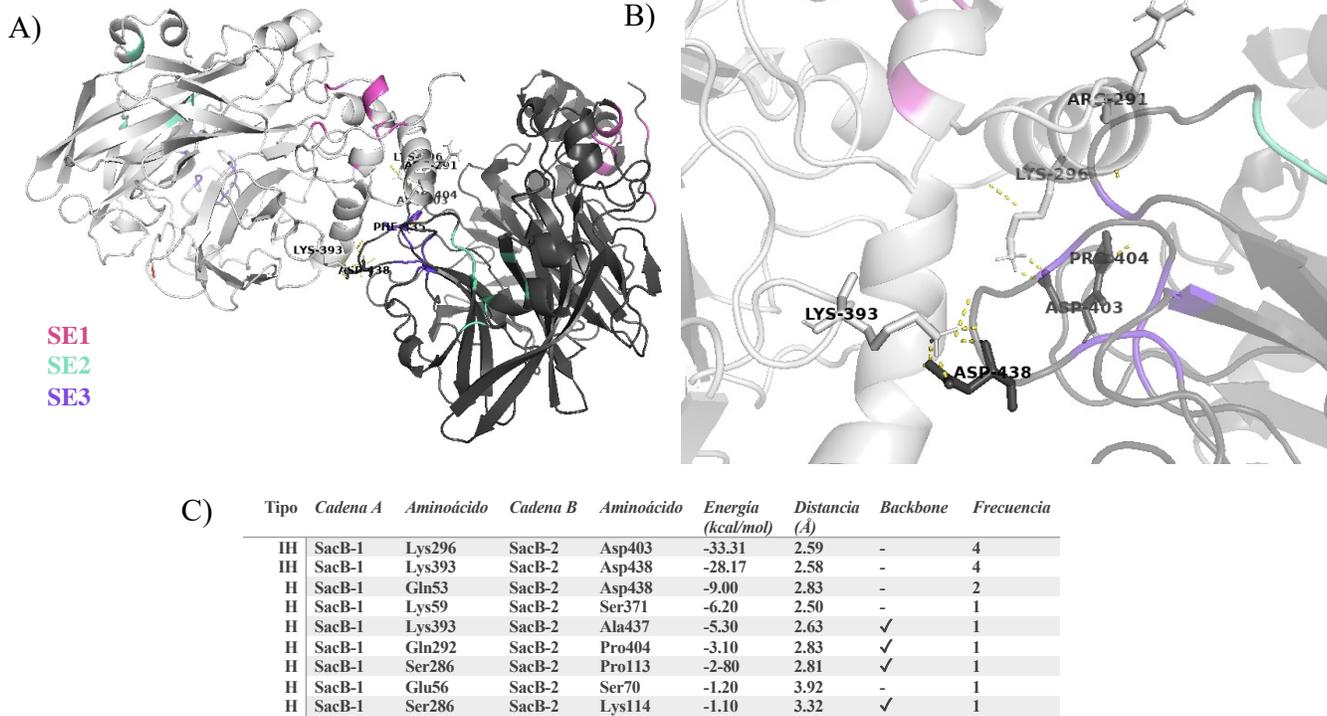
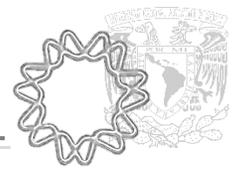


Figura 32. Acoplamiento molecular proteína-proteína. Interpretación “equilibrada”. Modelo del **grupo 1**. La cadena A se encuentra en color blanco y la cadena B en color negro. Los SEUF se encuentran indicados por el color correspondiente A) Presenta el modelo estructural de la interacción del grupo 1 de 112 miembros. B) Acercamiento a la zona de interacción. C) Tabla de contribuciones energéticas por cada par de aminoácidos que interactúa en el modelo. Los datos se obtuvieron por medio de MOE.

El grupo 2 (figura 33), incluye la participación de cuatro enlaces ion-dipolo con energías de interacción y distancias favorables, así como once enlaces de hidrógeno con aminoácidos vecinos a los sitios SEUF-1 y SEUF-2. La estructura resultante de la IPP muestra una interacción muy cerca del bolsillo del sitio activo, lo cual podría coincidir con la hipótesis de que la interacción resulta en el secuestro de la cadena de fructosa en crecimiento.

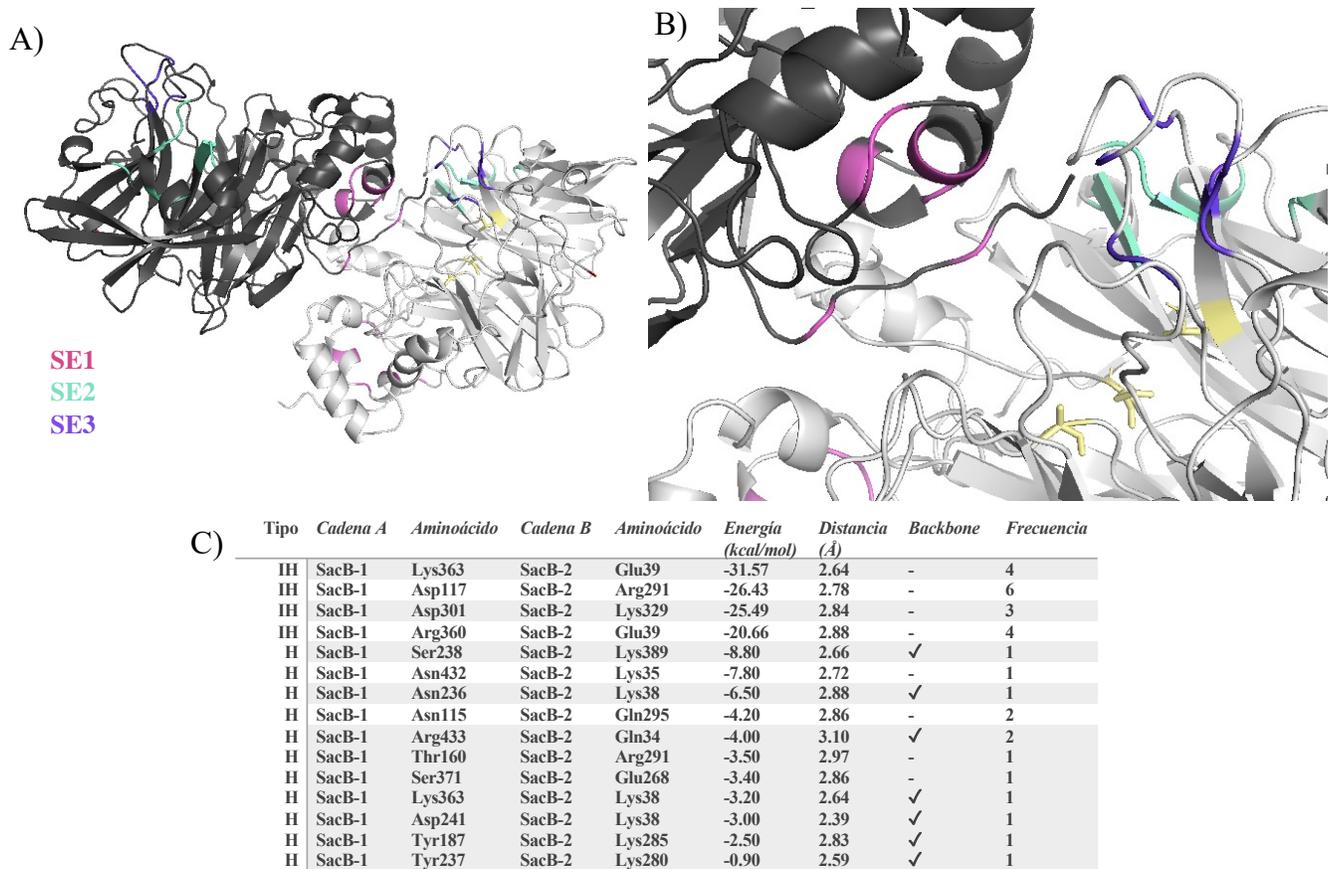
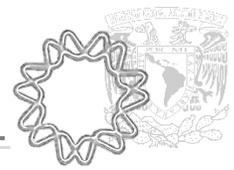


Figura 33. Acoplamiento molecular proteína-proteína. Interpretación “equilibrada”. Modelo del **grupo 2**. La cadena A se encuentra en color blanco y la cadena B en color negro. Los SEUF se encuentran indicados por el color correspondiente y los aminoácidos que conforman el sitio catalítico se encuentran en color amarillo A) Presenta el modelo estructural de la interacción del grupo 2 de 88 miembros. B) Acercamiento a la zona de interacción. C) Tabla de contribuciones energéticas por cada par de aminoácidos que interactúa en el modelo. Los datos se obtuvieron por medio de MOE.

En estos análisis destaca la participación de las fuerzas hidrofóbicas en la interacción proteína-proteína. Al analizar el cluster 0 (figura 34), con 254 miembros y -423.8 kcal/mol, encontramos la participación de los aminoácidos F435, P404, R433, A437 y G184, los cuales coinciden con la IPP visualizada en el cristal de S164A (figura 35). Después del primer acercamiento al análisis computacional del acoplamiento molecular entre SacB, observamos que existe un aminoácido (F435) que se repite en los modelos resultantes de IPP. Además, F435 se encuentra en el SEUF-3 y en el cristal obtenido de S164A, formando parte de la zona de IPP (figura 35.A). Derivado de estas observaciones, resulta de sumo interés construir la mutante F435A.

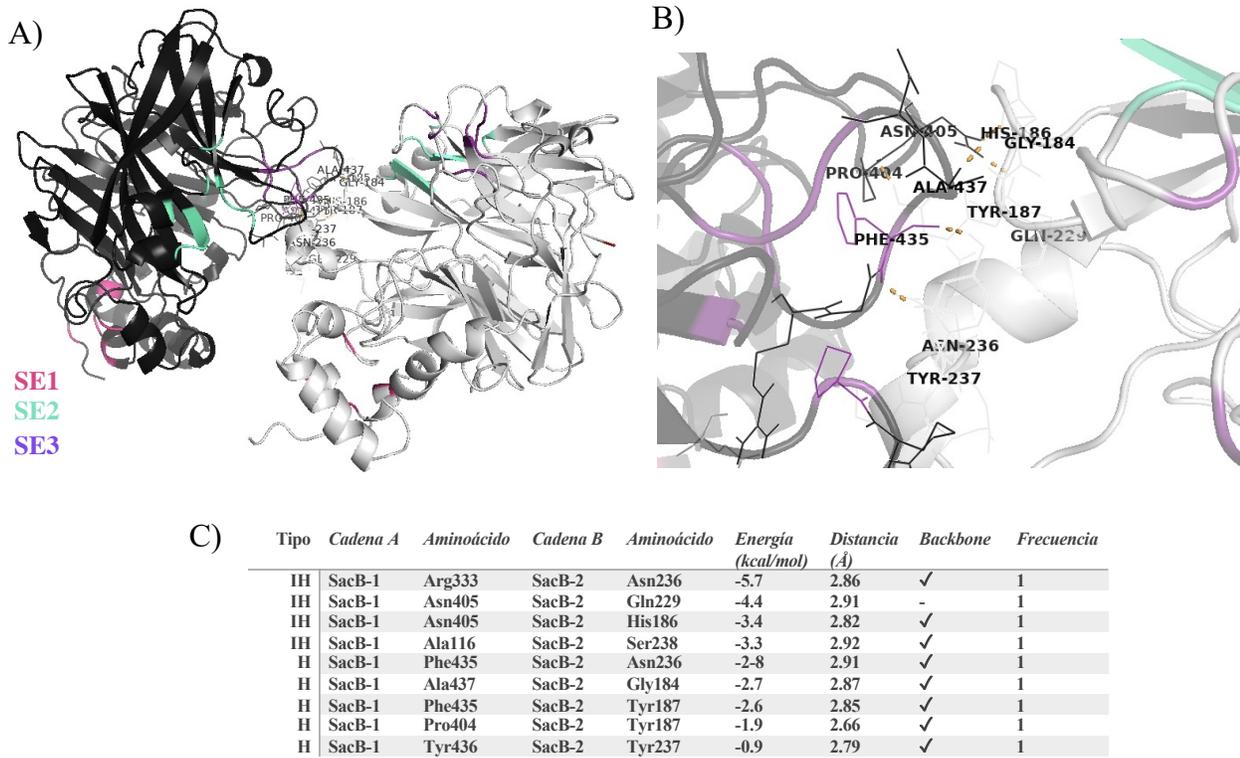
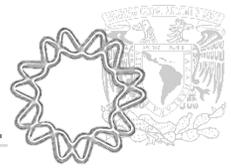


Figura 34. Acoplamiento molecular proteína-proteína. Interpretación por interacciones hidrofóbicas. Modelo del grupo 0. La cadena A se encuentra en color blanco y la cadena B en color negro. Los SEUF se encuentran indicados por el color correspondiente. A) Presenta el modelo estructural de la interacción del grupo 0 de 254 miembros. B) Acercamiento a la zona de interacción. C) Tabla de contribuciones energéticas por cada par de aminoácidos que interactúa en el modelo. Los datos se obtuvieron por medio de MOE.

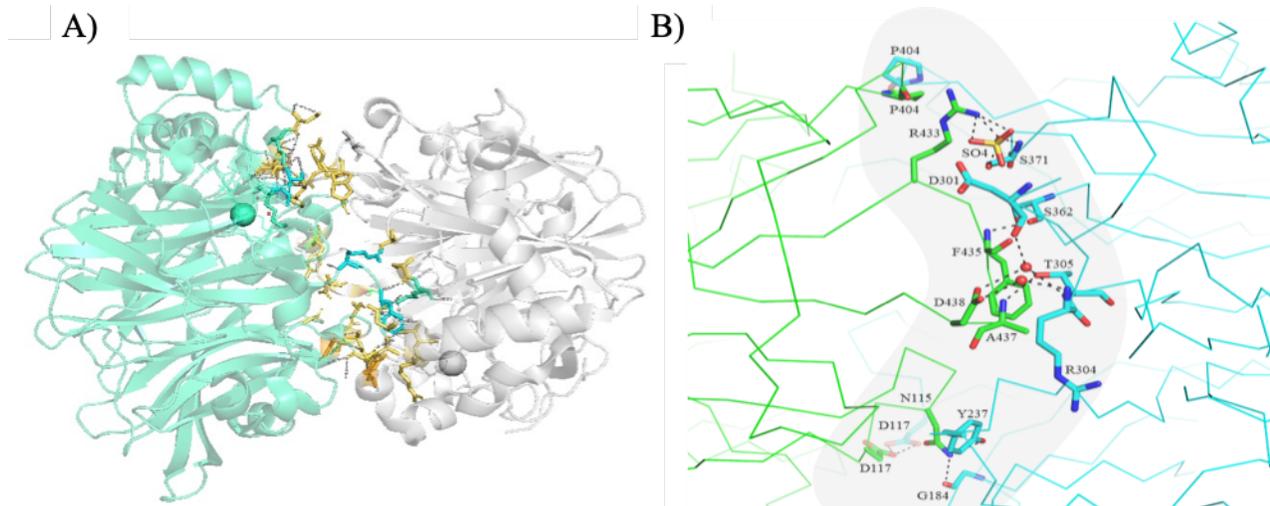


Figura 35. S164A. A) Cristal de variante S164A PDB:6PWQ B) Se muestra sombreado un primer plano de las interacciones de empaque del cristal. La cadena A (verde) y B (azul) con residuos que interactúan se muestran como palos. Los enlaces de hidrógeno se muestran como líneas discontinuas negras. El ion sulfato está en barras amarillas y las moléculas de agua están en esferas rojas.



Al analizar los cristales 6PWQ y 6VHQ (figura 36), observamos que los aminoácidos encontrados en los subsitios +3 y +4, tales como D117, G184 y Y237, se encuentran participando en dos situaciones. De acuerdo a 6PWQ, estos aminoácidos forman parte de la IPP, y según 6VHQ, contribuyen a los subsitios de unión a levana +3 y +4. Esto nos permite especular que la IPP impide la interacción de la levana en crecimiento con los subsitios de unión a sustrato, interacciones necesarias para la producción de levana de alto peso molecular. Raga y cols (2021), obtuvieron las mutantes D117A y Y237A. Tras realizar las mutaciones y obtener el perfil de producto, destacaron el cambio de especificidad de la enzima, ya que en el caso de Y237A se produjo levana exclusivamente de alto peso molecular (tabla 8). Este aminoácido, además de pertenecer al subsitio +4, también participa en la IPP de acuerdo al cristal 6PWQ, por lo que su modificación por alanina provoca la disminución de las IPP, lo que conduce a levana de alto peso molecular, lo que concuerda con la hipótesis planteada. Sin embargo, es importante definir si este efecto se debe a la interrupción de la interacción de levana con esos aminoácidos del subsitio +3 y +4 o bien a la interrupción de las IPP.

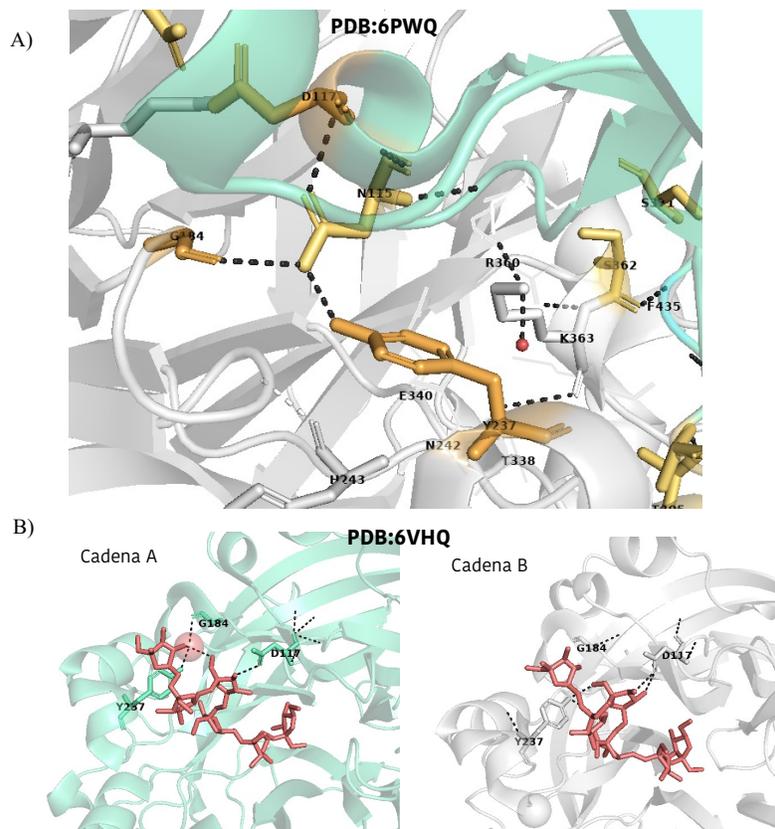


Figura 36. A) Cristal de variante S164A (PDB:6PWQ). Se presenta en azul la cadena A y en blanco la cadena B de SacB. Los aminoácidos en amarillo forman parte de la IPP, como D117, G184 y Y237. B) Cristal de SacB con



cadena de oligosacárido de 6 fructosas (PDB:6VHQ). Se muestran los enlaces de hidrógeno entre Y237, D117 y G184 con el oligosacárido en cadena A y B de la unidad asimétrica.

Tabla 8. Mutantes obtenidas a partir de SacB y su efecto en la síntesis de levana.

Variante de SacB	Efecto en la síntesis de levana	Referencia
D83A	Disminuye la estabilidad de la enzima. El perfil H/T y la distribución del peso molecular de la levana no cambia respecto a SacB WT a 28°C.	-
E275A	Se favorece la síntesis de levana de alto peso molecular en condiciones estándar. H/T permanece sin cambio respecto a SacB WT.	-
K148A	Se favorece la síntesis de levana de alto peso molecular y la reacción de transferencia en condiciones estándar.	-
Y187A	Distribución bimodal del peso molecular de levana.	23
I341V	Sin cambios respecto a SacB WT.	3
Y429N	Se favorece considerablemente la reacción de hidrólisis. Produce FOS en lugar de levana de alto peso molecular.	7
Subsitió -1		
S164A	Se favorece la síntesis de levana de bajo peso levana en condiciones estándar. A 5.5 µg/mL la distribución es bimodal.	11
R246A	Inactiva a la enzima	7
D247A	Inactiva a la enzima	7
Subsitió +1		
R360K/S/H	Aumenta la reacción de hidrólisis. R360H produce levana con 60% menos transfructosilación.	7
Subsitió +2		
N242A	Distribución bimodal. Se favorece la síntesis de levana de alto peso molecular en condiciones estándar. Aumenta la reacción de hidrólisis respecto a SacB WT.	23
K363A	Se produce únicamente de levana de alto peso molecular en condiciones estándar. Aumenta la reacción de hidrólisis respecto a SacB WT.	23
H243L	Se favorece la síntesis de levana de alto peso molecular en condiciones estándar.	3
Subsitió +3		
D117A	Se favorece la síntesis de levana de alto peso molecular en condiciones estándar.	23
F182Y	Distribución bimodal del peso molecular de levana.	23
F182W	Distribución bimodal del peso molecular de levana.	23
F182A	Se produce únicamente de levana de alto peso molecular en condiciones estándar.	23
Subsitió +4		
Y237A	Se produce únicamente de levana de alto peso molecular en condiciones estándar.	23

Estos resultados constituyen un primer acercamiento al estudio de las IPP por medio de métodos computacionales y observaciones experimentales, que requieren de una mayor y más profunda exploración, antes de poder llegar a conclusiones contundentes, y poder así proponer una función probable de las interacciones en conjunto con el papel de los subsitió de unión a fructosa.



Además de estas consideraciones sobre la estructura de la enzima que modifican su especificidad relativa al peso molecular de levana, también es importante tomar en cuenta las características y el comportamiento del polímero en solución para entender el mecanismo de elongación. Recientes estudios de MALS y de espectroscopia realizados con levana producida por *Bs-SacB* en diversas condiciones, permitieron deducir que el tamaño de la levana de alto peso molecular es de 35,000 kDa¹⁸, diez veces mayor al peso molecular reportado anteriormente de 3500 kDa. De acuerdo a Bouallegue⁴⁷, mediante estudios de LALS/RALS, reportan un peso de 20 MDa para la levana sintetizada por *Bacillus subtilis* AF17, cercano al peso molecular de la levana de *B. subtilis* 168. Mediciones y observaciones sobre las partículas de levana, llevan a la hipótesis de que éstas forman agregados de un tamaño de aproximadamente 140 nm, independientemente del peso molecular. El hecho de que la levana colapse en este tipo de agregados, podría también ser un factor que influye en el mecanismo de polimerización de la enzima productora. Por lo que las condiciones de reacción anteriormente analizadas, podrían también afectar la estructura del polímero en la solución, siendo este un factor adicional que influye en su alargamiento.

7.5 Propuesta de mecanismo de elongación de la levana por *Bs-SacB*

Hasta el momento se han realizado una serie de estudios sobre el comportamiento de *Bs-SacB* que pueden contribuir al entendimiento del mecanismo de alargamiento del polímero que produce. Nuestros datos sugieren que existe una IPP independiente de la presencia de sustrato. Se sabe que el producto colapsa en agregados al alcanzar una concentración crítica¹⁴. Esos agregados se auto ensamblan para formar una nanopartícula. Las nanopartículas de levana de bajo y alto peso molecular tienen el mismo tamaño¹⁸. Por otro lado, se conoce que *SacB* posee aminoácidos que son identificados en la unión a sustrato y que se agrupan en subsitios denominados -1, +1, +2, +3, +4^{7,17,23}. Los primeros subsitios (-1, +1, +2) participan en la elongación de la levana, ya que su modificación da como resultado levanas con grados de polimerización cortos, contrario a lo que sucede cuando se mutan aminoácidos que participan en los subsitios de unión +3 y +4, que cambian la especificidad de la enzima hacia la síntesis de levana de alto peso molecular. De acuerdo al cristal de la variante S164A, los residuos de los subsitios +3 y +4 también forman parte de la posible IPP. Además, se han detectado sitios externos de unión a fructosa, por medio de estudios computacionales¹¹ y cristalografía²³. Al realizar mutaciones sitio-dirigidas en estos sitios, se obtienen enzimas que sintetizan preferentemente levana de alto peso molecular.



Con esta serie de resultados se propone un mecanismo de acuerdo a la característica del producto sintetizado, ya sea levana de bajo o alto peso molecular (figura 37). La levana de alto peso molecular se sintetiza gracias a la interacción del producto con los aminoácidos desde el subsitio -1 hasta la superficie de la enzima en donde solo existe la participación de moléculas de agua y la levana puede elongarse libremente hasta alcanzar un grado de polimerización que provoca su colapso en una nanopartícula que formará parte de la levana de alto peso molecular (escenario de una baja concentración de enzima o enzima inmovilizada). La levana de bajo peso molecular se produce cuando se presentan IPP transitorias que imposibilitan la producción de levana de alto peso molecular, ya que impide la estructuración libre del polímero en solución. Además, en las IPP transitorias intervienen los SEUF impidiendo el alargamiento de la cadena de fructosas, por lo que la levana colapsa en agregados de bajo peso molecular (es el caso cuando existe una alta concentración de enzima).

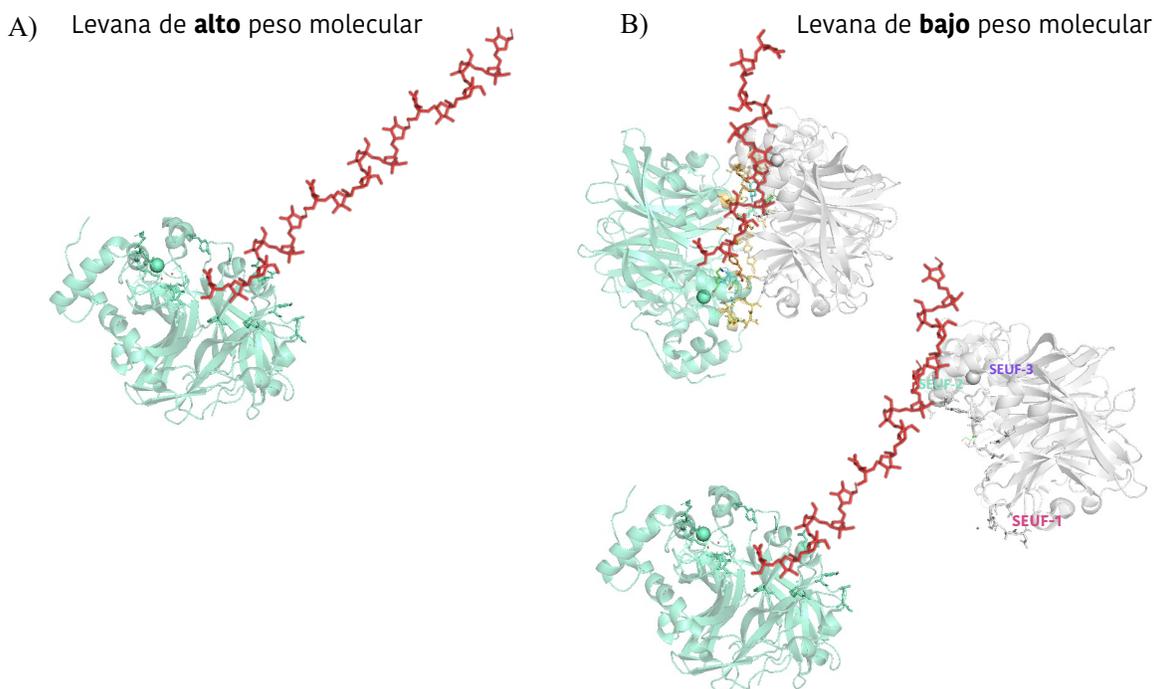
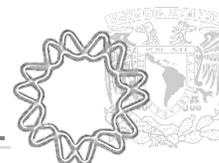


Figura 37. Esquema de la propuesta del mecanismo de elongación de la levana de alto peso molecular (A) y de bajo peso molecular (B).



8. Conclusiones

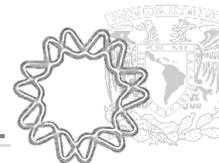
Se demostró que las modificaciones en la superficie de SacB, que incluyen la eliminación de una etiqueta de histidinas, así como mutaciones sencillas y dobles, modifican la especificidad de la enzima alterando el peso molecular del polímero que sintetiza. Estas modificaciones superficiales pueden traer como resultado el impedimento de interacciones proteína-proteína necesarias para interrumpir el mecanismo de elongación de la levana.

Usando el ensayo de FRET, se obtuvo por primera vez y de manera directa en el estudio del comportamiento de la LS de *B. subtilis* posibles evidencias de las IPP. Este resultado puede explicar la influencia de la concentración de enzima y de otros parámetros en la especificidad de reacción, ya que cualquier condición que las impide, da lugar a la síntesis de levana de alto peso molecular.

Se encontró que la etiqueta His₆ de SacB WT, modifica la distribución de pesos moleculares de levana observada a distintas concentraciones de enzima. Este resultado apoya la hipótesis de IPP que están involucradas en la especificidad de SacB, mismas que se ven afectadas por cualquier modificación estructural de la enzima, particularmente cuando se hacen extensiones a la estructura primaria. La ausencia de la etiqueta favorece las interacciones dando lugar a la síntesis de una mayor proporción de levana de bajo peso molecular con respecto a SacB WT con la extensión de histidinas.

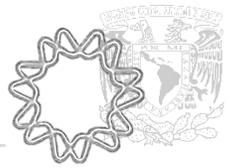
Se obtuvieron y analizaron 4 mutantes de la LS SacB de *Bacillus subtilis* 168, diseñadas a partir de estudios de acoplamiento molecular entre SacB WT, S164A y fructosa. La mutante K148A que forma parte del SEUF-2, contribuye a la producción preferente de levana de alto peso molecular, tal como se esperaba, ya que este residuo estaría involucrado en un sitio de posible interacción proteína-proteína que conlleva a una probable competencia por las cadenas de fructosa en crecimiento durante la polimerización. Este también es el caso de la mutante E275A perteneciente al SEUF-1, aunque este aminoácido parece participar en el subsitio con menor contribución que K148A, probablemente como resultado de una menor energía de unión.

Contrario a lo esperado, la doble mutante K148A/D145A no contribuye a un incremento en la proporción de síntesis de levana de alto peso molecular, sino que pareciera compensar parcialmente el efecto de la



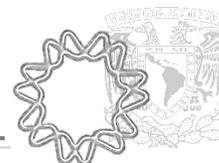
mutación K148A. Este comportamiento puede atribuirse a una redistribución de los residuos aledaños. Estudios enfocados en estos residuos permitirán comprender mejor el papel que SEUF-2 desempeña en el mecanismo de reacción.

Se encontró que la mutante D83A que forma parte del SEUF-3, es importante en la estabilidad termodinámica de la proteína, por lo que su caracterización enzimática requirió disminuir la temperatura a 28°C a la que se observó que no existen diferencias considerables entre el comportamiento de SacB WT.



9. Perspectivas

- Elucidar el papel que desempeñan los sitios externos de unión a fructosa (SEUF-1 – SEUF-3).
- Determinar el tipo principal de interacción proteína-proteína que presenta SacB (hidrofóbicas, electrostáticas, Van der Waals...)
- Obtener la mutante F435 para corroborar su participación en las IPP.
- Obtener variantes de SacB con todo el SEUF alterado y realizar pruebas de IPP.
- Realizar estudios de especificidad de producto de la enzima sin etiqueta de histidinas.
- Calcular la constante de afinidad (K_d) a partir de estudios FRET.
- Estudiar las posibles IPP en otras LS.
- Comprobar mediante un segundo tipo de ensayo la interacción proteína-proteína.



10. Referencias

1. Öner, E. T., Hernández, L. & Combie, J. (2016). Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnol. Adv.* 34, 827–844.
2. Ortiz-Soto, M. E. *et al.* (2017). Impaired coordination of nucleophile and increased hydrophobicity in the +1 subsite shift levansucrase activity towards transfructosylation. *Glycobiology* 27, 755–765.
3. Rivera, M., López-Munguía, A., Olvera, C., Rudiño-Piñera, E. & Ortiz-Soto, M. E. (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Eng. Des. Sel.* 21, 589–595.
4. Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Miranda-Molina, A., Rodríguez-Alegría, M. E. & Munguía, A. L. (2015). *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydr. Polym.* 132, 338–344.
5. Wuerges, J. *et al.* (2015). The crystal structure of *Erwinia amylovora* levansucrase provides a snapshot of the products of sucrose hydrolysis trapped into the active site. *J. Struct. Biol.* 191, 290–298.
6. Martínez-Fleites, C. *et al.* (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem. J.* 390, 19–27.
7. Ortiz-Soto, M. E., Porras-Domínguez, J., 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. *Carbohydr. Polym.* 219, 130-142.
8. Raga-Carbajal, E. *et al.* (2016). Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Glycobiology*. 26, 377–385.
9. Tanaka, T., Oi, S. & Yamamoto, T. (1979). Synthesis of levan by levansucrase: Some factors affecting the rate of synthesis and degree of polymerization of levan. *J. Biochem.* 85, 287–293.
10. Castillo, E. & López-Munguía, A. (2004). Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. *J. Biotechnol.* 114, 209–217.
11. Ortiz-Soto, M. E. *et al.* (2020). Implications of the mutation S164A on *Bacillus subtilis* levansucrase product specificity and insights into protein interactions acting upon levan synthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 161, 898–908.



12. Raga-Carbajal, E., López-Munguía, A., Alvarez, L. & Olvera, C. (2018). Understanding the transfer reaction network behind the non-processive synthesis of low molecular weight levan catalyzed by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Sci. Rep.* 8, 1–10.
13. Nester, K. & Plazinski, W. (2020). Conformational properties of inulin, levan and arabinan studied by molecular dynamics simulations. *Carbohydr. Polym.* 240, 116266.
14. González-Garcinuño, Á. *et al.* (2019). Differences in levan nanoparticles depending on their synthesis route: Microbial vs cell-free systems. *Int. J. Biol. Macromol.* 137, 62–68.
15. Siqueira, E. C., Rebouças, J. de S., Pinheiro, I. O. & Formiga, F. R. (2020). Levan-based nanostructured systems: An overview. *Int. J. Pharm.* 580.
16. Chambert, R., Treboul, G. & Dedonder, R. (1974). Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 41, 285–300.
17. Meng, G. & Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nat. Struct. Biol.* 10, 935–941.
18. Morales, L.A. (2020). Influencia de diversos parámetros fisicoquímicos y estructurales en el peso molecular de la levana sintetizada por la levansacarasa de *Bacillus subtilis* 168. (Tesis de maestría). Instituto de Biotecnología, UNAM. México.
19. Tanaka, T., Oi, S. & Yamamoto, T. (1980). The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase. *J. Biochem.* 87, 297–303.
20. Chambert, R. & Petit-Glatron, M. F. (1989). Study of the effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Carbohydr. Res.* 191, 117–123.
21. Chambert, R. & Petit-Glatron, M. F. (1993). Immobilisation of levansucrase on calcium phosphate gel strongly increases its polymerase activity. *Carbohydr. Res.* 244, 129–136.
22. Meng, G. & Fütterer, K. (2008). Donor substrate recognition in the raffinose-bound E342A mutant of fructosyltransferase *Bacillus subtilis* levansucrase. *BMC Struct. Biol.* 8, 1–12.
23. Díaz-vilchis, E. R. A., Rojas-trejo, S. P., Rudiño-piñera, E. & Fructan, K. (2021). The molecular basis of the nonprocessive elongation mechanism in levansucrases. *J Biol Chem.* 296, 100178.
24. Wuerges, J. *et al.* (2015). The crystal structure of *Erwinia amylovora* levansucrase provides a snapshot of the products of sucrose hydrolysis trapped into the active site. *J. Struct. Biol.* 191, 290–298.
25. Ortiz-Soto, M. E., Porrás-Domínguez, J. R., Seibel, J. & López-Munguía, A. L. M. (2019). A close



- look at the structural features and reaction conditions that modulate the synthesis of low and high molecular weight fructans by levansucrases. *Carbohydr. Polym.* 219, 130–142.
26. Beine, R. *et al.* (2008). Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering. *J. Biotechnol.* 138, 33–41.
 27. Ortiz-Soto, M. E. *et al.* (2018). Product-oriented chemical surface modification of a levansucrase (SacB): Via an ene-type reaction. *Chem. Sci.* 9, 5312–5321.
 28. Seibel, J. *et al.* (2006). Synthesis of sucrose analogues and the mechanism of action of *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). *Carbohydr. Res.* 341, 2335–2349.
 29. Strube, C. P. *et al.* (2011). Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *J. Biol. Chem.* 286, 17593–17600.
 30. Olvera, C., Centeno-Leija, S., Ruiz-Leyva, P. & López-Munguía, A. (2012). Design of Chimeric Levansucrases with Improved Transglycosylation Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1820–1825.
 31. Zhang, D., Lax, A. R., Raina, A. K. & Bland, J. M. (2009). Differential cellulolytic activity of native-form and C-terminal tagged-form cellulase derived from *Coptotermes formosanus* and expressed in *E. coli*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 516–522.
 32. Paul, N. K., Baksh, K. A., Arias, J. F. & Zamble, D. B. (2020). The impact of a His-tag on DNA binding by RNA polymerase alpha-C-terminal domain from *Helicobacter pylori*. *Protein Expr. Purif.* 167, 105541.
 33. Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N. & Kumar, G. N. S. (2014). Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *Int. J. Proteomics* 2014, 1–12.
 34. Phizicky, E. M. & Fields, S. (1995). Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* 59, 94–123.
 35. Sekar, R. B. & Periasamy, A. (2001). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. 629–633.
 36. Hochreiter, B., Garcia, A. P. & Schmid, J. A. (2015). Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences. *Sensors (Switzerland)* 15, 26281–26314.
 37. Johnson, I & Spencer, M. T. Z. (2016). Fluorescence Fundamentals | Thermo Fisher Scientific. 1–9.
 38. Wallace, B. & Atzberger, P. J. (2017). Förster resonance energy transfer: Role of diffusion of fluorophore orientation and separation in observed shifts of FRET efficiency. 1–22.



39. Quan, J. & Tian, J. (2011). Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat. Protoc.* 6, 242–251.
40. Liu, H. & Naismith, J. H. (2008). An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol.* 8, 91.
41. Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
42. Vajda, S. *et al.* (2017). New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 85, 435–444.
43. Kozakov D, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella S, Xia B, Hall DR, Vajda, S. (2013). How good is automated protein docking? *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 81, 2159–66.
44. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorney D, Yueh C, Beglov D, V. S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking Dima. *Nat. Protoc.* 12, 255–278.
45. Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 523–533.
46. Tokuriki, N., Stricher, F., Serrano, L. & Tawfik, D. S. (2008). How protein stability and new functions trade off. *PLoS Comput. Biol.* 4, 35–37.
47. Bouallegue, A. *et al.* (2020). Levan from a new isolated *Bacillus subtilis* AF17: Purification, structural analysis and antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 144, 316–324.



11. Anexo

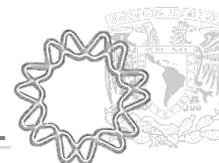
Tabla A. Predicción de la estabilidad de las posibles mutantes de SacB en el SEUF-1

Mutación SEUF-1	Missense		ProTSPoM	iStable (37°C pH 6)	Tipo de interacción con CHO (de acuerdo al acoplamiento molecular)	Seleccionada
		Contribución encontrada	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)		
Y37	No se detectaron daños estructurales	Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 1.08 Å ³	-1.12	-1.53	Enlace de hidrógeno 3.07 Å con fenol	NO Cerca de amino terminal
Y41	No se detectaron daños estructurales	Ruptura de puente salino interno: El puente salino en WT se detecta entre el átomo de OD1 de D145 y el átomo de NH1 de ARG 141 (distancia: 3,652 Å). Sin embargo, el puente salino también se encuentra en la estructura mutante entre el átomo de OD1 de ASP 145 y el átomo de NH1 de ARG 141 (distancia: 3,652 Å). El residuo de tipo WT está expuesto (RSA 31,5%) Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 17,928 Å ³	-0.74	-1.36	Dos enlaces de hidrógeno 2.95 y 2.96 Å con fenol	NO Cerca de amino terminal
Y271	No se detectaron daños estructurales	Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 19.656 Å ³	-0.80	-1.0	Dos puentes de hidrógeno 2.90 y 3.15 Å con back bone	NO Interacciones con back bone
Q272	Daño estructural detectado Ruptura de enlace de Hidrógeno enterrado	Ruptura de enlace de hidrógeno interno: Esta sustitución interrumpe todos los enlaces H de la cadena lateral / cadena lateral y / o enlaces H de la cadena lateral / cadena principal formados por un residuo GLN oculto (RSA 6,0%)	-0.11	-0.19	Hidrofóbicas	NO Interrupción de enlaces de Hidrógeno
E275	No se detectaron daños estructurales	Ninguna	-0.98	-0.67	Hidrofóbicas	Sí
S276	Daño estructural detectado Ruptura de enlace de Hidrógeno enterrado	Ruptura de enlace de hidrógeno interno: Esta sustitución interrumpe todos los enlaces H de la cadena lateral / cadena lateral y / o enlaces H de la cadena lateral / cadena principal formados por un residuo SER enterrado (RSA 3,0%). Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 44.064 Å ³	0.01	-0.78	Hidrofóbicas	NO
N279	Daño estructural detectado Ruptura de enlace de Hidrógeno enterrado	Ruptura de enlace de hidrógeno interno: Esta sustitución interrumpe todos los enlaces H de la cadena lateral / cadena lateral y / o enlaces H de la cadena lateral / cadena principal formados por un residuo ASN enterrado (RSA 0,0%)	-0.81	-1.36	Enlace de hidrógeno 3.25 Å con amida	NO
Y282	Daño estructural detectado Cavidad alterada	Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 117.936 Å ³	-0.71	-1.33	Enlace de hidrógeno 3.10 Å con fenol	NO



Tabla B. Predicción de la estabilidad de las posibles mutantes de SacB en el SEUF-2

Mutación SEUF-2	Missense 3D		ProTSPoM	iStable (37°C pH 6)	Tipo de interacción con CHO (de acuerdo al acoplamiento molecular)	Seleccionada
		Contribución encontrada	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)		
D118	No se detectaron daños estructurales	Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 6.264 Å ³	-0.37	-0.25	Enlace de hidrógeno 2.94 Å con carboxilo	Sí
T119	Daño estructural detectado Ruptura de enlace de Hidrógeno enterrado	Ruptura de puente de hidrógeno interno: Esta sustitución interrumpe todos los enlaces H de la cadena lateral / cadena lateral y / o enlaces H de la cadena lateral / cadena principal formados por un residuo THR enterrado (RSA 2.1%) Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 28.512 Å ³	-0.23	-0.93	Dos enlaces de hidrógeno 3.05 y 3.06 Å con back bone	NO Interrupción de enlaces de hidrógeno
S120	No se detectaron daños estructurales	Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 40.608 Å ³	-0.21	-0.06	Dos enlaces de hidrógeno 2.89 y 3.05 Å con hidroxilo	NO
R141	No se detectaron daños estructurales	Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 33.912 Å ³	-0.71	-0.92	Dos enlaces de Hidrógeno 3.09 con amina y 3.17 Å con otro amino	NO
D145	No se detectaron daños estructurales	Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 7.992 Å ³	0.46	-0.38	Enlace de hidrógeno 2.82 Å con carboxilo	Sí
K148	No se detectaron daños estructurales	Ruptura de puente salino interno: El puente salino de tipo WT se detecta entre el átomo NZ de LYS 148 y el átomo de ODI de ASP 145 (distancia: 4,242 Å), y la sustitución rompe este enlace. Sin embargo, el residuo de tipo WT no está enterrado en RSA (11,2%) Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 41,904 Å ³	-0.89	-0.88	Hidrofóbicas	SÍ
Q159	Daño estructural detectado Ruptura de enlace de Hidrógeno enterrado	Ruptura de enlace de hidrógeno interno: Esta sustitución interrumpe todos los enlaces H de la cadena lateral / cadena lateral y / o enlaces H de la cadena lateral / cadena principal formados por un residuo GLN enterrado (RSA 6.0%) Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 32.4 Å ³	-0.81	-0.76	Hidrofóbicas	NO
T160	No se detectaron daños estructurales	Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 4.536 Å ³	-0.78	-0.8	Hidrofóbicas	-
Q161	Daño estructural detectado Ruptura de enlace de Hidrógeno enterrado	Ruptura de enlace de hidrógeno interno: Esta sustitución interrumpe todos los enlaces H de cadena lateral / cadena lateral y / o enlaces H de cadena lateral / cadena principal formados por un residuo GLN oculto (RSA 8.0%) Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 1.08 Å ³	-0.45	-0.47	Hidrofóbicas	NO
E162	Carga enterrada reemplazada Ruptura de enlace de Hidrógeno enterrado Cavidad alterada	Carga interna reemplazada: Esta sustitución reemplaza un residuo cargado enterrado (GLU, RSA 3,0%) con un residuo no cargado (ALA). Ruptura de enlace de hidrógeno interno: Esta sustitución interrumpe todos los enlaces H de cadena lateral / cadena lateral y / o enlaces H de cadena lateral / cadena principal formados por un residuo GLU enterrado (RSA 3,0%) Ruptura de puente de sal interno: El puente de sal de WT se detecta entre el átomo OE1 de GLU 162 y el átomo NE de ARG 141 (distancia: 4,681 Å), y la sustitución rompe este enlace. El residuo de tipo WT está enterrado (RSA 3,0%)	-0.35	0.47	Enlaces de hidrógeno 2.75 Å con carboxilo	NO



		Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 101,952 Å ³				
--	--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--	--	--

Tabla C. Predicción de la estabilidad de las posibles mutantes de-SacB en el SEUF-3

Mutación SEUF-3	Missense 3D		ProTSPoM	iStable (37°C pH 6)	Tipo de interacción con CHO (de acuerdo a acoplamiento molecular)	Seleccionada
		Contribución encontrada	ΔΔG (kcal/mol)	ΔΔG (kcal/mol)		
D83	Daño estructural detectado Ruptura de enlace de Hidrógeno enterrado	Carga interna reemplazada: Esta sustitución reemplaza un residuo cargado enterrado (ASP, RSA 1.8%) con un residuo no cargado (ALA). Ruptura de enlace de hidrógeno interno: Esta sustitución interrumpe todos los enlaces H de la cadena lateral / cadena lateral y / o enlaces H de la cadena lateral / cadena principal formados por un residuo ASP enterrado (RSA 1,8%). Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 23,976 Å ³	-0.78	-0.56	Dos enlaces de hidrógeno con carboxilo de aspártico a 2.70 Å	SÍ
P113	No se detectaron daños estructurales	Ninguna	-0.63	-0.69	Hidrofóbicos	Posiblemente
T431	No se detectaron daños estructurales	Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 12.312 Å ³	-0.22	-1.12	Hidrofóbicos	NO
N432	No se detectaron daños estructurales	Ninguna	-0.49	-1.15	Hidrofóbicos	NO
F435	No se detectaron daños estructurales	Ninguna	-0.61	-1.47	Hidrofóbicos	Sí Coincide con cristal S164A y estudios de acoplamiento molecular
K439	No se detectaron daños estructurales	Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 2.376 Å ³	-0.19	-0.63	Enlace de hidrógeno 2.71 Å con back bone	NO
Q440	No se detectaron daños estructurales	Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 1.296 Å ³	-0.68	-0.63	Hidrofóbicos	NO
S441	No se detectaron daños estructurales	Alteración de la cavidad: La sustitución conduce a la expansión del volumen de la cavidad a 26.136 Å ³	0.10	-0.31	Hidrofóbicos	NO