



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Efecto de la fuente de carbono sobre la regulación de la expresión  
de las Glicosiltransferasas de *Leuconostoc mesenteroides*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. C. Luz Cristina Vallejo García

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Agustín López-Munguía Canales  
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos  
[Instituto de Biotecnología](#)

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch  
[Facultad de Química](#)

Cuernavaca Morelos, noviembre de 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Enzimas del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Agustín López Munguía-Canales y la asesoría técnica de la M. en B. María Elena Rodríguez Alegría.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca No. 477574. y por el apoyo económico otorgado por la UNAM a través del proyecto DGAPA PAPIIT IN210523 y por el proyecto CONACyT-A1-S-21209

Los resultados de este proyecto se presentaron en el “XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería” 2021, mediante apoyo económico del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP)

## **Dedicatoria**

A mi madre, por su apoyo constante.

A mis hermanos Clara y Fernando, por siempre estar conmigo, escucharme y hasta regañarme cuando lo consideran necesario.

A mis primos: Lupe, Rosy, Lorena, Erika, Omar y Óscar, mis tías Antonia y Panchita por darme ánimos.

A mis sobrinos Mateo y Adrián.

A mis abuelas Rosita y Esther.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Agustín López por aceptarme en su grupo y por haberme permitido realizar este proyecto, además de asesorarme durante el desarrollo del trabajo, por su compromiso y su apoyo. Gracias.

A la M. en B. María Elena Rodríguez Alegría, por su constante apoyo técnico y sus contribuciones durante la discusión de este trabajo.

A las integrantes de comité tutorial: Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos y Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, por sus valiosas y expertas contribuciones para la realización de este proyecto.

A los integrantes del jurado: Dr. José Luis Puente García, Dra. Cinthia Ernestina Núñez López, Dr. José Adelfo Escalante Lozada, Dra. Carmina Montiel Pacheco y Dra. Lilian González Segura, por el tiempo que le dedicaron a esta tesis, por sus recomendaciones y contribuciones al mismo.

A la M. en C. María del Carmen Sánchez Olmos y la Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos por su apoyo con la realización del análisis de expresión diferencial.

Al Dr. Jorge Esaú Solís Miranda y la M.C. Ma. del Carmen Monserrat Quinto Hernández por su apoyo para realizar el ensayo de RT-qPCR.

A la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática de la UNAM por realizar la extracción y secuenciación de ARN para este trabajo y en particular al Dr. Ricardo Grande y la M.C. Verónica Jiménez Jacinto por resolver mis dudas relacionadas con esta parte del proyecto.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA por su trabajo en la síntesis de oligonucleótidos.

A la Biol. Larisa Campos Íñiguez por el apoyo administrativo. A la laboratorista Aurelia Ocampo y el T.L. Fernando González Muñoz por su apoyo técnico.

A mis compañeros de laboratorio: Jaime, Silvia, Alfonso por hacer más grato el ambiente y estar dispuestos a discutir sobre el trabajo, entre otras cosas.

# ÍNDICE

|  |      |
|--|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS .....  | viii |
| ÍNDICE DE TABLAS .....   | xii  |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....  | xiv  |
| 1. RESUMEN.....  | 1    |
| 2. ABSTRACT .....  | 2    |
| 3. INTRODUCCIÓN .....  | 3    |
| 4. ANTECEDENTES .....  | 5    |
| 4.1. Los productos fermentados y las Bacterias Ácido Lácticas.....                   | 5    |
| 4.2. Los Exopolisacáridos .....  | 6    |
| 4.3. Las Glicosiltransferasas .....  | 10   |
| 4.3.1. Las Glucansacararas .....   | 10   |
| 4.3.2. Las Fructansacararas .....  | 14   |
| 4.4. El género <i>Leuconostoc</i> .....  | 17   |
| 4.5. Regulación de las GTFs .....  | 20   |
| 4.6. Antecedentes del grupo: Glicosiltransferas en cepas de <i>Leuconostoc</i> ..... | 22   |
| 5. JUSTIFICACIÓN .....   | 24   |
| 6. HIPÓTESIS.....  | 25   |
| 7. OBJETIVOS .....   | 25   |
| 7.1. Objetivo general .....  | 25   |
| 7.2. Objetivos particulares.....   | 25   |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 8.      | ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....  | 26 |
| 9.      | METODOLOGÍA .....   | 27 |
| 9.1.    | Identificación de GTFs por identidad de secuencias y búsqueda de elementos de transcripción ..... | 27 |
| 9.2.    | Cultivo de bacterias <i>Leuconostoc</i> en diferentes FC.....                                     | 28 |
| 9.2.2.  | Estudio del efecto de la FC en el cultivo.....  | 29 |
| 9.2.3.  | Cultivos en condiciones anaerobias .....  | 30 |
| 9.3.    | Actividad global.....   | 31 |
| 9.4.    | Análisis de carbohidratos .....   | 32 |
| 9.4.1.  | TLC.....  | 32 |
| 9.5.    | Análisis de proteínas .....   | 33 |
| 9.5.1.  | Cuantificación de proteínas .....   | 33 |
| 9.5.2.  | Zimogramas .....  | 33 |
| 9.6.    | Análisis transcriptómico .....  | 34 |
| 9.7.    | Análisis de Expresión Diferencial.....  | 34 |
| 9.8.    | Búsqueda de operones y motivos de ADN .....   | 35 |
| 9.9.    | PCR cuantitativa con Transcriptasa Reversa (RT-qPCR) .....  | 35 |
| 10.     | RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 37 |
| 10.1.   | Análisis bioinformáticos de las cepas.....  | 38 |
| 10.1.1. | La cepa <i>L. citreum</i> CW28.....   | 39 |
| 10.1.2. | La cepa <i>L. mesenteroides</i> P45 .....   | 42 |

|         |  |     |
|---------|--|-----|
| 10.1.3. | La cepa <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293.....                               | 47  |
| 10.2.   | Análisis bioquímico de las cepas .....   | 52  |
| 10.2.1. | La cepa <i>L. citreum</i> CW28.....  | 52  |
| 10.2.2. | La cepa <i>L. mesenteroides</i> P45 .....  | 56  |
| 10.2.3. | La cepa <i>L. mesenteroides</i> IBT-PQ .....   | 57  |
| 10.2.4. | La cepa <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293.....                               | 58  |
| 10.3.   | La cepa <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 en diferentes FC .....   | 61  |
| 10.3.1. | Contexto genómico de las GTFs en <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293.....                                  | 61  |
| 10.3.2. | Estudio del crecimiento de la cepa <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 en sacarosa .....                   | 62  |
| 10.3.3. | Comportamiento de las GTFs al usar diferentes FC .....   | 64  |
| 10.4.   | Análisis de expresión diferencial de genes de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 (AED) .....              | 69  |
| 10.4.1. | Expresión génica en xilosa .....   | 73  |
| 10.4.2. | Explorando posibles vías de regulación de las GTFs en la cepa <i>L. mesenteroides</i><br>ATCC 8293 ..... | 74  |
| 10.4.3. | Validación de la transcriptómica por RT-qPCR.....  | 82  |
| 11.     | CONCLUSIONES .....   | 84  |
| 12.     | PERSPECTIVAS .....   | 86  |
| 13.     | PRODUCTOS.....   | 87  |
| 14.     | BIBLIOGRAFÍA.....  | 88  |
|         | MATERIAL SUPLEMENTARIO .....   | 104 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 4.1. Clasificación de los Exopolisacáridos (EPS) de las BAL. Los HePs están compuestos de diversos monosacáridos, para ser sintetizados se requieren diversas enzimas (e.g. EpsD, EpsC, EpsA) que usan azúcares fosforilados (e. g. UDP) como sustrato y además necesitan mecanismos complejos y energéticamente costosos para ser secretados. Por otro lado, los HoPs utilizan sacarosa como sustrato, requieren una sola enzima para ser producidos y, al estar la enzima unida a la pared celular o secretada en el medio, se sintetizan fuera de la célula. PG = peptidoglicano, MC = Membrana citoplasmática (Modificado de Zeidan <i>et al.</i> , 2017).....   | 8  |
| Figura 4.2. Estructuras de los diversos HoPs producidos por BAL. Fructanas: levana con enlaces $\beta(2-6)$ , inulina con enlaces $\beta(2-1)$ . Glucanas: dextrana con enlaces $\alpha(1-6)$ principalmente, mutana con enlaces $\alpha(1-3)$ principalmente, alternana con enlaces tanto $\alpha(1-6)$ como $\alpha(1-3)$ y reuterana con enlaces $\alpha(1-4)$ (Modificado de: De Vuyst y De Vin, 2007).....   | 9  |
| Figura 4.3. Diferentes representaciones de la estructura de la dextransacarasa truncada (1758-2862 aa) DSR-E de <i>Leuconostoc citreum</i> NRRL-1299 A) Esquema de la secuencia primaria de la proteína, indicando los motivos característicos de la familia GH70. B) Representación en caricatura de la estructura cristalográfica de la enzima (PDB: 3TTO). C) Representación de la estructura tridimensional de la enzima, donde se observa el característico arreglo en forma de U de las proteínas de la familia GH 70. La región catalítica de la enzima se encuentra en el fondo de la estructura y está conformada por los dominios C (morado), A (azul) y B (verde). (Figura modificada de Brison <i>et al.</i> , 2012)..... | 11 |
| Figura 4.4. Estructura 3D de la inulosacarasa truncada (desde 145 a 708 aa) <i>InuJ</i> de <i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC533 (PDB: 2YFR). La propela del dominio catalítico está formada por 5 hojas $\beta$ (en colores rojo, amarillo, verde, azul y rosa). Los residuos catalíticos están señalados en círculos rojos. El dominio N-terminal se muestra en color azul claro y el C-terminal en morado (Modificado de: Pijning <i>et al.</i> , 2011).....   | 15 |

Figura 4.5. Fotografías de *L. mesenteroides* ATCC 8293. A) Vista al microscopio 100X de células de la cepa teñidas con el método de Gram. B) Colonias de la cepa en placa de Lm y sacarosa 2%. .17

Figura 9.1. Pasos para cambiar la FC y obtener muestras para los análisis bioquímicos. Para realizar los análisis bioquímicos, se obtuvieron muestras del final de la fase exponencial. ....30

Figura 10.1. Geles de proteínas de *L. citreum* CW28 tomados al final del cultivo en presencia de sacarosa. El gel (A) está teñido con azul de Coomasie. El gel (B) es un zimograma incubado con sacarosa y teñido con reactivo de Schiff. Los carriles 1, 2 y 3 indican que se trata de triplicados biológicos. En todos los casos se usó la fracción Bt del cultivo y se cargaron 200 mg de proteína. ....53

Figura 10.2. Placa TLC con los resultados de la reacción de la endoinulinasa. Se analizó el polímero producido por la cepa CW28 al crecer con sacarosa. Los puntos de la parte inferior de la placa son polímero: inulina (rojo) o dextrana (azul). Las manchas de la parte superior corresponden a monosacáridos y sacarosa. También es posible observar FOS que se usaron como muestra control, en el carril 3. La fase móvil permite separar fácilmente los FOS, aunque no separa la sacarosa de los monosacáridos. ....54

Figura 10.3. Placa TLC del análisis del sobrenadante enriquecido. El sobrenadante del cultivo con sacarosa fue enriquecido con sacarosa y tratado con endoinulinasa. ....55

Figura 10.4. Gel de electroforesis de proteínas con muestras de la cepa *L. mesenteroides* P45 al final de la fase exponencial. Los carriles contienen muestras de células centrifugadas (Bt) y el sobrenadante (Sn). La sección A muestra las proteínas teñidas con azul de Coomasie. La fracción B corresponde al zimograma de las proteínas y las bandas rosas corresponden al polímero producido por enzimas activas. ....57

Figura 10.5. Gel de electroforesis de proteínas con muestras de la cepa *L. mesenteroides* IBT-PQ al final de la fase exponencial. Los carriles contienen muestras de células centrifugadas (Bt) y el sobrenadante (Sn). La sección A muestra las proteínas teñidas con azul de Coomasie. La fracción

B corresponde al zimograma de las proteínas y las bandas rosas corresponden al polímero producido por enzimas activas. Solo es posible identificar una enzima activa en el gel. .... 58

Figura 10.6. Geles nativos de proteínas de *L. mesenteroides* ATCC 8293 cultivada en sacarosa. El gel (A) está teñido con azul de Coomasie. El gel (B) es un zimograma incubado con sacarosa y teñido con reactivo de Schiff. El gel (C) es un zimograma incubado con rafinosa y teñido con reactivo de Schiff. Se utilizaron muestras de la fracción celular (Bt) y la fracción soluble (Sn) del cultivo. El polímero tipo glucana absorbe agua y sobresale del gel. .... 59

Figura 10.7. Arreglo de los genes de las GTFs en unidades de transcripción. A) las GS están dispersas a lo largo del genoma. B) las FS se localizan en una región y forman dos operones. .... 62

Figura 10.8. Comportamiento de *L. mesenteroides* ATCC 8293 en cultivo con sacarosa. Se analizaron tres réplicas biológicas y se presentan los promedios obtenidos de las réplicas. Las líneas naranjas dentro de los símbolos son las barras de error, que representan la desviación entre las réplicas. .... 63

Figura 10.9. Propuesta de vías metabólicas de los carbohidratos de *L. mesenteroides* ATCC 8293 y de los sistemas que los internalizan en la célula. La sacarosa, manosa y celobiosa entran por un sistema PTS. La fructosa y xilosa usan permeasas. La glucosa usa un transportador específico. Por otro lado, los sistemas que usan el ácido ascórbico y la galactosa aún no están identificados. Los metabolitos se muestran en letras negras, las enzimas que catalizan las reacciones aparecen en letras rojas. (Modificado de Chun *et al.*, 2017) .... 66

Figura 10.10. Actividad global de las GTFs en las células de *L. mesenteroides* ATCC 8296, al final de la fase exponencial. Las letras sobre las barras indican diferencia significativa en la actividad total (ANOVA con el test de Tukey, tres réplicas biológicas y  $\alpha = 0.05$ ). .... 67

Figura 10.11. Zimogramas que muestran la presencia de 5 enzimas GTFs de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 cuando crecen en diferentes FC. Sac = sacarosa, Fru = fructosa, Glu = glucosa, Xil = xilosa, Asc = ácido. ascórbico, Gal = galactosa, Man = manosa, Cel = celobiosa. En

todos los geles se usó sacarosa como sustrato para las GTFs. Se cargaron 200 mg de proteína total en cada pozo. .... 68

Figura 10.12. Análisis de Escalamiento Multidimensional de las muestras. A) Sacarosa (negro) vs celobiosa (rojo), B) Fructosa (rojo) vs Sacarosa (negro) C) Xilosa (azul) vs Sacarosa (negro). .... 70

Figura 10.13. Consumo y metabolismo inicial de la xilosa en *L. mesenteroides* ATCC 8293. Los genes de las enzimas que participan en este mecanismo se encuentran en la parte inferior y se muestran los cambios en el nivel de expresión ( $\text{LOG}_2\text{FC}$ ) en xilosa con respecto a sacarosa. .... 74

Figura 10.14. Biomasa y pH finales de las fermentaciones seriadas en condiciones aeróbicas (barras azules) y anaeróbicas (barras anaranjadas) de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293. Los números se refieren a la serie del cultivo de donde se obtuvieron las muestras. .... 78

Figura 10.15. Zimogramas de células obtenidas de las fermentaciones seriadas. En los cultivos se usó sacarosa como FC. Los números indican la serie de donde provienen las células. Los geles muestran las enzimas activas que se producen en cada cultivo. .... 79

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 4.1. Enzimas de tipo Glucansacararas con estructura resuelta. ....  | 11 |
| Tabla 4.2. Alineamiento múltiple de secuencias de enzimas de la familia GH70, que muestra la conservación de los dominios donde se hallan los residuos catalíticos (modificado de Passerini <i>et al.</i> , 2015). .... | 13 |
| Tabla 4.3. Función de los motivos conservados en las enzimas bacterianas de la familia GH68*16  |    |
| Tabla 9.1. Enzimas utilizadas como planteados para la búsqueda <i>in silico</i> de las GTFs en los genomas de seleccionados. ....   | 27 |
| Tabla 9.2. Composición del medio de cultivo Lm*.....  | 28 |
| Tabla 9.3. Secuencias de los sitios de unión de Factores de Transcripción usados en el análisis. 35   |    |
| Tabla 9.4. Lista de oligonucleótidos utilizados para la RT-qPCR y el tamaño del amplicón resultante. ....   | 36 |
| Tabla 10.1. Resultados de los alineamientos con BlastP, entre secuencias de GTFs caracterizadas y el genoma de la cepa <i>L. citreum</i> CW28. ....   | 39 |
| Tabla 10.2. Motivos característicos de la familia GH70 hallados por alineamiento múltiple de las secuencias referencia con la secuencia hallada en <i>L. citreum</i> CW28 ..... 41                                      |    |
| Tabla 10.3. Predicción de los sitios -10 y -35 en las regiones río arriba de los genes de la GS identificada en la cepa <i>L. citreum</i> CW28..... 42  |    |
| Tabla 10.4. Características de las GTFs de la cepa <i>L. citreum</i> CW28 ..... 42  |    |
| Tabla 10.5. Resultados de los alineamientos con BlastP, entre secuencias de GTFs caracterizadas y el genoma de la cepa de la cepa <i>L. mesenteroides</i> P45. .... 43  |    |
| Tabla 10.6. Motivos característicos de las enzimas de la familia GH70 identificados por alineamiento múltiple de las secuencias de <i>L. mesenteroides</i> P45 ..... 45   |    |

|  |    |
|--|----|
| Tabla 10.7. Predicción de los sitios -10 y -35 en las regiones río arriba de los genes de las GS identificadas en el genoma de la cepa <i>L. mesenteroides</i> P45.....                            | 46 |
| Tabla 10.8. Características de las GS identificadas en el genoma de la cepa <i>L. mesenteroides</i> P45  | 46 |
| Tabla 10.9. Porcentajes de identidad y cobertura de los alineamientos entre secuencias conocidas de GTFs y el genoma de la cepa <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 .....                            | 48 |
| Tabla 10.10. Motivos característicos de las enzimas de la familia GH70 identificados en las secuencias de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293.....   | 49 |
| Tabla 10.11. Localización de los motivos característicos de las enzimas de la familia GH68 en secuencias caracterizadas y las secuencias de FSs de la cepa <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293. .... | 50 |
| Tabla 10.12. Predicción de los sitios -10 y -35 en las regiones río arriba de los genes de las GTFs identificadas en el genoma de la cepa <i>L. mesenteroides</i> ATCC8293.....                    | 51 |
| Tabla 10.13. Resumen de las glicosiltransferasas identificadas en el genoma de la cepa <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 y algunas de sus propiedades.....   | 51 |
| Tabla 10.14. Velocidades máximas de crecimiento y biomasa producida por <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 en las diferentes FC.....  | 65 |
| Tabla 10.15. Comparación de los GED en cultivos de <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 con fructosa o xilosa como fuentes de carbono relativos al cultivo con sacarosa. ....                         | 71 |
| Tabla 10.16. Cambios en la expresión de los genes de las GTFs de la cepa <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293. ....   | 72 |
| Tabla 10.17. Actividad relativa de las GTFs en la fermentación final (No. IV) .....  | 79 |
| Tabla 10.18. Sitios de unión a VicR en las regiones río arriba de las FS. ....   | 82 |
| Tabla 10.19. Comparación de los niveles de expresión de los genes de las GTFs de la cepa <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293 mediante RNA-seq y RT-qPCR .....  | 83 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

| Abreviatura         | Significado   |
|---------------------|---|
| %C                  | Porcentaje de cobertura de las secuencias alineadas                 |
| %I                  | Porcentaje de identidad de las secuencias alineadas                 |
| ADN                 | Ácido desoxirribonucleico   |
| AED                 | Análisis de expresión diferencial                                   |
| AR                  | Azúcares reductores   |
| ARN                 | Ácido ribonucleico  |
| BAA                 | Bacterias ácido acéticas  |
| BAL                 | Bacterias ácido lácticas  |
| cADN                | ADN de una sola cadena  |
| CAZy                | Carbohydrate-Active enZYmes Database                                |
| DNS                 | ácido 3, 5 dinitrosalisílico  |
| DO <sub>540nm</sub> | Densidad óptica a 540 nm  |
| DO <sub>590nm</sub> | Densidad óptica a 590 nm  |
| DO <sub>600nm</sub> | Densidad óptica a 600 nm  |
| EPS                 | Exopolisacáridos  |
| FC                  | Fuente de carbono   |
| FOS                 | Fructooligosacáridos  |
| FS                  | Fructansacararas  |
| FT                  | Factores de transcripción   |
| GED                 | Genes expresados diferencialmente                                   |
| GH68                | Glicosil Hidrolasas Familia 68                                      |
| GH70                | Glicosil Hidrolasas Familia 70                                      |
| GP                  | Grado de Polimerización   |
| GRAS                | Generally Recognized as Safe, generalmente reconocidas como seguras |
| GS                  | Glucansacararas   |

|         |   |
|---------|---|
| GTFs    | Glicosiltransferasas  |
| HePs    | Heteropolisacáridos   |
| HoPs    | Homopolisacáridos   |
| Mw      | masa molecular de la proteína   |
| NCBI    | National Center for Biotechnology Information   |
| PG      | Peptidoglucano  |
| pI      | punto isoeléctrico de la proteína   |
| RT-qPCR | retro transcriptase-quantitative polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con retro transcriptasa) |
| TC      | Tasa de cambio  |
| TLC     | Thin Layer Chromatography, cromatografía en capa fina   |
| U       | Unidades de actividad enzimática  |
| UUSMB   | Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática   |

# Efecto de la fuente de Carbono sobre la Regulación de la Expresión de las Glicosiltransferasas de *Leuconostoc mesenteroides*

## 1. RESUMEN

Las bacterias de la especie *Leuconostoc mesenteroides* tienen un papel importante en la fermentación de productos como el *kimchi*, el *sauerkraut* y el *pulque* además de muchos otros vegetales fermentados y algunos productos lácteos. También es una especie reconocida por su capacidad para producir homopolisacáridos (HoPs) como la dextrana y la levana, compuestos que son importantes en la industria alimenticia, biomédica y estética principalmente, debido a las propiedades bioquímicas que presentan y que se deben a la estructura que presentan. Los HoPs son sintetizados a partir de sacarosa por medio de enzimas conocidas como glicosiltransferasas (GTFs) y existen cepas de *L. mesenteroides* que pueden producir hasta seis de estas enzimas. A pesar de la importancia de la especie, de las enzimas GTFs y de los HoPs, existe escasa información sobre la función biológica de estos polímeros y de los mecanismos de regulación que intervienen en la expresión de las GTFs. Con el objetivo de comprender los mecanismos de regulación, se exploró el comportamiento de la cepa *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293, productora de seis enzimas GTFs, cuando utiliza diferentes azúcares como fuente de carbono (FC). Los resultados de ese trabajo mostraron principalmente, que con sacarosa como FC se obtiene la mayor actividad de las GTFs y la mayor expresión de sus genes, de modo que la sacarosa es el inductor preferido para las GTFs, aunque no es indispensable para la inducción. Por otro lado, los análisis bioinformáticos y transcriptómicos mostraron que la regulación de estos genes es más compleja de lo que hasta ahora se había planteado, pues hay indicios de que los genes se ven afectados particularmente por algunos factores ambientales como la temperatura y el pH. Si bien este trabajo contribuye al entendimiento de la regulación en *L. mesenteroides*, aún es necesaria una amplia investigación para poder contestar las incógnitas relacionadas con el metabolismo de la bacteria y su comportamiento en diferentes condiciones ambientales, tanto para entender y describirla regulación de los genes de las GTFs en la especie, como para entender la función biológica de los HoPs en la bacteria.

## 2. ABSTRACT

*Leuconostoc mesenteroides* is a common species in fermented foods, also known for polysaccharides production through glycosyltransferases (GTFs). These polymers have been proposed as protective barriers against acidity, dehydration, heat, and oxidative stress. Despite its presence in traditional lactic fermented products such as kimchi, sauerkraut, kefir, sourdough, and pulque, and their association to functional properties, regulation of GTFs expression in *L. mesenteroides* is still poorly understood. The reference strain *L. mesenteroides* ATCC 8293 possesses three glucansucrases genes no in operons, and three fructansucrases genes arranged in two operons with one glycol-hydrolase: *levLX* and *levC-scrB*. To contribute to understanding GTFs regulation, we present here a differential gene expression analysis of *L. mesenteroides* ATCC 8293 to examine its behavior when cultivated in various carbon sources. We observed that while GTFs are expressed in the presence of most sugars, they are down-regulated in xylose. We ruled out the regulatory effect of CcpA over the GTFs. We do not find regulatory elements with direct effect on the glucansucrases in the condition assayed. Our findings suggest that only operon *levLX* are repressed in xylose by LexA, both fructansucrases operons can be regulated by the VicK/VicR system. To better understand GTFs regulation, it may be essential to further explore the environmental conditions to prove the role of all these polymers in *Leuconostoc mesenteroides* bacteria.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los alimentos fermentados son un elemento importante de la dieta humana desde tiempos remotos, principalmente debido a que pueden ser almacenados de forma segura para su posterior consumo. Recientemente ha habido un auge en la producción y consumo de alimentos y bebidas fermentados, pues cada vez más personas los perciben como “benéficos para la salud” porque son productos naturales, no contienen aditivos, están mínimamente procesados y aportan sustancias benéficas para los consumidores (Marco *et al.*, 2017).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) forman parte importante de los procesos fermentativos de los alimentos y bebidas pues producen principalmente ácido láctico que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos como *Listeria* (Stiles, 1996). Producen además, una diversidad de metabolitos que contribuyen a mejorar las características organolépticas del producto y/o son benéficos para la salud del consumidor (Giraffa, 2014; Steinkraus, 2002). Entre estos productos es posible encontrar a los exopolisacáridos (EPS) del tipo homopolisacáridos (HoPs), que tienen una actividad biológica importante estrechamente relacionada con su estructura; así como muy diversas aplicaciones en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica (Zannini *et al.*, 2016).

Las glicosiltransferasas (GTFs) son enzimas producidas por las BAL, responsables de la síntesis de HoPs usando sacarosa como sustrato. Generalmente se asocia a una cepa de BAL con un HoP y por lo tanto una sola enzima, aunque se sabe que existen cepas que producen más de una enzima GTF dentro de su arsenal bioquímico y genético (Monsan *et al.*, 2001). Tal es el caso de las bacterias del género *Leuconostoc*, donde se han identificado cepas que producen o tienen la capacidad para producir más de una enzima del tipo GTF. El descubrimiento de cepas multiproductoras de GTFs, que anteriormente se realizaba mediante análisis bioquímicos y genéticos tradicionales, recientemente se ha facilitado debido a las herramientas bioinformáticas, que permiten hacer búsquedas dentro de los más de 450 genomas del género que se encuentran depositados en NCBI (National Center for Biotechnology Information o Centro Nacional para la Información Biotecnológica del Instituto de Salud de EUA).

El arsenal genómico que, ahora se sabe, poseen las bacterias del género *Leuconostoc* les permite expresar una variedad de GTFs y por lo mismo, de sintetizar HoPs diversos en los productos fermentados en los que se desarrollan. Este atributo es particularmente relevante en los alimentos y bebidas fermentados tradicionales que durante siglos han sido componentes clave en la dieta de las civilizaciones en el mundo y cuyos beneficios nutrimentales pueden asociarse claramente a los HoPs. A pesar de la relación entre las BAL, sus GTFs y la síntesis de HoPs, muy poco se ha explorado al respecto de los factores que afectan la regulación de estas enzimas. Entender los mecanismos de regulación de la expresión y producción de las GTFs en los cultivos de BAL, permitiría explicar cómo usan las bacterias esta riqueza genómica, cuáles son las funciones fisiológicas de los HoPs y la relevancia que existe tras sus diversas estructuras. Este conocimiento podría abrir un campo dentro de la producción de alimentos funcionales permitiendo dirigir la síntesis de los HoPs durante las fermentaciones tradicionales.

En este trabajo se exploró primero la riqueza genómica de las GTFs en las cepas del género *Leuconostoc*: *L. citreum* CW28, *L. mesenteroides* P45, *L. mesenteroides* IBT-PQ y *L. mesenteroides* ATCC 8293. La última cepa posee tres enzimas fructansacararas (FS) y tres glucansacararas (GS), lo que la hizo la más atractiva para estudiar el comportamiento de las enzimas con diferentes fuentes de carbono (FC). A partir de estos resultados se escogió a la cepa ATCC 8293 como modelo de estudio para realizar un análisis a nivel transcriptómico en con el objetivo de encontrar elementos relacionados con la regulación de las GTFs y comenzar a descubrir los mecanismos detrás de la expresión de estas enzimas.

Ha quedado demostrado que existe represión sobre todos los genes de las GTFs al usar azúcares diferentes a la sacarosa, tanto en la expresión como en la actividad de las enzimas correspondientes; mientras que la transcriptómica permitió vislumbrar la compleja red de regulación de las GTFs. Los análisis bioinformáticos realizados develaron que la regulación de las GTFs podría verse afectada por otras condiciones ambientales, como la temperatura y el pH, aunque el mecanismo de regulación de cada GTF parece ser particular. Con este trabajo se contribuye al conocimiento que existe sobre la regulación génica en esta bacteria y presenta las siguientes condiciones a explorar para responder la pregunta inicial del proyecto.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Los productos fermentados y las Bacterias Ácido Lácticas

Los alimentos y bebidas fermentados forman parte de la dieta de la humanidad desde tiempos muy remotos (Caplice y Fitzgerald, 1999) y la han acompañado durante el desarrollo de la civilización gracias a que pueden ser almacenados por más tiempo que los alimentos crudos (Marco *et al.*, 2017). Se consideran fermentados a los alimentos y bebidas que se obtienen a partir del crecimiento microbiano controlado y de las transformaciones enzimáticas de uno o varios componentes de un producto alimenticio (Marco *et al.*, 2017). Si los productos desarrollan microorganismos patógenos, sustancias tóxicas u otros elementos que puedan dañar la salud humana se consideran “descompuestos” (Steinkraus, 2002).

Las fermentaciones tradicionales son procesos que requieren pocos ingredientes, mínima preparación y procesamiento. Con ellas, se evita el deterioro de los alimentos gracias a la producción de agentes que impiden la proliferación de microorganismos no deseados (Marco *et al.*, 2017). Además, durante los procesos de fermentación se producen compuestos que mejoran el sabor, aroma y textura de los alimentos (Steinkraus, 2002). La mayoría de las fermentaciones tradicionales tienen efectos beneficiosos para la salud del comensal adicionales a los inherentes a la composición de la materia prima, como la fibra dietética; o bien que derivan de la presencia de ciertos grupos de bacterias que tienen carácter probiótico y/o que pueden producir compuestos nutracéuticos como las vitaminas o prebióticos (Shin y Han, 2015).

Entre los microorganismos que participan en las fermentaciones, uno de los grupos preponderantes son las bacterias ácido lácticas (BAL). El término BAL se refiere a un grupo de bacterias microaerófilas y Gram-positivas que pueden producir ácido láctico metabolizando carbohidratos que pueden hallar en su medio ambiente (Makarova *et al.*, 2006). Las BAL tienen una amplia distribución pues pueden hallarse en productos lácteos, cárnicos, pescados y vegetales (Tamang *et al.*, 2016). Son además indispensables para la producción de vino, café, cacao, masa de trigo fermentada (*sourdough*), ensilados y muchos otros productos fermentados tradicionales (Makarova *et al.*, 2006), por lo que muchas de sus características bioquímicas y

metabólicas están bien caracterizadas (Caplice y Fitzgerald, 1999).

Las BAL, además de ser consideradas como GRAS (Generally Recognized as Safe), tienen una maquinaria metabólica robusta y versátil, que les permite producir una variedad de metabolitos potencialmente benéficos para la salud y con aplicaciones en la industria (Ogier *et al.*, 2008; Sauer *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017). Las BAL producen principalmente ácido láctico que, en conjunto con el ácido acético, disminuye rápidamente el pH del alimento evitando la proliferación de otros microorganismos patógenos como *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Enterococcus* (Soomro *et al.*, 2002; Steinkraus, 2002). Estas bacterias también producen etanol y algunas bacteriocinas que igualmente favorecen la inocuidad del alimento (Martínez-Álvarez *et al.*, 2017; Soomro *et al.*, 2002). Asimismo, las BAL producen acetoína, diacetilo y otros ácidos orgánicos (v. g. caproico y butírico) que contribuyen al sabor y aroma de los alimentos fermentados (Sauer *et al.*, 2017; Thierry *et al.*, 2015). Las BAL pueden producir igualmente manitol, algunas vitaminas, antioxidantes y péptidos reguladores del sistema inmune, que incrementan el valor nutritivo de los alimentos que fermentan (Makarova *et al.*, 2006; Marco *et al.*, 2017; Sauer *et al.*, 2017; Waters *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017).

Además de todos estos compuestos, numerosas especies de BAL son capaces de sintetizar EPS que pueden funcionar como fibra soluble en la digestión de los seres humanos y otros mamíferos, tienen potencial actividad prebiótica y son los responsables de la textura de muchos alimentos fermentados (Marco *et al.*, 2017; Zeidan *et al.*, 2017).

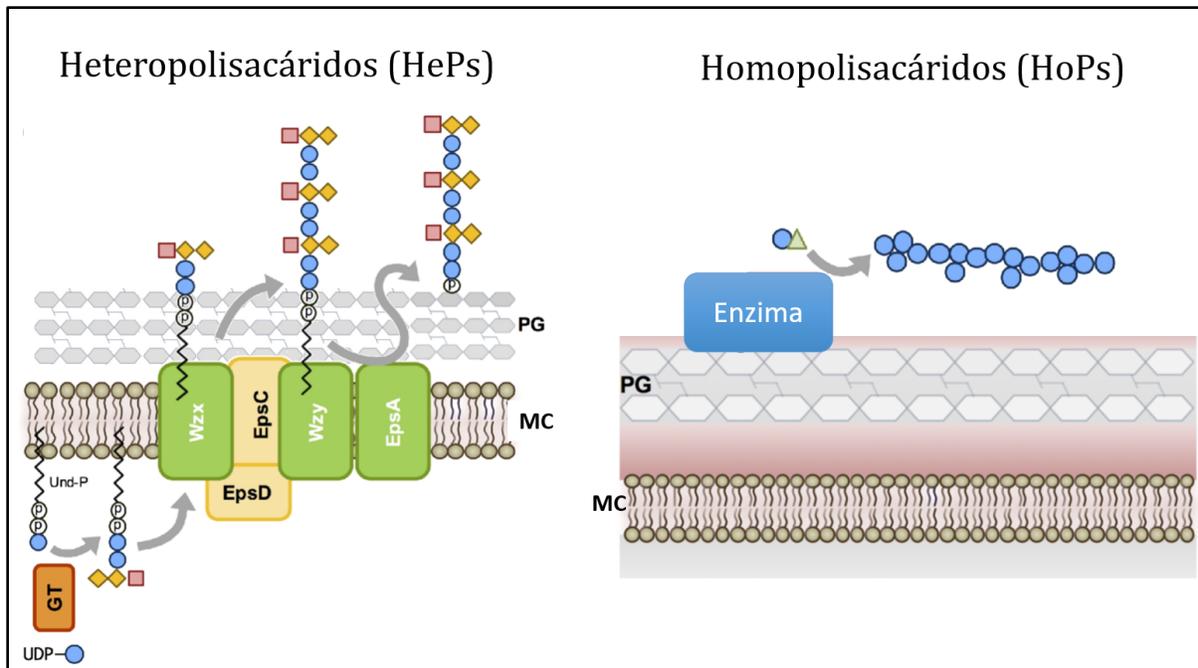
#### **4.2. Los Exopolisacáridos**

Los EPS están constituidos por largas cadenas de carbohidratos sintetizadas por diversos microorganismos, entre ellos las BAL. Se pueden encontrar asociados a la pared celular de las bacterias mediante fuerzas moleculares débiles, o bien libres en el ambiente alrededor de la bacteria (Lynch *et al.*, 2017). Su principal característica es la capacidad que tienen para retener agua, lo que ha sido aprovechado en la industria alimenticia, principalmente la panadera, para utilizarlos como reemplazo de otros hidrocoloides y grasas (X. Y. Chen *et al.*, 2016; Franck, 2002; Lynch *et al.*, 2017).

En la estructura de los EPS se pueden encontrar glucosa, fructosa, ramnosa y/o galactosa entre otros azúcares (Welman y Maddox, 2003). Como es de esperar, el tipo de azúcares presente, el enlace glicosídico, la configuración anomérica y el grado de polimerización (GP) contribuyen al conjunto de funciones biológicas que los EPS tienen en las bacterias y confieren a los EPS una importante diversidad de propiedades que se atribuyen finalmente a los productos fermentados; estas propiedades pueden ser explotadas de manera específica en el ámbito alimentario y farmacéutico (Zeidan *et al.*, 2017).

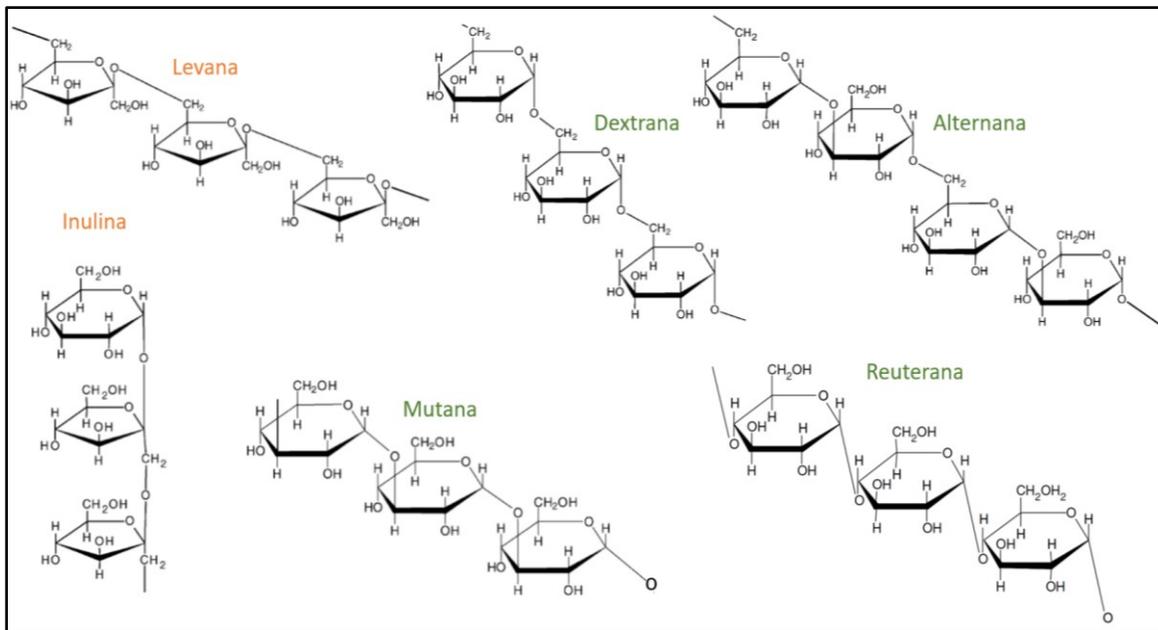
Desde el punto de vista estructural los EPS pueden ser lineales o ramificados y se clasifican como heteropolisacáridos (HePs) si están constituidos por más de un tipo de monosacárido o como homopolisacáridos (HoPs) al estar formados por un solo azúcar como monómero (Monsan *et al.*, 2001). En la biosíntesis de los HePs participan varias enzimas transferasas que utilizan la energía de azúcares activados (nucleótidos o nucleósidos di-fosfato) para sintetizar el polímero, además de requerir complejos sistemas celulares para ser excretados, pues generalmente son intracelulares (Figura 4.1). Esto trae como consecuencia un alto costo energético que resulta en bajas concentraciones de HePs ( $\leq 2-3$  g/L) en los cultivos (Caggianiello *et al.*, 2016; Zannini *et al.*, 2016).

Por otro lado, los HoPs son producidos por enzimas que se encuentran en la superficie de la célula o están solubles en el medio, de modo que el polímero es extracelular (Figura 4.1). Asimismo, para sintetizar un HoP se requiere de una sola enzima que utiliza la energía del enlace glicosídico de la sacarosa para llevar a cabo la reacción de transglicosilación, en la que la sacarosa funciona también como aceptor. Estas características permiten que tenga un bajo costo energético para la célula, de manera que se pueden producir cantidades que alcanzan decenas de gramos de HoPs por litro de medio de síntesis (Kumar *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 2017; Monsan *et al.*, 2001).



**Figura 4.1. Clasificación de los Exopolisacáridos (EPS) de las BAL.** Los HePs están compuestos de diversos monosacáridos, para ser sintetizados se requieren diversas enzimas (e.g. EpsD, EpsC, EpsA) que usan azúcares fosforilados (e. g. UDP) como sustrato y además necesitan mecanismos complejos y energéticamente costosos para ser secretados. Por otro lado, los HoPs utilizan sacarosa como sustrato, requieren una sola enzima para ser producidos y, al estar la enzima unida a la pared celular o secretada en el medio, se sintetizan fuera de la célula. PG = peptidoglicano, MC = Membrana citoplasmática (Modificado de Zeidan *et al.*, 2017).

De manera muy general, las BAL pueden producir HoPs de dos tipos: fructanas, compuestas de monómeros de fructosa y glucanas, compuestas de glucosa. Por el tipo de enlace que presentan (Figura 4.2), las fructanas pueden ser identificadas como levanas, si las fructosas se unen mayoritariamente con enlaces tipo  $\beta(2-6)$ ; o inulinas, cuando predominan los enlaces  $\beta(2-1)$ ; las  $\alpha$ -glucanas pueden ser dextranas, cuando al menos 50% de los enlaces son del tipo  $\alpha(1-6)$ , mutanas con al menos 50% de enlaces  $\alpha(1-3)$ , alternanas que contienen ambos enlaces alternados en su cadena principal y pueden tener ramificaciones; y por último las reuteranas, que tienen enlaces  $\alpha(1-4)$  y las ramificaciones en  $\alpha(1-6)$  (De Vuyst y De Vin, 2007; Monsan *et al.*, 2001; Zeidan *et al.*, 2017).



**Figura 4.2. Estructuras de los diversos HoPs producidos por BAL.** Fructanas: levana con enlaces  $\beta(2-6)$ , inulina con enlaces  $\beta(2-1)$ . Glucanas: dextrana con enlaces  $\alpha(1-6)$  principalmente, mutana con enlaces  $\alpha(1-3)$  principalmente, alternana con enlaces tanto  $\alpha(1-6)$  como  $\alpha(1-3)$  y reuterana con enlaces  $\alpha(1-4)$  (Modificado de: De Vuyst y De Vin, 2007).

Los HoPs tienen un nicho importante en la industria por sus propiedades tecnológicas: pueden ser utilizados como emulsificantes, espesantes, gelificantes, estabilizantes y excipientes. Además, son potencialmente prebióticos y actúan como fibra soluble, lo que los hace más atractivos para la industria alimenticia. En cuanto a las propiedades fisiológicas, los HoPs tienen un efecto estimulante sobre el sistema inmunológico de los mamíferos y actualmente se estudia su función como antioxidantes, agentes antitumorales y su capacidad para disminuir los niveles de colesterol en los humanos (Caggianiello *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 2017; Monsan *et al.*, 2001; Peshev y Van den Ende, 2014; Zeidan *et al.*, 2017).

La función biológica de los HoPs en las bacterias aún no ha sido esclarecida (Caggianiello *et al.*, 2016; Galle y Arendt, 2014). Las hipótesis existentes apuntan a funciones tales como el almacenamiento de energía, la protección contra el ambiente (pH, desecación, depredación), la adhesión de las células a superficies (cavidad oral, tracto intestinal) y/o la comunicación entre células y el exterior cuando se forman biopelículas (Caggianiello *et al.*, 2016; Galle y Arendt, 2014; Kumar *et al.*, 2007; Zeidan *et al.*, 2017). Es necesario realizar pruebas concluyentes para validarlas

siendo probable que dependiendo del HoP y el microorganismo, el polisacárido pueda cumplir varias de estas funciones.

### 4.3. Las Glicosiltransferasas

Las enzimas que catalizan la síntesis de HoPs en las BAL son primordialmente extracelulares o están asociadas a la pared celular. Estas enzimas utilizan sacarosa como sustrato y –como ya se señaló– aprovechan la energía de su enlace glicosídico para hacer la transferencia de uno de sus residuos (glucosa o fructosa) a un aceptor. En general existen tres posibles aceptores: agua (hidrólisis de la sacarosa), una segunda molécula de sacarosa o fructana en elongación (transferencia) o bien otra molécula agregada al medio de reacción como aglicona (glicosilación) o un alcohol (alcohólisis) (Kumar *et al.*, 2007; Monsan *et al.*, 2001). Las enzimas que transfieren glucosa se denominan glucansacarasas (GSs) y sus polímeros se conocen como glucanas, mientras que las que transfieren fructosa son fructansacarasas (FSs) y sintetizan fructanas (Zannini *et al.*, 2016). Aunque estos dos grupos de enzimas realizan reacciones similares sobre el mismo sustrato, no tienen identidad en secuencia de aminoácidos y poseen estructuras de muy diferente plegamiento (van Hijum *et al.*, 2006), como se detalla más adelante.

#### 4.3.1. Las Glucansacarasas

Las GSs son enzimas relativamente grandes, con masas moleculares que van de 120 a 200 kDa (van Hijum *et al.*, 2006) que pertenecen a la familia 70 de las glicosil-hidrolasas (GH70) según la clasificación de la base de datos CAZy (Cantarel *et al.*, 2009). Presentan una alta identidad en secuencia aminoacídica, de manera que los aminoácidos catalíticos se encuentran muy conservados y se sobrepone en las estructuras conocidas de GSs, que suman unas 60, mientras que las diferencias en la secuencia de cada enzima definen la especificidad de producto y por tanto las propiedades fisicoquímicas del mismo (Leemhuis *et al.*, 2013).

La organización general de estas enzimas incluye una región péptido señal, un dominio amino terminal altamente variable entre las propias GSs, el dominio catalítico y un dominio C-terminal de unión al polímero (Monsan *et al.*, 2001). En cuanto a su estructura tridimensional, hasta la fecha

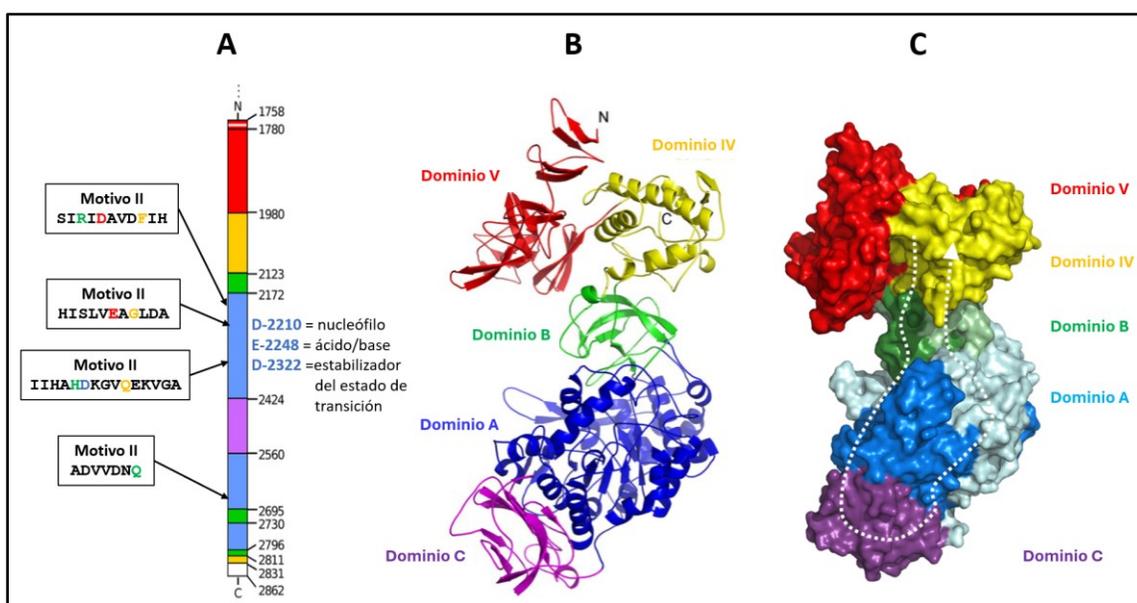
se han resuelto cristales de 6 enzimas heterólogas y truncadas, mismas que se reportan en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1. Enzimas de tipo Glucansacararas con estructura resuelta.**

| Tipo                | Nombre    | Origen  | Referencia                         |
|---------------------|-----------|---|------------------------------------|
| Dextransacarasa     | GTF180-ΔN | <i>Lactobacillus reuteri</i>                  | Vujičić-Žagar <i>et al.</i> , 2010 |
| Mutansacarasa       | GTF-SI    | <i>Streptococcus mutans</i>                   | Ito <i>et al.</i> , 2011           |
| Reuteransacarasa    | GTF-A-ΔN  | <i>Lactobacillus reuteri</i>                  | Pijning <i>et al.</i> , 2012       |
| Dextransacarasa     | DSR-MA2   | <i>Leuconostoc citreum</i> NRRL B-1299        | Claverie <i>et al.</i> , 2017      |
| Alternansacarasa    | ASRA2     | <i>Leuconostoc citreum</i> NRRL B-1355        | Molina <i>et al.</i> , 2020        |
| Glucanotransferasa* | GtfBΔN    | <i>Limosilactobacillus fermentum</i> NCC 3057 | Yang <i>et al.</i> , 2022          |

\* usa almidón como sustrato

En todas las estructuras de GSs cristalizadas es posible observar los 5 dominios ya mencionados, además de su particular plegamiento en forma de U, de modo que los extremos C y N terminal se acercan, mientras la región catalítica se encuentra en el fondo de la estructura (Figura 4.3).



**Figura 4.3. Diferentes representaciones de la estructura de la dextransacarasa truncada (1758-2862 aa) DSR-E de *Leuconostoc citreum* NRRL-1299** A) Esquema de la secuencia primaria de la proteína, indicando los motivos característicos de la familia GH70. B) Representación en caricatura de la estructura cristalográfica de la enzima (PDB: 3TTO). C) Representación de la estructura tridimensional de la enzima, donde se observa el característico arreglo en forma de U de las proteínas de la familia GH 70. La región catalítica de la enzima se encuentra en el fondo de la estructura y está conformada por los dominios C (morado), A (azul) y B (verde). (Figura modificada de Brison *et al.*, 2012).

La región catalítica de las GS está conformada por los dominios A, B y C –característica que comparten con las enzimas de la familia GH13– y estos están flanqueados por los dominios IV y V. Los dominios A, B y C están estructurados en un barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> en el fondo del cual se ubica el sitio activo compuesto por tres residuos muy conservados: un aspartato (D) que funciona como nucleófilo catalítico para formar el complejo enzima-sustrato, un glutamato (E) que funciona como catalizador ácido/base y un segundo aspartato (D) que funciona como estabilizador del estado de transición. Las enzimas de la familia GH70 poseen cuatro motivos altamente conservados (Figura 4.3A y Tabla 4.2) del mismo modo que las enzimas de la familia GH13, aunque en diferente orden, ya que en la familia GH70 los motivos II, III y IV preceden al motivo I (MacGregor *et al.*, 1996; Passerini *et al.*, 2015). Este hecho se hace patente cuando se analizan los resultados de un alineamiento múltiple de enzimas de la familia GH70 (Tabla 4.2), donde se pueden observar los aminoácidos altamente conservados que conforman a los motivos conservados y la ubicación de los residuos catalíticos en la secuencia de los motivos: en rojo los residuos catalíticos D y E ubicados en los motivos II y III; en el motivo IV se encuentra el residuo D, que funciona como estabilizador está resaltado en azul; además, se pueden observar los sitios -1 y +1 de unión a la sacarosa marcados en amarillo y verde respectivamente.

Tabla 4.2. Alineamiento múltiple de secuencias de enzimas de la familia GH70, que muestra la conservación de los dominios donde se hallan los residuos catalíticos (modificado de Passerini *et al.*, 2015).

| ID GenBank | Enzima   | Especificidad*                                      | Motivo II        | Motivo III        | Motivo IV            | Motivo I     |
|------------|--|---|------------------|-------------------|----------------------|--------------|
| AAC63063.1 | GTF-I<br><i>Streptococcus downei</i><br>MFe28              | $\alpha(1\rightarrow3)$                             | 449 SIRVDAVDNVD  | 486 HVSIVEAWSN    | 559 FARAHDSVQDLIRD   | 931 ADWVPDQ  |
| BAA02976.1 | GTF-I<br><i>Streptococcus sobrinus</i>                     |   | 443 SIRVDAVDNVD  | 480 HVSIVEAWSN    | 553 FARAHDSVQDIIRD   | 925 ADWVPDQ  |
| AAA88588.1 | GTF-B<br><i>Streptococcus mutans</i><br>GS-5               |   | 1011 SIRVDAVDNVD | 1048 HLSILEAWSN   | 1120 FIRAHDSVQDLIAD  | 1488 ADWVPDQ |
| AAU08015.1 | GTF-A<br><i>Limosilactobacillus reuteri</i>                | $\alpha(1\rightarrow4)/$<br>$\alpha(1\rightarrow6)$ | 1020 SVRVDAVDNID | 1056 HINILEDWNSHA | 1128 FVRAHDNNSQDQIQN | 1508 ADWVPDQ |
| AAY86923.1 | GTF-O<br><i>Limosilb. reuteri</i>                          |   | 1020 SVRVDAVDNID | 1056 HINILEDWNSS  | 1128 FIRAHDNNSQDQIQN | 1168 ADWVPDQ |
| CAB65910.2 | ASR<br><i>L. mesenteroides</i>                             | $\alpha(1\rightarrow3)/$<br>$\alpha(1\rightarrow6)$ | 631 GIRVDAVDNVD  | 668 HLSILEDWNGK   | 762 FVRAHDYDAQDPIRK  | 1168 ADWVPDQ |
| ABQ83597.1 | GTF-W<br><i>Limosilb. reuteri</i><br>subsp. <i>reuteri</i> | $\alpha(1\rightarrow6)$                             | 748 GFRVDAADNID  | 785 HLVYNEGYHSG   | 568 FVTNHDQR-QNVIHQ  | 1216 EDLVMNQ |
| AAU08003.2 | GTF-ML4<br><i>Limosilb. reuteri</i>                        | $\alpha(1\rightarrow6)$                             | 1012 GFRVDAADNID | 1049 HLSYNEGYHSG  | 1121 FVTNHDQR-KNLINR | 1479 EDIVMDQ |
| ABF85832.1 | DSR-CB4<br><i>L. mesenteroides</i> B-1299CB4               | $\alpha(1\rightarrow6)$                             | 526 GIRVDAVDNVD  | 563 HLSILEDWSHN   | 636 FVRAHDSEVQTVIAQ  | 1001 ADWVPDQ |
| CAB76565.1 | DSR-C<br><i>L. mesenteroides</i><br>NRRL B-1355            | $\alpha(1\rightarrow6)$                             | 498 GIRVDAVDNVD  | 535 HLSILEDWSHN   | 608 FVRAHDSEVQTVIAQ  | 973 ADWVPDQ  |
| AAD10952.1 | DSR-S <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F                  | $\alpha(1\rightarrow6)$                             | 547 GIRVDAVDNVD  | 584 HLSILEDWSHN   | 657 FVRAHDSEVQTVIAQ  | 1023 ADWVPDQ |
| AAU08001.1 | GTF-180<br><i>Limosilb. reuteri</i>                        |   | 1021 GIRVDAVDNVD | 1058 HINILEDWGWD  | 1131 FVRAHDSNAQDQIRQ | 1503 ADWVPDQ |

\*(enlaces de la glucana que produce la enzima)

El dominio IV tiene un plegamiento particular que era desconocido hasta la resolución de los primeros cristales de las GSs. Se especula que este dominio funciona como un muelle que acerca y aleja el sitio activo del dominio V (Claverie *et al.*, 2020; Leemhuis *et al.*, 2013). Por último, el dominio V está relacionado con la unión de la enzima al glucano, el mecanismo de polimerización y el control del tamaño del polímero (Leemhuis *et al.*, 2013; Passerini *et al.*, 2015).

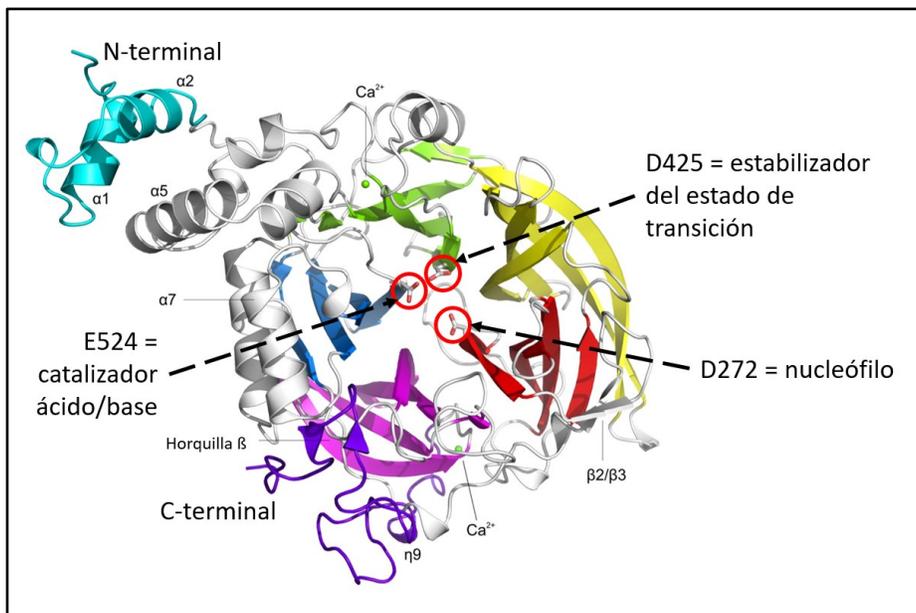
Las GS son producidas principalmente por BAL de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Fructibacillus* entre otros. Es interesante señalar que en la literatura se reporta que por lo general la expresión de estas enzimas se induce con sacarosa (como en los casos de *L. mesenteroides* NRRL B512F, B-1142 y B-1355), aunque existen reportes de otros casos en los que se expresan de manera constitutiva, como en *Streptococcus mutans* (Leemhuis *et al.*, 2013; Monsan *et al.*, 2001). Como caso curioso, recientemente se ha caracterizado una GS de tipo 4,6- $\alpha$ -glucanotransferasa que sintetiza un glucano de alto peso molecular con enlaces  $\alpha(1-4)$  y  $\alpha(1-6)$  alternados y proviene de una bacteria Gram-negativa, fijadora de nitrógeno: *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003, lo que la convierte en la primera enzima de la familia GH70 proveniente de una Gram-negativa (Gangoiti *et al.*, 2016).

#### 4.3.2. Las Fructansacararas

Las FSs pertenecen a la familia 68 de las glicosilhidrolasas (GH68) y se clasifican en levansacararas o inulosacararas según el producto que sintetizan y (Zeidan *et al.*, 2017). En el caso de las inulosacararas solo se han encontrado en BAL, mientras que las levansacararas tienen una distribución más amplia y se han encontrado en BAL, bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, plantas y hongos (van Hijum *et al.*, 2006). Aunque hay enzimas más pequeñas, la masa molecular de las FSs provenientes de las BAL tiende a estar entre 90 y 180 kDa, como en el caso de la levansacarasa de *Streptococcus salivarius* con una masa molecular de 175 kDa, la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28 con 170 kDa o la inulosacarasa de *Lactobacillus johnsonii* con 88 kDa (Olivares-Illana *et al.*, 2002; Vallejo-García *et al.*, 2023; van Hijum *et al.*, 2006).

Como se muestra en la Figura 4.4, las FS bacterianas tienen una estructura general con cuatro regiones: (i) un péptido señal (cuando provienen de bacterias Gram-positivas), (ii) una región

amino muy variable en tamaño y secuencia, (iii) un centro catalítico bien conservado en todos los miembros de la familia GH68, generalmente de unos 450-500 aminoácidos y (iv) una región C-terminal de longitud variable que puede incluir en algunos casos un dominio de unión a la pared celular cuando la enzima proviene de bacterias Gram positivas (van Hijum *et al.*, 2006). Por su tamaño, las FS de las BAL son enzimas multidominio mientras que las enzimas pequeñas de otros microorganismos y plantas tienden a ser unidominio como en el caso de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* 168 con 50 kDa y *Zymomonas mobilis* ZM1 y 47 kDa (LeBrun y van Rapenbusch, 1980; Song *et al.*, 1993).



**Figura 4.4.** Estructura 3D de la inulosacarasa truncada (desde 145 a 708 aa) *InuJ* de *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (PDB: 2YFR). La propela del dominio catalítico está formada por 5 hojas β (en colores rojo, amarillo, verde, azul y rosa). Los residuos catalíticos están señalados en círculos rojos. El dominio N-terminal se muestra en color azul claro y el C-terminal en morado (Modificado de: Pijning *et al.*, 2011)

El dominio catalítico de las FSs tiene una topología de hélice formada por 5 hojas beta con un sitio catalítico cargado negativamente, conformado por tres residuos muy conservados en secuencia primaria que se sobrepone al alinear las estructuras conocidas: un aspartato (D) que funciona como nucleófilo catalítico, un segundo aspartato (D) que estabiliza el estado de transición y contribuye a la actividad de la enzima y por último un glutamato (E) que funciona como

catalizador ácido/base (Lammens *et al.*, 2009; van Hijum *et al.*, 2006). El dominio catalítico de las FSs bacterianas tiene hasta 11 motivos conservados, cuyas funciones se describen en la Tabla 4.3 (van Hijum *et al.*, 2006; Velázquez-Hernández *et al.*, 2009).

**Tabla 4.3. Función de los motivos conservados en las enzimas bacterianas de la familia GH68\***

| Número del motivo | Secuencia | Función   |
|-------------------|-----------|---|
| I                 | VWDSW     | Nucleófilo catalítico   |
| II                | EWSGS     | Sitio +1 de unión a sacarosa  |
| III               | DG        | Residuo relacionado con el reconocimiento del aceptor                 |
| IV                | LFYTD     | Sitio +2 de unión a sacarosa  |
| V                 | RDP       | Sitio catalítico, estabiliza el estado de transición                  |
| VI                | YLVFE     | Hidrólisis de la sacarosa y transfructosilación                       |
| VII               | PLI       | Región conservada, pero sin función definida                          |
| VIII              | DEIER     | Sitio catalítico, catalizador ácido base                              |
| IX                | YLFT      | Región conservado en FS bacterianas                                   |
| X                 | YKPLN     | Región conservada en GH68   |
| XI                | TYS       | Sitio que orienta el residuo nucleofílico para la transfructosilación |

\*Tomada de: Velázquez-Hernández *et al.*, 2009.

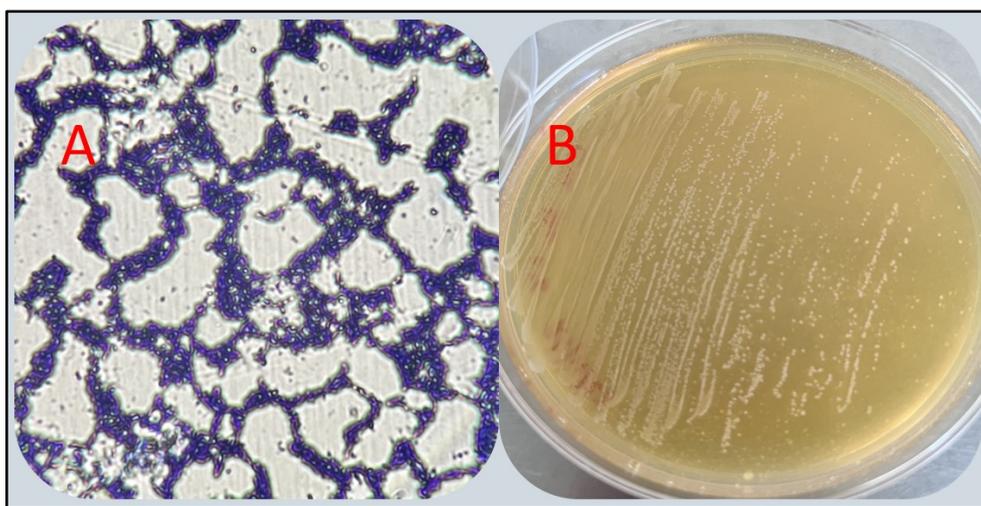
Se han encontrado y caracterizado FSs en microorganismos provenientes de alimentos, como son las BAL de los géneros *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Weissella* y *Leuconostoc* (Anwar *et al.*, 2008; Claverie *et al.*, 2020; Monsan *et al.*, 2001; Morales-Arrieta *et al.*, 2006), además de otras bacterias Gram-positivas de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Priestia*. También se han reportado en bacterias ácido acéticas (BAA) de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Asaia*, *Kozakia* y *Neoasaia*. Además, es posible hallarlas en cepas de bacterias Gram-negativas del género *Zymomonas* y en algunas arqueas halofílicas de los géneros *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Natronococcus*, *Halalkalicoccus*, *Halobacteriales* y *Halomicrobium*. También es frecuente hallar enzimas FSs (principalmente levansacarosas) en bacterias patógenas como *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Clavibacter*, *Serratia* y *Rahnella*, en las que la levana parece tener un rol clave en la formación de biopelículas y la colonización en plantas (Monsan *et al.*, 2001; Morales-Arrieta *et al.*, 2006; Vallejo-García *et al.*, 2023; Velázquez-Hernández *et al.*, 2009; Versluys *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018). Como sucede con la inducción de GS, en la mayoría de los casos la expresión de las FSs ocurre también con sacarosa (Morales-

Arrieta *et al.*, 2006; Olivares-Illana *et al.*, 2003), aunque existen reportes de FSs que parecen ser constitutivas (Bivolarski *et al.*, 2013; Smith y Zahnley, 1999).

#### 4.4. El género *Leuconostoc*

*Leuconostoc* es el género bacteriano que se encuentra en mayor proporción en etapas iniciales e intermedias de los procesos de fermentación en alimentos (Shin y Han, 2015). Es responsable de la producción de ácido láctico y de CO<sub>2</sub>, además de compuestos que aportan sabor y aroma, así como de exopolisacáridos, sin dejar de lado su potencial probiótico (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004).

Las especies pertenecientes al género *Leuconostoc* comparten con las BAL muchas de sus características, aunque presentan otras particularidades. Su forma es ovoide y usualmente se arreglan en pares, tríos o cadenas cortas; son mesófilas, ya que prefieren las temperaturas medias para crecer (20-30°C); son no acidófilas, pues necesitan pH iniciales entre 6 y 7; son anaerobias facultativas; no proteolíticas; son también heterofermentativas, produciendo principalmente ácido láctico, etanol, CO<sub>2</sub>, y en presencia de un aceptor de electrones, ácido acético; pueden producir también algunos ácidos grasos (mirístico, palmítico, palmitoleico y oleico), diacetilo y bacteriocinas; intrínsecamente son resistentes a la vancomicina y presentan un %G+C en su ADN de entre 37 a 45 (Björkroth *et al.*, 2014).



**Figura 4.5. Fotografías de *L. mesenteroides* ATCC 8293.** A) Vista al microscopio 100X de células de la cepa teñidas con el método de Gram. B) Colonias de la cepa en placa de Lm y sacarosa 2%.

El nicho natural de *Leuconostoc* son las raíces y las hojas de las plantas de donde se propagan con facilidad a material vegetal, leche, los utensilios comunes de recolecta y consecuentemente los alimentos fermentados (Björkroth *et al.*, 2014). No se consideran parte de la microbiota humana, aunque se han encontrado algunas cepas en fluidos corporales (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004). Aunque las BAL de este género han estado ligadas a la descomposición de algunos alimentos y en casos muy raros a infecciones, su contacto milenario con los seres humanos es la mayor evidencia de inocuidad, lo que ha permitido que sean reconocidas como seguras (Generally Recognized as Safe (GRAS) (Björkroth *et al.*, 2014; Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004; Ogier *et al.*, 2008).

Para crecer, *Leuconostoc* requiere medios ricos como el MRS, el extracto de levadura o el extracto de carne, suplementados con factores de crecimiento como los aminoácidos leucina (Leu), isoleucina (Ile), valina, (Val), glutamina (Glu) y serina (Ser). (Björkroth *et al.*, 2014; Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004; Shin y Han, 2015). No existe un medio estándar para crecer todas las cepas conocidas del género, sino que se han desarrollado a partir de los requerimientos específicos de cada especie en particular (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004).

Las bacterias pertenecientes al género *Leuconostoc* fueron descritas por primera vez a mediados del siglo XIX cuando se comenzó a estudiar un fenómeno que se veía frecuentemente en los ingenios azucareros: la formación de una capa de materia gelatinosa sobre las superficies de las prensas, filtros y contenedores de jugo de remolacha, que generaba obstrucciones en las tuberías. En 1874, el químico alemán Carles Scheibler analizó esta sustancia y determinó que era un carbohidrato con una fórmula empírica  $C_6H_{10}O_6$  que tenía un gran poder rotatorio, por lo que lo llamó dextrana (Naessens *et al.*, 2005). A partir de esta materia gelatinosa el micólogo francés Phillippe van Tieghem pudo aislar y cultivar un microorganismo: la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. Este nombre le fue asignado al observar las células en el microscopio y considerarlas parecidas a las cianobacterias *Nostoc*, nombre al que se añadió el prefijo *Leuco* por su color blanco. Por otro lado, "*mesenteroides*" se refiere a las estructuras gelatinosas apiladas en forma piramidal que forma la bacteria (van Tieghem, 1878). La fisiología de la bacteria y la composición química de la sustancia viscosa fueron caracterizadas a principios del siglo XX (Crow, 1922). Pero no fue

sino hasta el año 1941 que se demostró que un extracto del cultivo de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* y esterilizado por filtración, podía producir dextrana, lo que revelaba la existencia de una enzima que sería la responsable de sintetizar el polímero (Hehre y Sugg, 1941). La dextrana adquirió gran importancia a mediados del siglo XX, cuando se encontró que en solución, el polímero de un peso molecular de 75,000 Da (dextrana clínica) podría emplearse como sustituto de plasma (Grönwall y Ingelman, 1945). Por esa razón la enzima, ahora denominada dextransacarasa, fue objeto de mucho interés y estudio para determinar las mejores condiciones de reacción para la producción del polímero (Tsuchiya *et al.*, 1952). Paralelamente, el interés por la dextrana desencadenó una búsqueda de cepas capaces de producir eficientemente el polímero a nivel industrial, surgiendo la cepa que ahora se conoce como *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F, cepa que fue estudiada extensivamente. Al mismo tiempo el desarrollo de múltiples aplicaciones para la dextrana, impulsó la búsqueda de enzimas con especificidades complementarias en bacterias del mismo género. Es así como hasta la fecha se han caracterizado decenas (unas 60, según la base de datos CAZy) de GTFs provenientes de cepas de *Leuconostoc* que sintetizan HoPs de muy diversas estructuras y tamaños como se describió anteriormente.

Durante la segunda mitad del siglo pasado, dentro de las cepas estudiadas del género *Leuconostoc* y de otros géneros, solía asociarse el HoP producido (tamaño y estructura química) al microorganismo productor, y consecuentemente a la GTF presente en ese microorganismo. No es sino hasta este siglo, que ha quedado claro que existen cepas con la capacidad de producir más de una GTF, e incluso cepas que poseen enzimas tanto FS como GS (Argüello-Morales *et al.*, 2000; Bivolarski *et al.*, 2013; Côté y Robyt, 1982; Morales-Arrieta *et al.*, 2006; Passerini *et al.*, 2015). Con el auge de la metagenómica y la secuenciación masiva, se ha puesto de manifiesto la existencia de cepas multi productoras, como en el caso de las cepas de *L. mesenteroides* B512f y Lm17 que posee dos GTFs en su genoma, la cepa *L. mesenteroides* URE13 que posee tres; cuatro en caso de la cepa *L. mesenteroides* P45 y cinco GTFs las cepas *L. mesenteroides* KFRI-MG y WiKim32. En este último caso, la cepa posee 3 GS y 2 FS.

#### 4.5. Regulación de las GTFs

Existen pocos trabajos enfocados en la regulación de la expresión de las GTFs en bacterias lácticas, la mayoría de los cuales se refieren a *Streptococcus mutans* bacteria de la microbiota salival y a las diversas enzimas que produce, dado que tienen una participación preponderante en la formación de biopelículas y por lo tanto, están estrechamente ligadas al desarrollo de caries dental (Hudson y Curtiss, 1990; Y. Li y Burne, 2001).

En el caso de *Leuconostoc*, a pesar de la importancia de las cepas en la fermentación de alimentos y de las propiedades benéficas de los HoPs, se conoce poco sobre la fisiología de las bacterias, menos aún sobre la regulación de las GTFs, como tampoco se tiene certeza del papel biológico de los HoPs. Aunque se han caracterizado decenas de GTFs provenientes de este género, en la mayoría de los casos los análisis se realizan con proteínas heterólogas, de modo que su rol biológico ha quedado relegado y son pocos los trabajos sobre el mecanismo de regulación de las GTFs en el microorganismo.

Pueden encontrarse solo algunos análisis sobre la expresión de las GTFs y su sensibilidad a la utilización de diferentes monosacáridos como FC durante el crecimiento del microorganismo. En 1997, Dols *et al.*, demostraron que el mecanismo de internalización de carbohidratos que utiliza *Leuconostoc mesenteroides* ATTC 1299 (renombrado *L. citreum* NRRL 1299) requiere de un sistema de permeasas, y que el uso de fructosa como FC durante el cultivo bloquea la producción de dextran-sacarosas. En el caso de la cepa *L. mesenteroides* B512f, se demostró que la sacarosa es un inductor atípico de la dextran-sacarasa que produce la cepa y que la actividad de la misma es menor al usar glucosa o fructosa como FC (Quirasco *et al.*, 1999). En el caso de la cepa *L. mesenteroides* URE13 que produce al menos dos GS y una FS, en la que se observó una disminución en la actividad de las enzimas al usar glucosa o fructosa en lugar de sacarosa como FC (Bivolarski *et al.*, 2013).

En *L. mesenteroides* NRRL B512F se ha comprobado que la sacarosa es el compuesto inductor de la síntesis de la enzima Dsr, aunque al parecer es un inductor atípico, ya que se requiere de una concentración muy alta (102 mM) y un tiempo largo de contacto (3 h) para la inducción (Quirasco

*et al.*, 1999). Por lo anterior, es probable que la regulación de esta enzima ocurra durante la transcripción. En trabajos posteriores, se demostró que la velocidad de transporte de las FC a través de la pared celular no influye en la inducción de la enzima (Ortega y Quirasco, 2005).

Para la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293, cuyo genoma está secuenciado y se sabe contiene varias secuencias correspondientes a levansacararas y dextransacararas (Olvera *et al.*, 2006), se ha demostrado que se puede inducir diferentes enzimas GTFs según la FC presente en el medio de cultivo. Se identificaron secuencias parecidas a genes reguladores de la expresión de las GTFs de *S. mutans*, pero se desconoce la función de estos genes, pues no pudieron obtenerse mutantes (Otero B., 2009).

Recientemente, el auge en las tecnologías de secuenciación y de la bioinformática ha permitido tener un conocimiento general de la regulación en muchos modelos bacterianos, usando cepas cercanas como referencia. En el caso de *Leuconostoc*, la información se ha incrementado exponencialmente en los últimos años: mientras que en 2016 había solo unas decena de genomas de cepas de *Leuconostoc* secuenciados, actualmente llegan ya a cerca de 500, de acuerdo con la base de datos de NCBI, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/leuconostoc>) consultada en agosto de 2023. Por otro lado, grupos que se dedican al estudio de la regulación genética de bacterias han hecho esfuerzos bioinformáticos para construir regulones transcripcionales a partir de estudios de genómica comparativa. Tal es el caso de la base de datos RegPrecise (Novichkov *et al.*, 2013) donde se hallan registrados y agrupados taxonómicamente los posibles Factores de Transcripción (FTs) que intervienen en la regulación de bacterias. En esta base ha sido posible encontrar los FTs que participan en la regulación de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293, cuyo genoma fue el primero en ser secuenciado (Makarova *et al.*, 2006). Resulta interesante que el único FT relacionado con los carbohidratos en este modelo es el CcpA, lo que da una pista inicial sobre la regulación de las GTFs en las bacterias de género *Leuconostoc*.

#### 4.6. Antecedentes del grupo: Glicosiltransferasas en cepas de *Leuconostoc*

En el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Enzimas del IBT se ha tenido como línea de investigación la búsqueda y caracterización de enzimas con capacidad para producir fructanas o glucanas. Como parte de este esfuerzo, se han identificado enzimas GTFs de *Leuconostoc* aisladas de diversos nichos, así como de alimentos fermentados tradicionales mexicanos. De esta forma, se han identificado y caracterizado muchas enzimas tanto GS como FS con diversas propiedades de interés.

En trabajo conjunto con otros grupos, en 2003 Olivares-Illana *et al.*, identificaron una inulosacarasa (IsIA) en la cepa *Leuconostoc citreum* CW28 que se aisló del pozol, una bebida fermentada de maíz tradicional de la región sureste de México. La IsIA es una enzima de 165 kDa que se desactiva en condiciones ácidas ( $\text{pH} \leq 4$ ) y produce una inulina con una masa molecular promedio de 3000 kDa. Como parte de los esfuerzos para conocer el potencial de esta cepa, en 2016 el genoma de la bacteria fue secuenciado y anotado (Olvera *et al.*, 2017). En este genoma se identificó otra secuencia correspondiente a una GS, que ya se produjo heterológicamente y se está caracterizando.

En el pulque, otro producto fermentado tradicional, se han encontrado varias cepas de *Leuconostoc mesenteroides* (Escalante *et al.*, 2008; Riveros-Mckay *et al.*, 2014). Algunas de las cepas ya han sido analizadas en búsqueda de GTFs, como es el caso de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ que produce una dextransacarasa de aproximadamente 166 kDa, asociada a la pared celular e inducible por sacarosa (Chellapandian *et al.*, 1998).

En 2006 Morales-Arrieta *et al.*, identificaron una levansacarasa, denominada LevS, en la cepa *L. mesenteroides* NRRL B512F, cepa en la que se había identificado décadas atrás la dextransacarasa Dsr, de aplicación industrial. La enzima LevS tiene una masa molecular de 116 kDa y está constituida de 1022 aa; cuenta con tres dominios: el amino-terminal de 184 aa con un péptido-señal y una región variable, un dominio catalítico de 445 aa y un C-terminal de 392 aa. La enzima se pudo identificar en un cultivo donde se utilizó sacarosa como FC.

A partir de ese trabajo, se realizaron análisis en la secuencia de *L. mesenteroides* ATCC 8293 que estaba depositada en el Instituto Genómico del Departamento de Energía de EUA, en la que se hicieron búsquedas por alineamientos con la secuencia de LevS. Se identificaron así 6 secuencias que presentaban los dominios de las GTFs y dos dominios de unión a glucano. Se determinó que solo dos enzimas FSs se estaban expresando en el cultivo con sacarosa, LevC y LevL. Estas enzimas se expresaron heterológicamente y se caracterizaron, encontrando que su peso molecular es de 112 y 113 kDa respectivamente, con secuencias de 1015 y 1002 aa. Se demostró que ambas producen levana, aunque se desconocen las diferencias estructurales en detalle, y que, como muchas GTFs, tienden a ser auto-proteolíticas.

Pensando en la posibilidad de hacer selectiva la producción de las enzimas durante el crecimiento de las bacterias, Otero B. (2009) probó diferentes FC en el cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 y determinó la actividad global de las GTF que produce la cepa en cada FC, encontrando que las FS se expresan tanto en sacarosa como en fructosa, aunque en esta última con menor nivel de expresión.

Con esta experiencia y el uso de las recientes tecnologías de secuenciación masiva, nos propusimos en esencia a contribuir al entendimiento de la regulación de las GTFs en las bacterias del género *Leuconostoc* a través de estudios de fisiología microbiana y de transcriptómica, así como investigar el papel de los HoPs en la fisiología de las bacterias. En este contexto, investigar el potencial de una cepa para elaborar HoPs de manera específica y regulada, así como la relación entre los factores ambientales en las que se desarrolla, los genes que expresa y las enzimas que produce, permitiría que en algún momento sea posible dirigir el cultivo de una cepa de *L. mesenteroides* a la producción específica de HoPs a partir del conocimiento derivado del mecanismo de regulación y de la manipulación de las condiciones de su cultivo. Se eligió como modelo de estudio a la cepa *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293, pues además de contar con la secuencia de su genoma, posee seis genes de enzimas GTFs en su genoma: tres fructansacararasas y tres glucansacararasas.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Los exopolisacáridos de las bacterias ácido lácticas son muy apreciados en diversas industrias por su capacidad viscosificante y propiedades bioactivas. Estas propiedades dependen de la estructura de los polímeros y, a su vez, su estructura depende de la enzima GTF que lo sintetiza.

Las bacterias *Leuconostoc* tienen relevancia en la industria alimenticia por su capacidad para producir compuestos que contribuyen con el sabor y aroma de los alimentos fermentados y por su propiedad como GRAS. Una característica no explotada de estas bacterias, es su capacidad para sintetizar HoPs *in situ* gracias a las GTFs que estas bacterias producen. También es cierto que existen cepas que producen más de una GTF y que podrían enriquecer a los alimentos con sus HoPs específicos. Para poder aprovechar este potencial, es necesario conocer los factores que afectan la producción de las enzimas que sintetizan a los HoPs y que efecto tienen sobre su regulación.

A pesar de la importancia de *L. mesenteroides*, se sabe muy poco sobre la regulación de sus GTFs y el papel biológico de sus EPS. Dado que las hipótesis sobre la función de los EPS apuntan hacia la protección de la bacteria contra condiciones ambientales adversas, es posible que explorar la respuesta de las GTFs de la bacteria a estas condiciones, nos permitirá entender los elementos de regulación que intervienen sobre la expresión de las GTFs. Seleccionamos como factor variable, el uso de diferentes compuestos como FC, dado que las GTFs usan sacarosa para sintetizar los HoPs y la sacarosa funciona también como FC de la bacteria.

## 6. HIPÓTESIS

Existen mecanismos que regulan la expresión de las GTFs de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 que podrían verse afectados directamente por el uso de diferentes azúcares como FC.

## 7. OBJETIVOS

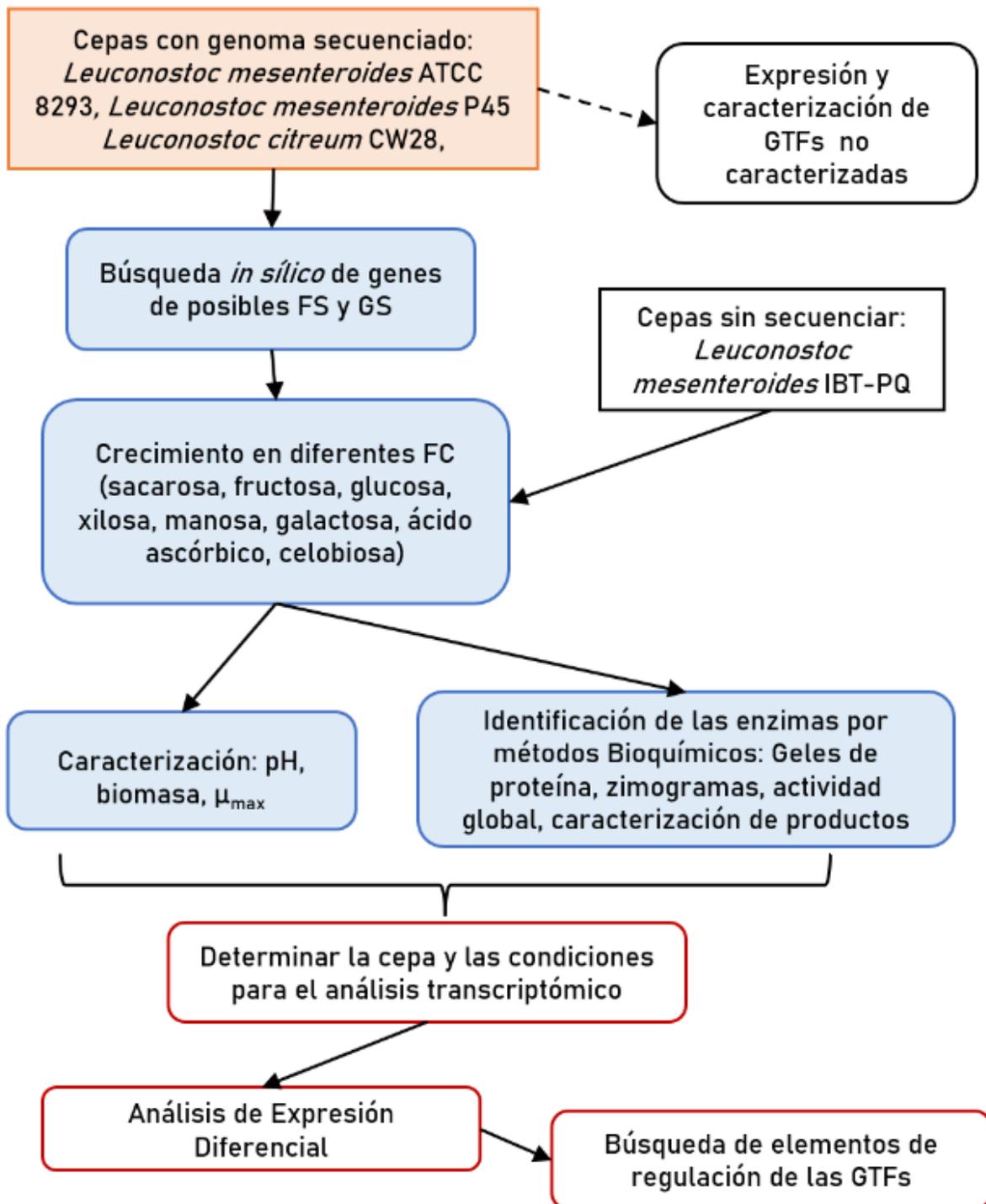
### 7.1. Objetivo general

Determinar si existe un efecto sobre la actividad y expresión de las enzimas glicosiltransferasas de *L. mesenteroides*, cuando se utilizan distintas FC como sacarosa, glucosa, fructosa, galactosa, manosa, celobiosa, xilosa o ácido ascórbico.

### 7.2. Objetivos particulares

- Seleccionar una cepa como modelo para el estudio experimental, con base en la cantidad de GTFs que se encuentren en su genoma, así como su capacidad para producirlas en sacarosa.
- Estudiar mediante análisis bioquímicos el comportamiento de la actividad de las GTFs de la cepa elegida, cuando se usan diferentes FC en su cultivo y escoger las condiciones más contrastantes para el análisis transcriptómico por RNA-Seq.
- Estudiar el comportamiento de la expresión de los genes de las GTFs identificados en las condiciones elegidas para el análisis por RNA-Seq.
- Determinar si existen relaciones entre la expresión de los genes de las GTFs y la FC utilizada.
- Estudiar las posibles vías de regulación en la expresión de las enzimas, con base en el análisis transcriptómico.

## 8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 9. METODOLOGÍA

### 9.1. Identificación de GTFs por identidad de secuencias y búsqueda de elementos de transcripción

Se realizó una búsqueda en los genomas conocidos de las cepas *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 (GenBank: GCA\_000014445.1), *Leuconostoc citreum* CW28 (GenBank: GCA\_002591805.1. ) y *Leuconostoc mesenteroides* P45 (GenBank: GCA\_000756355.1), usando la herramienta BLASTP de NCBI (Altschul *et al.*, 1990) y las secuencias de genes de enzimas que ya han sido caracterizadas. Cabe señalar que se trata de cepas ampliamente estudiadas en el grupo de trabajo. Las secuencias utilizadas se presentan en la Tabla 9.1.

Tabla 9.1. Enzimas utilizadas como plantados para la búsqueda *in silico* de las GTFs en los genomas de seleccionados.

| Glucansacarasa   |                                       |            |
|------------------|---------------------------------------|------------|
| Tipo             | Cepa                                  | ID         |
| Dextransacarasa  | <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F    | AAD1095.1  |
| Reuteransacarasa | <i>Limosilb. reuteri</i> 121          | OJI11530.1 |
| Alternansacarasa | <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-1355   | CAB65910.2 |
| Mutansacarasa    | <i>S. mutans</i> UA159                | P13470.2   |
| Fructansacarasa  |                                       |            |
| Tipo             | Cepa                                  | ID         |
| Levansacarasa    | <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F    | AAY19523   |
| Inulosacarasa    | <i>L. citreum</i> CW28                | AAO25086.1 |
| Inulosacarasa    | <i>Lactobacillus jonhsonii</i> NC 533 | Q74K42     |

La búsqueda de los motivos conservados de las GTFs se realizó con las secuencias de aminoácidos de las enzimas y la herramienta COBALT del NCBI (Papadopoulos y Agarwala, 2007) que permite realizar alineamientos de múltiples secuencias. La detección del péptido señal se realizó en el servidor de SignalP (v.5.0) (Petersen *et al.*, 2011) (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>, visitado en enero de 2019). El cálculo de la masa teórica de las GTFs y el punto isoeléctrico se realizó con la herramienta pI/Mw del servidor ExPasy (Gasteiger *et al.*, 2005) ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/), visitada en julio de 2019).

Se extrajeron las regiones río arriba a los genes de las GTFs (200 pb) por medio del programa Artemis (v.18.2.0) (Carver *et al.*, 2012), usando las secuencia de los genomas de las cepas de *Leuconostoc*. Las regiones río arriba se alimentaron al servidor BPROM de Softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>, visitado en junio de 2018, (Solovyev y Salamov, 2010) para localizar las secuencias de unión al factor de transcripción sigma70, -35 y -10.

## 9.2. Cultivo de bacterias *Leuconostoc* en diferentes FC

### 9.2.1. Cultivos con sacarosa

Las cepas *L. citreum* CW28, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293, *L. mesenteroides* IBT-PQ y *L. mesenteroides* P45 se reactivaron a partir de material liofilizado que se inoculó en medio líquido. El medio utilizado es medio *Leuconostoc* (en lo sucesivo medio Lm), con la composición que se muestra en la Tabla 9.2. Las fermentaciones se llevaron a cabo en una incubadora New Brunswick Scientific a 28 °C y 200 rpm. Todas las lecturas de densidad óptica (DO) relacionadas con el crecimiento del microorganismo, se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU650 a 600 nanómetros (nm). Las muestras se diluyeron con agua destilada en la proporción necesaria para poder ser medidas en el equipo.

**Tabla 9.2. Composición del medio de cultivo Lm\***

| <b>Función</b>             | <b>Compuesto</b>  | <b>Concentración (g/L)</b> |
|----------------------------|---|----------------------------|
| <b>Fuente de carbono</b>   | Sacarosa  | 20                         |
| <b>Fuente de nitrógeno</b> | Extracto de levadura  | 20                         |
| <b>Amortiguador</b>        | Fosfato dipotásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )       | 20                         |
| <b>Ajuste pH</b>           | Ácido fosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )           |                            |
| <b>Sales</b>               | Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)  | 0.2                        |
|                            | Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)    | 0.05                       |
|                            | Sulfato Ferroso (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)      | 0.01                       |
|                            | Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O) | 0.01                       |
|                            | Cloruro de sodio (NaCl)                                     | 0.01                       |
|                            | Agar**  | 20                         |

\*(Dols *et al.*, 1997)

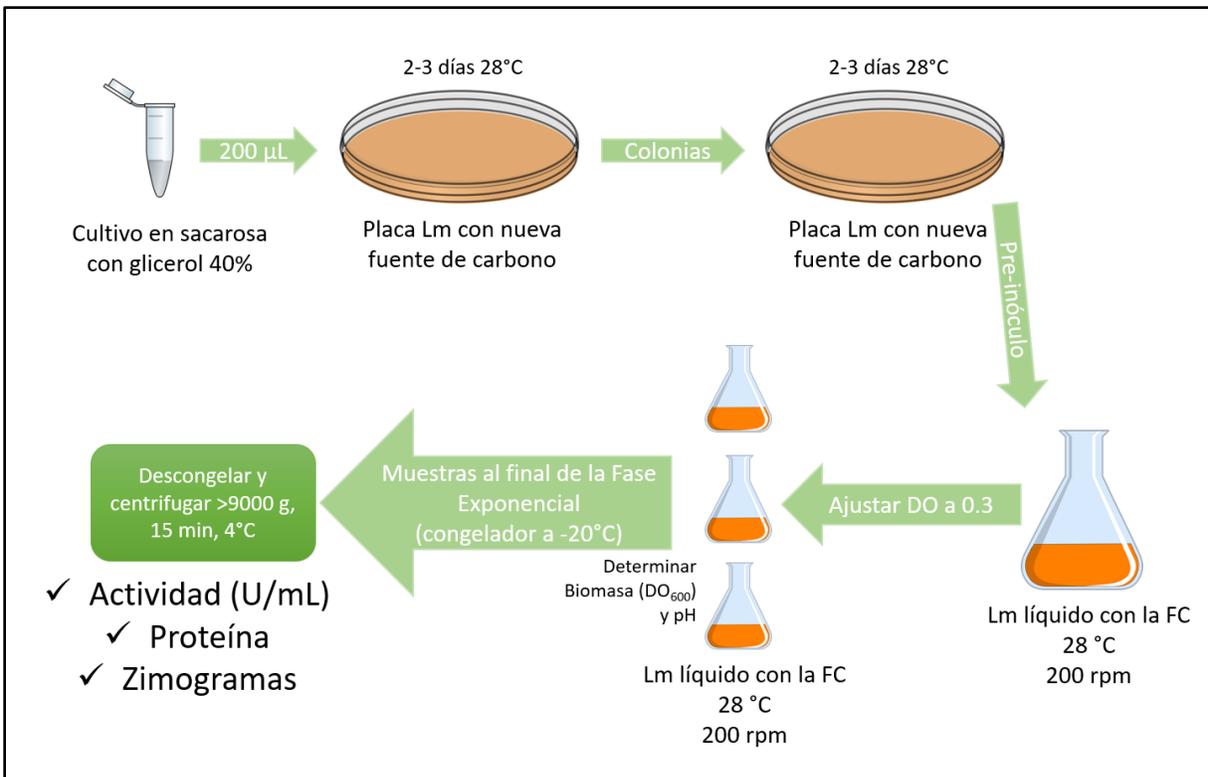
\*\* Para medio sólido

Se inocularon 50 mL de medio en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, con 500  $\mu$ L de cultivo almacenado en glicerol y se cultivaron por al menos 12 horas a 28°C y 200 rpm. Al final se comprobó la  $DO_{600nm}$  del cultivo y se usó para inocular 50 mL de medio estéril fresco, ajustando la  $DO_{600nm}$  inicial a 0.3. El cultivo nuevo se incubó en las mismas condiciones de temperatura y agitación. Cuando el cultivo alcanzó una DO correspondiente a la parte final de la fase exponencial, (es decir,  $DO_{600nm}$  de entre 6 y 8, dependiendo de cada cepa), se tomaron alícuotas de 500  $\mu$ L del medio a las que se adicionó glicerol 80% en proporción 1:1 para ser almacenadas a -80°C como reserva de células para realizar los experimentos.

#### 9.2.2. Estudio del efecto de la FC en el cultivo.

En estos experimentos, la sacarosa (59 mM) fue sustituida por fructosa, glucosa, xilosa, ácido ascórbico, galactosa, manosa o celobiosa en la misma concentración molar.

Para caracterizar el crecimiento de las células, primero se inoculó una caja Petri con medio sólido conteniendo la FC correspondiente con 200  $\mu$ L de células almacenadas en glicerol y se colocó en una incubadora de placas Quncy Lab 104-10 a 28°C. Al observar claramente la aparición de colonias, estas se utilizaron para inocular una nueva placa Petri con medio sólido y la FC correspondiente y se incubó en las mismas condiciones. Las colonias de esta segunda placa se usaron como inóculo para un cultivo en 50 mL de medio líquido, que se incubó por un período de 12 h a 28°C y 200 rpm. A su vez, con este cultivo se inóculo medio fresco ajustando la  $DO_{600nm}$  a 0.3. De este último se determinó  $DO_{600nm}$  y pH cada hora hasta llegar a la fase estacionaria y se tomaron muestras de 1 mL en tubos eppendorf. Las muestras se almacenaron a -20°C. Para los análisis posteriores las muestras fueron descongeladas en hielo y centrifugadas en un equipo Beckman Coulter a 9282 x g por 15 minutos a 4°C, para separar a las células del sobrenadante. Las células se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5. En la Figura 9.1 se ilustra el procedimiento para cambiar la FC y obtener las muestras.



**Figura 9.1. Pasos para cambiar la FC y obtener muestras para los análisis bioquímicos.** Para realizar los análisis bioquímicos, se obtuvieron muestras del final de la fase exponencial.

### 9.2.3. Cultivos en condiciones anaerobias

Para cultivos anaerobios se usaron botellas de vidrio de 150 mL en las que se colocaron 30 mL de medio conteniendo extracto de levadura y fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ) en las concentraciones del Lm y ajustados a pH 6.9 con ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ). Para conseguir un ambiente libre de oxígeno, las botellas se gasearon con una mezcla 80:20 de  $N_2:CO_2$  por 25 minutos en la fase líquida y por 30 min en la fase gaseosa para reemplazar el oxígeno de ambas fases. En seguida se cerraron con tapones de caucho y anillos de aluminio. Los fosfatos y cloruros del medio Lm fueron preparados por separado y colocados en botellas que se gasearon igualmente. Por último, todas las botellas fueron esterilizadas en autoclave a  $116^\circ C$  por 26 min. La sacarosa (60 % w/v) se esterilizó por microfiltración (filtro para jeringa de  $0.22 \mu m$ ); se colocó en una botella estéril y finalmente fue gaseada con  $CO_2$  (8 min por cada 10 mL de sacarosa). Se prepararon botellas estériles con  $CO_2$  para desplazar el oxígeno de las jeringas estériles usadas para preparar el medio y para tomar

muestras. Se utilizó medio Lm, con las características de la Tabla 9.2 y con sacarosa a una concentración final de 20 g/L. Para asegurar que la cepa respondiera al cambio en un medio sin O<sub>2</sub>, se realizaron 4 pasos de cultivo en las botellas cerradas. Como control, se usaron botellas del mismo tamaño y forma con tapón de algodón y gasa, efectuando también 4 pasos. Para cada caso (aerobio y anaerobio) los cultivos se hicieron por duplicado. Se tomaron muestras con jeringas estériles para determinar crecimiento y pH. Al final de cada ciclo de cultivo se cosecharon células por centrifugación y se tomaron muestras de sobrenadante centrifugado. La centrifugación se hizo en condiciones aeróbicas. Se determinó la actividad total de las células cosechadas y el sobrenadante de los cultivos y se utilizaron las células para realizar zimogramas.

### 9.3. Actividad global

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que produce una  $\mu\text{mol}$  de producto en un minuto. Para analizar a las GTFs, una forma rápida de medir la **actividad global** que incluye la actividad transferasa y la hidrolítica, es a través de la cuantificación de la liberación de azúcares reductores (AR). La actividad determinada con este método permite tener una referencia para estudios comparativos pues no es una medición precisa.

El poder reductor se determina mediante el método de ácido 3, 5 dinitrosalisílico (DNS) (Miller, 1959). Se generó una curva estándar con soluciones equimoleculares de glucosa y fructosa en concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 g/L que se utilizó después para calcular la actividad de la enzima.

Para realizar pruebas de actividad global de las diversas glicosiltransferasas, se tomaron muestras de medio de cultivo durante las fermentaciones a las cuales se midió la actividad enzimática. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C y 650 rpm en tubos Eppendorf de 1.5 mL, con un volumen de 600  $\mu\text{L}$  compuesto de 100  $\mu\text{L}$  de sacarosa en solución (600 g/L) y 500  $\mu\text{L}$  de muestra, ya fuera el medio de cultivo directo o células diluidas en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.5.

Se tomaron muestras de 50  $\mu\text{L}$  a los 0, 2, 5, 7 y 10 minutos, que se mezclaron con 50  $\mu\text{L}$  de DNS en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras se calentaron en agua en ebullición por 5 minutos y posteriormente se diluyeron con 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Se leyó la absorbancia de las muestras

a 540 nm utilizando como blanco el tiempo inicial (tiempo 0). Las muestras fueron diluidas, en caso de ser necesario, para poder tener lecturas confiables en el espectrofotómetro (valores de 0.1 a 0.9). A partir de los datos obtenidos se calculó la pendiente ( $m_x$ ) de la recta ajustada usando  $x$ =tiempo (min);  $y$ = absorbancia ( $DO_{540nm}$ ) Se utilizaron las siguientes ecuaciones para calcular la velocidad ( $v_i$ ) de la reacción:

$$\frac{m_x \left( \frac{\text{Absorbancia}}{\text{min}} \right)}{m_{STD} \left( \frac{\text{Absorbancia}}{\text{mg AR/mL}} \right)} = v_i \left( \frac{\text{mg AR}}{\text{min} * \text{mL}} \right)$$

Donde  $m_{STD}$  es la pendiente de la curva estándar y  $m_x$  es la pendiente (velocidad de reacción) de la muestra analizada.

La velocidad puede entonces convertirse en unidades de actividad enzimática:

$$v_i \left( \frac{\text{mg AR}}{\text{min} * \text{mL}} \right) * \left( \frac{1 \text{ mmol}}{180 \text{ mg AR}} \right) * \left( \frac{1000 \mu\text{mol}}{1 \text{ mmol}} \right) * \left( \frac{\text{vol. de reacción } \mu\text{L}}{\text{vol. de muestra } \mu\text{L}} \right) * (FD) = \frac{U}{\text{mL}} \text{ ó } \frac{\mu\text{mol AR}}{\text{min} * \text{mL}}$$

Donde FD corresponde al factor de dilución empleado en las muestras, para lectura en el espectrofotómetro

## 9.4. Análisis de carbohidratos

### 9.4.1. TLC

La cromatografía en placa fina (thin layer chromatography, TLC) permite determinar de manera cualitativa la evolución de una reacción. Con este método es posible comprobar la existencia de fructooligosacáridos (FOS) en la reacción, determinar su grado de polimerización (GP) y hacerse una idea del consumo de la sacarosa en la misma, así como de la aparición de monosacáridos (glucosa y/o fructosa). Para realizarla se utilizaron placas de aluminio cubiertas con gel de sílice Alugram Xtra Sil G que se desarrollaron con una fase móvil de butanol:propanol:agua (3:5:2) o etanol:butanol:agua (5:3:2) en una cámara horizontal CAMAG dos veces. Las placas se asperjaron con una solución de etanol con 0.5% (w/v) de  $\alpha$ -naftol y 5% (v/v) de  $H_2SO_4$  (Robyt y Mukerjea,

1994) o el reactivo difenilamina-anilina-fosfórico (DAP) (Anderson *et al.*, 2000) y luego se expusieron a calor para revelar los compuestos separados.

## 9.5. Análisis de proteínas

### 9.5.1. Cuantificación de proteínas

Para cuantificar las proteínas de los cultivos, se utilizó el método Lowry *et al.*, (1951). Las células cosechadas fueron congeladas y descongeladas una vez, y luego sonicadas con 4 pulsos de 10s y descansos de 30s a una amplitud del 40%, y luego sometidas al método Lowry. Una vez desarrollado el color, se midió la densidad óptica a 590 nm ( $DO_{590nm}$ ) en el espectrofotómetro. Las muestras se diluyeron en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 según el caso para tener lecturas confiables en el espectrofotómetro (valores de 0.1 a 0.9). La curva patrón se construyó con una solución de albúmina de suero bovino (Sigma) de 0 a 600 mg/L de proteína en amortiguador de fosfatos 50 mM.

### 9.5.2. Zimogramas

Los zimogramas son geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en los que puede observarse la actividad de la enzima después de la electroforesis, previa recuperación de la enzima. Para detectar la actividad de las GTFs, se utilizaron geles de acrilamida al 8%. Se cargaron 200  $\mu$ g de proteína en cada pozo del gel. Las muestras fueron mezcladas con amortiguador de carga (2x) que contenía SDS al 10% y en seguida se cargaron en el gel para ser corridas en una cámara de electroforesis Hoefer Mighty Small II a amperaje constante de 20 mA.

Los carriles correspondientes al marcador de masa molecular y al grupo de muestras se cortaron y se tiñeron en solución GelCode Blue Stain de Thermo Scientific por 4 o 6 horas, para posteriormente lavarse con agua hasta obtener un fondo claro. El resto de los carriles con réplica de las muestras, fueron lavados tres veces por 30 minutos con una solución de Tween 80 al 1% (v/v) y solución amortiguadora para renaturalizar la enzima de las muestras, para luego ser incubados en una solución de sacarosa o rafinosa 50 g/L en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.5 durante al menos 18 horas a 30°C. Una vez incubados, los geles se lavaron con una solución

de etanol:agua (75:25) por 30 minutos para fijar el polímero en el gel. Enseguida los geles fueron tratados con una solución de ácido peryódico 0.7% (p/v) y 5 % de ácido acético 5% (v/v) por una hora para oxidar los grupos hidroxilo del polímero y formar aldehídos. Después se lavaron tres veces por 20 minutos con una solución de 0.2% (p/v) de metabisulfito de sodio y 5 % de ácido acético (v/v) y por último se les adicionó reactivo de Schiff que al entrar en contacto con los aldehídos genera un colorante púrpura insoluble. De esta manera, lo que se tiñe es el polímero que está unido a la enzima activa.

### **9.6. Análisis transcriptómico**

Para el análisis transcriptómico (RNA-seq), se realizaron cultivos con las FC elegidas, es decir, sacarosa, xilosa, fructosa y celobiosa. Los cultivos se realizaron por triplicado en matraces de 250 mL con 50 mL de cultivo. Al llegar al final de la fase exponencial, se tomaron 10 mL de cultivo para realizar la extracción de ARN.

La UUSMB (Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática de la UNAM) realizó la extracción, el análisis de calidad y la secuenciación del ARN. Para la extracción se usó el kit miniprep Quick-RNA de Zymo. El análisis de calidad e integridad del ARN se realizó en un equipo Bioanalyzer 2100. Se preparó una biblioteca con el kit Zymo-Seq Ribo Free Total RNA Library según las indicaciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo en un equipo Illumina Genome Analyzer II. Se obtuvieron dos archivos por cada muestra.

### **9.7. Análisis de Expresión Diferencial.**

Los datos obtenidos del secuenciador fueron analizados para determinar su calidad y luego filtrados con el programa fastp (v.0.21.0) (S. Chen *et al.*, 2018). Después se usó el programa Salmon (v.1.5.1) (Patro *et al.*, 2017) para alinear los datos con la secuencia del genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 que se encuentra en la base de datos de NCBI con el identificador de acceso: GCA\_000014445.1 de GenBank. El análisis de expresión diferencial se realizó con la biblioteca DESeq2 en el sistema R (v.4.0.0), definiendo como control a los cultivos con sacarosa.

## 9.8. Búsqueda de operones y motivos de ADN

La secuencia del genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 con el identificador de acceso: GCA\_000014445.1 de GenBank se analizó con el servidor Operon Mapper ([https://biocomputo.ibt.unam.mx/operon\\_mapper](https://biocomputo.ibt.unam.mx/operon_mapper), consultado en junio de 2022) para obtener la lista de posibles operones en el genoma.

Para la búsqueda de motivos, primero se obtuvieron las regiones intergénicas y río arriba de los genes de las GTFs, a partir de la secuencia del genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 (GCA\_000014445.1 de GenBank) usando el programa Artemis (v.18.2.0) (Carver *et al.*, 2012). Estas regiones se usaron como blanco para buscar motivos de unión de Factores de Transcripción, mediante el servidor FIMO de la MEME-suite (v.5.4.1) con los parámetros predeterminados (Grant *et al.*, 2011). Las secuencias que se buscaron en las regiones intergénicas, se encuentran en la Tabla 9.3.

Tabla 9.3. Secuencias de los sitios de unión de Factores de Transcripción usados en el análisis.

| FT   | Secuencia y Logo (nomenclatura IUPAC)  | Obtenido de:  | Fuente   |
|------|--|---|--|
| CcpA | WTGWAARCGYTTWCAW<br>  | Regulón en <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293              | <a href="https://regprecise.lbl.gov/regulon.jsp?regulon_id=34354">https://regprecise.lbl.gov/regulon.jsp?regulon_id=34354</a> consultado en septiembre de 2022 |
| LexA | NHRAAHRDWRRTTYD<br>   | Regulón en <i>L. mesenteroides</i> ATCC 8293              | <a href="https://regprecise.lbl.gov/regulon.jsp?regulon_id=46374">https://regprecise.lbl.gov/regulon.jsp?regulon_id=46374</a> consultado en septiembre 2022    |
| VicR | TGTWAHNNNNNTGTWAH<br> | Sitio de unión en la <i>gtfC</i> de <i>S. mutans</i> U159 | (Senadheera <i>et al.</i> , 2005)  |

## 9.9. PCR cuantitativa con Transcriptasa Reversa (RT-qPCR)

De los cultivos de fructosa y xilosa, se recuperaron células por centrifugación de al menos 5 mL de cultivo al final de la fase exponencial. Se les extrajo el ARN usando TRIzol según las indicaciones del fabricante. La integridad del ARN se revisó mediante electroforesis y la concentración fue determinada mediante un espectrofotómetro NanoDrop2000. Para remover el

ADN se usó una hidrolasa de ADN (DNAsa, Roche) en concentración de 1 U/ $\mu$ L, por 1h a 37 °C y luego se desactivó a 70 °C por 10 min. Se sintetizó cADN usando RetroTranscriptasa (Thermo Scientific) a 200 U (1 $\mu$ L), 200 nanogramos de ARN libre de ADN y hexámeros aleatorios en reacción primero por 10 min a 25 °C y luego 1 h a 42 °C; la enzima se desactivó a 70 °C por 10 min.

El ensayo de RT-qPCR se realizó con el Master Mix de Maxima SYBR green/ROX de Thermo y un equipo QuantStudio 5 usando las siguientes condiciones de reacción: iniciar con 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C y al final 60 s a 60 °C. Se usó el gen *dnaX* para la normalización. Los oligonucleótidos usados en el ensayo se encuentran en la Tabla 9.4.

**Tabla 9.4. Lista de oligonucleótidos utilizados para la RT-qPCR y el tamaño del amplicón resultante.**

| Dirección | Gen         | nt | Secuencia                | Fragmento (nt) |
|-----------|-------------|----|--------------------------|----------------|
| FWD       | <i>dnaX</i> | 20 | TGCTGCGAAACGTGATGCCT     | 112            |
| REV       | <i>dnaX</i> | 20 | TGCTGCAACGGGTTCCGGCTA    |                |
| FWD       | <i>levC</i> | 23 | CCGTAGCAGACCCAGACCATTGT  | 142            |
| REV       | <i>levC</i> | 20 | TAGCTGGCCGTCCAAATGCG     |                |
| FWD       | <i>levL</i> | 22 | GCTGAAAAAGCTGGCGTTGGAC   | 148            |
| REV       | <i>levL</i> | 21 | GTTCCGCAACGCTGCCTTTAC    |                |
| FWD       | <i>levX</i> | 24 | ATCCAAAAGAAGACGGGGATCAGC | 139            |
| REV       | <i>levX</i> | 23 | GCAGATCCGGACCACTGTTGTG   |                |
| FWD       | <i>dsrD</i> | 21 | ACAGCGATACCGTCAGCACCA    | 193            |
| REV       | <i>dsrD</i> | 22 | CCGTGACTGTTGATGGGCAGGA   |                |
| FWD       | <i>gsr1</i> | 23 | CGCCACAGGTGCATTTTCATCAG  | 162            |
| REV       | <i>gsr1</i> | 22 | GGGGTCATCGTCAGCAACAACG   |                |
| FWD       | <i>dsxD</i> | 21 | TAGCAGCTTGGGTGCCAGTCG    | 192            |
| REV       | <i>dsxD</i> | 21 | ACTCATCGGCCTGTGTTGGCA    |                |

La expresión relativa se calculó usando el promedio geométrico del valor *Ct* y el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak y Schmittgen, 2001), usando Microsoft Excel 2019. El análisis se realizó con 3 réplicas biológicas de cada FC y por triplicado.

## 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para este trabajo se seleccionaron varias cepas de *Leuconostoc* para realizar un análisis preliminar sobre el comportamiento de las GTFs que pudieran poseer, al usar sacarosa como FC. Las cepas fueron elegidas con base en los siguientes criterios: a) su origen: la cepa proviene de un alimento o bebida fermentada de origen vegetal y b) la cepa produce al menos una GTF. De esta manera, las cepas con las que se realizaron los experimentos fueron:

1. *L. citreum* CW28 aislada del *pozol* y productora de la enzima Isla (Ortiz-Soto *et al.*, 2004)
2. *L. mesenteroides* P45 aislada del *pulque* y productora de al menos una dextransacarasa (Riveros-Mckay *et al.*, 2014)
3. *L. mesenteroides* IBT-PQ aislada también del *pulque* y productora de la enzima DsrP (Chellapandian *et al.*, 1998)
4. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* de la colección ATCC 8293, aislada originalmente de aceitunas fermentadas y de la que se sabe, tiene varias enzimas de tipo FS y GS (Olvera *et al.*, 2006).

Otro criterio importante, fue poder disponer de la secuencia del genoma de las cepas: solo se cuenta con las secuencias de los genomas de *L. citreum* CW28, *L. mesenteroides* P45 y *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293, que se hallan depositadas en la base de datos GenBank del NCBI. En el caso de IBT-PQ, cabe la posibilidad de secuenciar el genoma, si las observaciones que se realicen sobre la actividad de las GTFs resultan interesantes.

En la primera parte de esta sección, se describe el análisis bioinformático realizado con los genomas de las cepas secuenciadas. Posteriormente se presenta el resultado de los estudios bioquímicos básicos comparativos de las cepas, es decir, el resultado del comportamiento de las cepas cultivadas en presencia de sacarosa. Al final, se elegirá una de las cepas con base a cuantas GTFs se encontraron en el genoma, qué tan diversas son y si es posible observar su actividad en un zimograma.

### 10.1. Análisis bioinformáticos de las cepas

Para identificar secuencias putativas de GTFs en los genomas de las cepas disponibles, se utilizó como primer criterio de selección el porcentaje de identidad con respecto a las secuencias modelo. De las secuencias resultantes se escogieron aquellas con porcentajes de identidad mayores a 40%, de manera que la secuencia encontrada mantuviera (muy probablemente) la actividad glicosiltransferasa. Es posible también que, si los porcentajes de identidad son menores a 80%, se trate de enzimas no identificadas previamente. Este criterio ya ha sido utilizado en trabajos de minería de genomas para encontrar enzimas del mismo tipo, pero con nuevas propiedades o actividades de interés (Ávila-Fernández *et al.*, 2016; Olvera *et al.*, 2006; Passerini *et al.*, 2015; Tian y Skolnick, 2003). Los alineamientos se realizaron con BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) y dan como resultado los porcentajes de identidad (%I) y cobertura (%C) obtenidos en la comparación. El valor de %I, se refiere al porcentaje de identidad entre la secuencia de referencia y la secuencia objetivo; el valor de %C se refiere al porcentaje de la secuencia de referencia que se superpone con la secuencia objetivo. Entre mayores sean estos porcentajes, las secuencias se parecen más entre sí y es más probable que conserven la misma actividad.

Por otro lado, como aparece en la sección 4.2, las GTFs de las familias GH70 (GS) y GH68 (FS) cuentan con dominios muy conservados que contienen los residuos catalíticos indispensables para la actividad transferasa (Lammens *et al.*, 2009; Passerini *et al.*, 2015; van Hijum *et al.*, 2006). Estos motivos se pueden encontrar al realizar alineamientos múltiples usando las secuencias de enzimas bien caracterizadas (con los residuos catalíticos plenamente identificados) y las secuencias hipotéticas de GTFs halladas en los genomas. En este caso, utilizamos las secuencias que se encuentran en la Tabla 9.1, de la sección de metodología.

### 10.1.1. La cepa *L. citreum* CW28

La cepa *L. citreum* CW28 fue aislada del *pozol*, una bebida de masa de maíz fermentado, típica del sureste mexicano. La cepa es conocida porque produce a la enzima inulosacarasa IslA, que está asociada a la pared celular de la bacteria (Olivares-Illana *et al.*, 2003; Ortiz-Soto *et al.*, 2004). Recientemente su genoma fue secuenciado, anotado y depositado en GenBank en el número de acceso GCA\_002591805.1. Por esta razón, se incluyó en este estudio en la búsqueda de GTFs adicionales a las hasta ahora reportadas.

Al realizar los alineamientos entre las secuencias de GTFs conocidas con el genoma de *L. citreum* CW28, se identificó la secuencia de una proteína hipotética con suficiente identidad con las secuencias de las GTFs conocidas usadas para la búsqueda. Los resultados se muestran en la Tabla 9.1, donde se aprecia que los mayores porcentajes de identidad (%I) y cobertura (%C) de la secuencia WP\_099044689.1, se obtienen al alinearla contra secuencias de GSs (sombreados en azul en la Tabla 10.1); mientras que al alinearla contra secuencias de FSs, la identidad es mucho menor o no hubo. Estas observaciones sugieren que la proteína sería una glucansacarasa.

**Tabla 10.1. Resultados de los alineamientos con BlastP, entre secuencias de GTFs caracterizadas y el genoma de la cepa *L. citreum* CW28.**

| Cepa productora                     | Tipo de enzima    | Id. de la secuencia de referencia | WP_099044689.1 |    |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|----------------|----|
| <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F  | Dextran sacarasa  | AAD10952.1                        | 97             | %C |
|                                     |                   |                                   | 49.6           | %I |
| <i>Limosilb. reuteri</i> 121        | Reuteran sacarasa | OJI11530.1                        | 56             | %C |
|                                     |                   |                                   | 48.2           | %I |
| <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-1355 | Alternan sacarasa | CAB65910.2                        | 66             | %C |
|                                     |                   |                                   | 45.1           | %I |
| <i>Str. mutans</i> UA159            | Mutan sacarasa    | P13470.2                          | 96             | %C |
|                                     |                   |                                   | 45.2           | %I |
| <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F  | Levan sacarasa    | AAV19523                          | 35             | %C |
|                                     |                   |                                   | 24             | %I |
| <i>L. citreum</i> CW28              | Inulo sacarasa    | AAO25086                          | ND             | %C |
|                                     |                   |                                   | ND             | %I |
| <i>Lb. johnsonii</i> NC 533         | Inulo sacarasa    | Q74K42                            | ND             | %C |
|                                     |                   |                                   | ND             | %I |

% I = porcentaje de identidad  
% C = porcentaje de cobertura

Posteriormente, se llevó a cabo el alineamiento múltiple con las secuencias de las GSs que se usaron en la búsqueda anterior (es decir AAD10952.1, OJI11530.1, CAB65910.2, P13470.2) y la secuencia de la proteína hipotética WP\_099044689.1 de la cepa CW28, que probablemente corresponde a una GS. En los resultados se identificaron los motivos característicos de las GTFs de la familia GH70, mismos que se reportan en la Tabla 10.2, donde se muestra la posición de los motivos dentro de la secuencia aminoacídica y se resaltan los residuos catalíticos D y E de los dominios II y III en color rojo y el residuo estabilizador D, en color azul. Estos resultados refuerzan la conclusión de que la proteína hipotética WP\_099044689.1 sería una glucansacarasa.

Tabla 10.2. Motivos característicos de la familia GH70 hallados por alineamiento múltiple de las secuencias referencia con la secuencia hallada en *L. citreum* CW28

| Id. de la secuencia                   | Posición | Motivo II  | Posición | Motivo III   | Posición | Motivo IV  | Pos. | Motivo I                  |
|---------------------------------------|----------|--|----------|--|----------|--|------|---------------------------|
| <b>AAD10952.1</b><br>Dextransacarasa  | 545      | FDGI <b>R</b> VD <b>A</b> V <b>D</b> N <b>V</b> D <b>A</b> D <b>L</b>  | 556      | HLSI <b>L</b> E <b>D</b> W <b>S</b> H <b>N</b> D <b>P</b> L <b>Y</b> V <b>T</b> D <b>Q</b> | 657      | FVRA <b>H</b> D <b>S</b> E <b>V</b> Q <b>T</b> V <b>I</b> A <b>Q</b> | 1023 | ADW <b>V</b> P <b>D</b> Q |
| <b>OJI11530.1</b><br>Reuteransacarasa | 1018     | FDSV <b>R</b> V <b>D</b> A <b>P</b> D <b>N</b> I <b>D</b> A <b>D</b> L | 1029     | HINI <b>L</b> E <b>D</b> W <b>N</b> H <b>A</b> D <b>P</b> E <b>Y</b> F <b>N</b> K <b>I</b> | 1128     | FVRA <b>H</b> D <b>N</b> N <b>S</b> Q <b>D</b> Q <b>I</b> Q <b>N</b> | 1508 | ADW <b>V</b> P <b>D</b> Q |
| <b>CAB65910.2</b><br>Alternansacarasa | 629      | FDGI <b>R</b> V <b>D</b> A <b>V</b> D <b>N</b> V <b>D</b> A <b>D</b> L | 640      | HLSI <b>L</b> E <b>D</b> W <b>N</b> G <b>K</b> D <b>P</b> Q <b>Y</b> V <b>N</b> Q <b>Q</b> | 762      | FVRA <b>H</b> D <b>Y</b> D <b>A</b> Q <b>D</b> P <b>I</b> R <b>K</b> | 1168 | ADW <b>V</b> P <b>D</b> Q |
| <b>P13470.2</b><br>Mutansacarasa      | 471      | FDSI <b>R</b> V <b>D</b> A <b>V</b> D <b>N</b> V <b>D</b> A <b>D</b> L | 482      | HLSI <b>L</b> E <b>A</b> W <b>S</b> Y <b>N</b> D <b>T</b> P <b>Y</b> L <b>H</b> D <b>D</b> | 583      | FIRA <b>H</b> D <b>S</b> E <b>V</b> Q <b>D</b> L <b>I</b> R <b>N</b> | 954  | ADW <b>V</b> P <b>D</b> Q |
| <b>**WP_099044689.1</b>               | 494      | FDGY <b>R</b> V <b>D</b> A <b>V</b> D <b>N</b> V <b>D</b> A <b>D</b> L | 537      | HLSI <b>L</b> E <b>D</b> W <b>G</b> D <b>E</b> D <b>P</b> D <b>Y</b> V <b>K</b> A <b>H</b> | 606      | FIRA <b>H</b> D <b>S</b> E <b>V</b> Q <b>T</b> I <b>I</b> A <b>D</b> | 978  | NDW <b>V</b> P <b>D</b> Q |

\*\* Secuencias encontradas en el genoma de *L. citreum* CW28

A continuación, se identificó la presencia de los elementos mínimos de la transcripción en la región río arriba del inicio de la transcripción del gen correspondiente a WP\_099044689.1, los sitios -10 y -35 para la unión del promotor Sigma70. Para buscar estos motivos, se utilizó el servidor BPROM (Solovyev y Salamov, 2010), los resultados se presentan en la Tabla 10.3.

**Tabla 10.3. Predicción de los sitios -10 y -35 en las regiones río arriba de los genes de la GS identificada en la cepa *L. citreum* CW28.**

| Cepa                   | Id de la secuencia | -10       | -35    |
|------------------------|--------------------|-----------|--------|
| <i>L. citreum</i> CW28 | WP_099044689.1     | gtgtaatat | tttatt |

Los resultados obtenidos permiten suponer que la secuencia encontrada corresponde a una glucansacarasa y que probablemente se exprese, aunque no es posible aún saber bajo cuales condiciones. Las características de las GTFs de la cepa *L. citreum* CW28, (incluida la enzima IslA) se resumen en la Tabla 10.4.

**Tabla 10.4. Características de las GTFs de la cepa *L. citreum* CW28**

| ID Proteína    | Tamaño <sup>†</sup><br>(aa) | Masa teórica*<br>(kDa) | pI   | Tipo<br>de GTF | Familia<br>GH | Enzima |
|----------------|-----------------------------|------------------------|------|----------------|---------------|--------|
| WP_099044649.1 | 1514                        | 163.5                  | 5.04 | FS             | GH68          | IslA   |
| WP_099044689.1 | 1504                        | 163.8                  | 5.27 | GS             | GH70          | GsrP   |

<sup>†</sup>Con péptido señal

\* Calculada con la proteína madura

#### 10.1.2. La cepa *L. mesenteroides* P45

La cepa *L. mesenteroides* P45 fue aislada del *pulque*, donde, junto con otras cepas de la especie, contribuye a la viscosidad de la bebida mediante la producción de EPS (Escalante *et al.*, 2016). Su genoma ya ha sido secuenciado (Riveros-Mckay *et al.*, 2014) y la secuencia se encuentra depositada en la base de datos de GenBank de NCBI con el número de acceso GCA\_000756355.1. La cepa ha sido estudiada por su potencial como bacteria probiótica, asociada a la actividad

antimicrobiana que han exhibido en contra de bacterias Gram-positivas y Gram negativas (Giles-Gómez *et al.*, 2016).

En los alineamientos realizados para identificar las posibles GTFs de esta cepa, se identificaron cuatro secuencias de proteínas con una alta identidad a las secuencias de las GTFs caracterizadas. Los porcentajes de identidad y cobertura (sombreado azul) de los alineamientos (Tabla 10.5) sugieren que serían enzimas de tipo GS.

**Tabla 10.5. Resultados de los alineamientos con BlastP, entre secuencias de GTFs caracterizadas y el genoma de la cepa de la cepa *L. mesenteroides* P45.**

| Cepa productora                     | Tipo de enzima    | Id. de la secuencia | KGB49917.1 | WP_052037835.1 | KGB49924.1 | WP_080732772.1 |    |
|-------------------------------------|-------------------|---------------------|------------|----------------|------------|----------------|----|
| <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F  | Dextran sacarasa  | AAD10952.1          | 97.7       | 47.9           | 53.5       | 39.6           | %C |
|                                     |                   |                     | 100.0      | 99.0           | 95.0       | 99.0           | %I |
| <i>Limosilb. reuteri</i> 121        | Reuteran sacarasa | OJI11530.1          | 42.9       | 46.4           | 47.7       | 42.9           | %C |
|                                     |                   |                     | 80.0       | 85.0           | 80.0       | 83.0           | %I |
| <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-1355 | Alternan sacarasa | CAB65910.2          | 43.9       | 48.8           | 48.7       | 39.3           | %C |
|                                     |                   |                     | 87.0       | 91.0           | 86.0       | 87.0           | %I |
| <i>S. mutans</i> UA159              | Mutan sacarasa    | P13470.2            | 53.6       | 49.9           | 51.3       | 40.2           | %C |
|                                     |                   |                     | 92.0       | 92.0           | 94.0       | 93.0           | %I |
| <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F  | Levan sacarasa    | AAY19523            | 74.0       | 81.0           | 77.0       | 83.0           | %C |
|                                     |                   |                     | 34.9       | 54.5           | 35.1       | 45.1           | %I |
| <i>L. citreum</i> CW28              | Inulo sacarasa    | AAO25086            | 56.0       | 59.0           | 61.0       | 61.0           | %C |
|                                     |                   |                     | 35.1       | 59.5           | 28.8       | 68.4           | %I |
| <i>Lb. johnsonii</i> NC 533         | Inulo sacarasa    | Q74K42              | 64.0       | 61.0           | 61.0       | ND             | %C |
|                                     |                   |                     | 31.8       | 39.4           | 40.5       | ND             | %I |

% I = porcentaje de identidad  
% C = porcentaje de cobertura

Las secuencias que se identificaron como hipotéticas GSs, fueron anotadas como enzimas de la familia GH70 (Riveros-Mckay *et al.*, 2014), usando el “Prokaryotic Genome Annotation Pipeline” de NCBI, que usa, entre otras, herramientas como la base de datos de Dominios Conservados, Modelos de Familia de Proteínas y BLAST, para hacer las anotaciones (W. Li *et al.*, 2021). Este indicio refuerza la posibilidad de que las cuatro proteínas que tiene la cepa P45 sean glucansacararas.

En las secuencias que identificadas en la cepa P45 se identificaron los motivos conservados típicos de la familia GH70, por medio de un alineamiento múltiple; mismos que se reportan en la Tabla 10.6, incluyendo su posición dentro de la secuencia aminoacídica. Se resaltan además los residuos catalíticos D y E de los dominios II y III en color rojo y el residuo estabilizador D, en color azul. Estos resultados confirman que las secuencias encontradas en el genoma de *L. mesenteroides* P45 corresponden a enzimas del tipo glucansacararas.

Tabla 10.6. Motivos característicos de las enzimas de la familia GH70 identificados por alineamiento múltiple de las secuencias de *L. mesenteroides* P45

| Id. de la secuencia                   | Posición | Motivo II        | Posición | Motivo III                        | Posición | Motivo IV                    | Posición | Motivo I |
|---------------------------------------|----------|------------------|----------|-----------------------------------|----------|------------------------------|----------|----------|
| <b>AAD10952.1</b><br>Dextransacarasa  | 545      | FDGIRVDAVDNVDADL | 556      | HLSILEDW <sup>W</sup> SHNDPLYVTDQ | 657      | FVRAHDSEVQTVIAQ              | 1023     | ADWVPDQ  |
| <b>OJI11530.1</b><br>Reuteransacarasa | 1018     | FDSVRVDAPDNIDADL | 1029     | HINILEDW <sup>W</sup> NHADPEYFNKI | 1128     | FVRAHDNNSQDQIQN              | 1508     | ADWVPDQ  |
| <b>CAB65910.2</b><br>Alternansacarasa | 629      | FDGIRVDAVDNVDADL | 640      | HLSILEDW <sup>W</sup> NGKDPQYVNQQ | 762      | FVRAHDYDAQDPIRK              | 1168     | ADWVPDQ  |
| <b>P13470.2</b><br>Mutansacarasa      | 471      | FDSIRVDAVDNVDADL | 482      | HLSILEAW <sup>W</sup> SYNDTPYLHDD | 583      | FIRAH <sup>H</sup> SEVQDLIRN | 954      | ADWVPDQ  |
| <b>**KGB49917.1</b>                   | 545      | FDGIRVDAVDNVDADL | 588      | HLSILEDW <sup>W</sup> SHNDPLYVTDQ | 657      | FVRAHDSEVQTVIAQ              | 1023     | ADWVPDQ  |
| <b>**WP_052037835.1</b>               | 524      | FDSIRIDAVDNVDSDL | 567      | HLSILEDW <sup>W</sup> SANDFKYVSDK | 633      | FVRAHDSEVQTVIAQ              | 1017     | ADWVPDQ  |
| <b>**KGB49924.1</b>                   | 443      | FDSIRVDAVDNVDADL | 486      | HVSILEDW <sup>W</sup> SDNDAEYVKDN | 559      | FVRAHDSEVQTVIAE              | 941      | ADWVPDQ  |
| <b>**WP_080732772.1</b>               | 585      | FDGVRMDAVIYMKGEA | 628      | HISIVEDG <sup>T</sup> TDETKKNSAL  | 695      | MIRSHDRGSQDEVIA              | 1085     | ADFVANQ  |

\*\* Secuencias encontradas en el genoma de *L. mesenteroides* P45

Se analizaron igualmente las regiones río arriba del inicio de la transcripción de cada gen correspondiente a las secuencias de las GTFs hipotéticas de P45, en búsqueda de posibles sitios de unión a ADN del factor Sigma<sup>70</sup>, como una aproximación a la posibilidad de su expresión. Los posibles sitios -10 y -35 identificados se presentan en la Tabla 10.7.

**Tabla 10.7. Predicción de los sitios -10 y -35 en las regiones río arriba de los genes de las GS identificadas en el genoma de la cepa *L. mesenteroides* P45.**

| Cepa                           | Id proteína    | -10       | -35    |
|--------------------------------|----------------|-----------|--------|
| <i>L. mesenteroides</i><br>P45 | KGB49917.1     | ctcttaa   | ttaaat |
|                                | WP_052037835.1 | ttgtacat  | ttcatg |
|                                | KGB49924.1     | aaataaaat | ttgatt |
|                                | WP_080732772.1 | aactaatgt | ttaaaa |

Al igual que en el caso anterior, los resultados indican que es muy probable que los genes de las GTFs putativas identificadas sean expresados. En la Tabla 10.8, se resumen las características de las GTFs de la cepa P45. La masa molecular teórica de cada proteína se calculó a partir de las secuencias “maduras”, es decir sin el péptido señal.

**Tabla 10.8. Características de las GS identificadas en el genoma de la cepa *L. mesenteroides* P45**

| ID Proteína    | Tamaño <sup>†</sup><br>(aa) | Masa<br>teórica*<br>(kDa) | pI   | Tipo<br>de<br>GTF | Familia<br>GH | Enzima |
|----------------|-----------------------------|---------------------------|------|-------------------|---------------|--------|
| WP_052037835.1 | 1511                        | 165.6                     | 4.94 | GS                | 70            | Gpul1  |
| KGB49917.1     | 1527                        | 165.1                     | 4.24 | GS                | 70            | Gpul2  |
| KGB49924.1     | 1365                        | 146.5                     | 4.53 | GS                | 70            | Gpul3  |
| WP_080732772.1 | 1583                        | 174.2                     | 4.76 | GS                | 70            | Gpul4  |

### 10.1.3. La cepa *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293

La cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 fue aislada a partir de aceitunas fermentadas y en 2006 se convirtió en la primera bacteria de este género en tener su genoma secuenciado (Makarova *et al.*, 2006). Por esta razón la cepa ATCC 8293 se ha usado constantemente como modelo del género para estudios fisiológicos y genéticos. Su genoma ha servido para identificar la participación de bacterias de la especie *L. mesenteroides* en fermentaciones de alimentos de origen vegetal como el *kimchi* o el *sauerkraut* (Jung *et al.*, 2011; Plengvidhya *et al.*, 2007).

En estudios previos en el grupo de Tecnología Enzimática, se realizó una búsqueda de GTFs en el genoma de la cepa ATCC 8293 por medio de alineamientos, con las secuencias de las enzimas DsrS y LevS de *L. mesenteroides* B512F (Olvera *et al.*, 2006). Para este trabajo se utilizaron además otras enzimas como blanco (Tabla 9.1 de la sección 9). En la Tabla 10.9, se resumen los resultados obtenidos de los alineamientos, donde se observa que las secuencias WP\_011680099.1, WP\_011680100.1 y WP\_011680101.1 tienen mayor identidad y cobertura con las secuencias de las FSs (sombreado en amarillo), mientras que las secuencias WP\_011680348.1, WP\_011680353.1 y WP\_049752804.1 se parecen más a las GSs (sombreado en azul). Hay que señalar que una de las dextranacararas de la cepa, la DsrI, ya ha sido caracterizada y se sabe que produce una dextrana con una mezcla de enlaces  $\alpha(1-6)$  y  $\alpha(1-3)$  en proporciones más o menos similares, pero las últimas ocurren en secuencias largas, lo que da lugar a la insolubilidad del polímero en agua (Côté y Skory, 2012).

Como se ha establecido, las enzimas de la familia GH70 poseen cuatro motivos bien conservados en donde se ubican sus residuos catalíticos y pueden identificarse por medio de un alineamiento múltiple de secuencias. Los resultados del alineamiento múltiple con las secuencias de las GSs de la cepa y las caracterizadas se encuentran en la Tabla 10.10, donde se constata la existencia de los motivos, además de su posición dentro de la secuencia aminoacídica; además se resaltan los residuos catalíticos D y E de los dominios II y III en color rojo y el residuo estabilizador D, en color azul.

**Tabla 10.9. Porcentajes de identidad y cobertura de los alineamientos entre secuencias conocidas de GTFs y el genoma de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293**

| Cepa productora                     | Tipo de enzima    | Id. de la secuencia | WP_011680099.1 | WP_011680100.1 | WP_011680101.1 | WP_011680348.1 | WP_011680353.1 | WP_049752804.1 |    |
|-------------------------------------|-------------------|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----|
| <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F  | Dextran sacarasa  | AAD10952.1          | 32             | ND             | 30             | 89.0           | 100            | 82.0           | %C |
|                                     |                   |                     | 25.2           | ND             | 25.2           | 52.3           | 99.3           | 53.5           | %I |
| <i>Limosilb. reuteri</i> 121        | Reuteran sacarasa | OJI11530.1          | ND             | ND             | ND             | 57.0           | 59.0           | 58.0           | %C |
|                                     |                   |                     | ND             | ND             | ND             | 50.3           | 48.6           | 48.1           | %I |
| <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-1355 | Alternan sacarasa | CAB65910.2          | 1              | ND             | 1              | 65.0           | 72.0           | 64.0           | %C |
|                                     |                   |                     | 52.8           | ND             | 61.7           | 49.0           | 42.3           | 49.7           | %I |
| <i>Str. mutans</i> UA159            | Mutan sacarasa    | P13470.2            | ND             | 16             | ND             | 95.0           | 91.0           | 89.0           | %C |
|                                     |                   |                     | ND             | 25             | ND             | 45.6           | 50.7           | 48.9           | %I |
| <i>L. mesenteroides</i> NRRL B512F  | Levan sacarasa    | AAY19523            | 100            | 84             | 100            | 32.0           | 14.0           | 32.0           | %C |
|                                     |                   |                     | 77.8           | 91.3           | 67.1           | 26.7           | 25.7           | 26.9           | %I |
| <i>L. citreum</i> CW28              | Inulo sacarasa    | AAO25086            | 45             | 32             | 39             | 12.0           | ND             | ND             | %C |
|                                     |                   |                     | 47.6           | 47.4           | 46.9           | 37.4           | ND             | ND             | %I |
| <i>Lb. johnsonii</i> NC 533         | Inulo sacarasa    | Q74K42              | 84             | 57             | 84             | ND             | ND             | ND             | %C |
|                                     |                   |                     | 39.8           | 47.7           | 38.1           | ND             | ND             | ND             | %I |

% I = porcentaje de identidad  
% C = porcentaje de cobertura

Tabla 10.10. Motivos característicos de las enzimas de la familia GH70 identificados en las secuencias de *L. mesenteroides* ATCC 8293.

| Id. de la secuencia            | Posición | Motivo II  | Posición | Motivo III                                     | Posición | Motivo IV                | Posición | Motivo I        |
|--------------------------------|----------|--|----------|--|----------|--------------------------|----------|-----------------|
| AAD10952.1<br>Dextransacarasa  | 545      | FDGI <b>R</b> VD <b>A</b> VD <b>N</b> V <b>D</b> ADL | 556      | HLSI <b>L</b> E <b>D</b> W <b>S</b> HNDPLYVTDQ | 657      | FVRA <b>H</b> DSEVQTVIAQ | 1023     | ADWVPD <b>Q</b> |
| OJI11530.1<br>Reuteransacarasa | 1018     | FDSV <b>R</b> V <b>D</b> AP <b>N</b> IDADL           | 1029     | HINI <b>L</b> E <b>D</b> W <b>N</b> HADPEYFNKI | 1128     | FVRA <b>H</b> DNNSQDQIQN | 1508     | ADWVPD <b>Q</b> |
| CAB65910.2<br>Alternansacarasa | 629      | FDGI <b>R</b> V <b>D</b> AV <b>D</b> N <b>V</b> DADL | 640      | HLSI <b>L</b> E <b>D</b> W <b>N</b> GKDPQYVNQQ | 762      | FVRA <b>H</b> DYDAQDPIRK | 1168     | ADWVPD <b>Q</b> |
| P13470.2<br>Mutansacarasa      | 471      | FDSI <b>R</b> V <b>D</b> AV <b>D</b> N <b>V</b> DADL | 482      | HLSI <b>L</b> E <b>A</b> W <b>S</b> YNDTPYLHDD | 583      | FIRA <b>H</b> DSEVQDLIRN | 954      | ADWVPD <b>Q</b> |
| **WP_011680348.1               | 545      | FDGI <b>R</b> V <b>D</b> AV <b>D</b> N <b>V</b> DADL | 556      | HLSI <b>L</b> E <b>D</b> W <b>S</b> HNDPLYVTDQ | 657      | FVRA <b>H</b> DSEVQTVIAQ | 1023     | ADWVPD <b>Q</b> |
| **WP_011680353.1               | 527      | FDSI <b>R</b> V <b>D</b> AV <b>D</b> N <b>V</b> DADL | 538      | HVSI <b>L</b> E <b>D</b> W <b>S</b> DNDAEYVKDN | 644      | FVRA <b>H</b> DSEVQTVIAE | 1025     | ADWVPD <b>Q</b> |
| **WP_049752804.1               | 537      | FDGY <b>R</b> V <b>D</b> AV <b>D</b> N <b>V</b> DADL | 548      | HLSI <b>L</b> E <b>D</b> W <b>D</b> NNDPAYVKAQ | 649      | FIRA <b>H</b> DSEVQTVIAQ | 1019     | NDWVPD <b>Q</b> |

\*\* Secuencias encontradas en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293

De igual forma, se realizó un alineamiento múltiple para localizar los motivos conservados en las enzimas de la familia GH68. Los motivos conservados se presentan en la Tabla 10.11, en la que se resaltan los residuos catalíticos en rojo, mientras que los altamente conservados en azul.

**Tabla 10.11. Localización de los motivos característicos de las enzimas de la familia GH68 en secuencias caracterizadas y las secuencias de FSs de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293.**

| Id. de la secuencia | Motivo I   | Motivo II   | Motivo III | Motivo IV | Motivo V  | Motivo VI                 |
|---------------------|------------|-------------|------------|-----------|-----------|---------------------------|
| AAY19523.1          | VWDSW      | QWSGS       | AGDGE      | LFYTKTD   | MRDPH     | YLAFEANT                  |
| AAO25086.1          | VWDSW      | EWSGS       | EGDGY      | LFYTRVA   | LRDPK     | YLTFEANT                  |
| Q74K42.1            | IWDSW      | QWSGS       | EGDGY      | LYYTKVD   | MRDPH     | YLVFEAST                  |
| WP_011680099.1      | VWDSW      | QWSGS       | TGDEE      | LFYTKTD   | LRDPH     | YLTFESNT                  |
| WP_011680100.1      | VWDSW      | QWSGS       | EGDGQ      | LYYTKVD   | LRDPH     | YLAFEANT                  |
| WP_011680101.1      | VWDSW      | QWSGS       | EGDGQ      | LFYTQVD   | LRDPH     | YLTFEGST                  |
| Id. de la secuencia | Motivo VII | Motivo VIII | Motivo IX  | Motivo X  | Motivo XI | Localización en secuencia |
| AAY19523.1          | SPLLAA     | ITDEIER     | YLFTD      | YTPLN     | DTYSY     | 245-570                   |
| AAO25086.1          | KPLITA     | VTDEIER     | YLFTD      | YKPLN     | NTYSW     | 353-676                   |
| Q74K42.1            | SPLISA     | VSDEIER     | YLFDA      | YVPLN     | ATYSY     | 270-603                   |
| WP_011680099.1      | SPLLAA     | ITDEIER     | YLFTD      | YTPLN     | DTYSY     | 233-558                   |
| WP_011680100.1      | SPLLAA     | ITDEIER     | YLFTD      | YTPLN     | DTYSY     | 248-573                   |
| WP_011680101.1      | SPLLAS     | VTDEIER     | YLFTT      | YLPLN     | NSYSY     | 231-554                   |

Los resultados de los alineamientos y los motivos características encontrados, apuntan a que las proteínas correspondientes a las secuencias WP\_011680348.1, WP\_011680353.1 y WP\_049752804.1 en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 corresponderían muy probablemente a enzimas glucansacarasas, mientras que las proteínas correspondientes a las secuencias WP\_011680099.1, WP\_011680100.1 y WP\_011680101.1 serían posiblemente del tipo fructansacarasas.

En las regiones río arriba de las seis secuencias encontradas en ésta cepa, se buscaron también los motivos de unión del factor sigma70 con el servidor BROM (Solovyev y Salamov, 2010) es decir los sitios -10 y -35; las secuencias de los sitios predichos se muestran en la Tabla 10.12.

**Tabla 10.12. Predicción de los sitios -10 y -35 en las regiones río arriba de los genes de las GTFs identificadas en el genoma de la cepa *L. mesenteroides* ATCC8293.**

| Cepa   | Id de la secuencia | -10       | -35    |
|--|--------------------|-----------|--------|
| <i>L. mesenteroides</i> subsp.<br><i>mesenteroides</i> ATCC 8293 | WP_011680348.1     | tattaatat | gtaaaa |
|  | WP_011680353.1     | aaataaaat | ataata |
|  | WP_049752804.1     | tgctattat | tttact |
|  | WP_011680099.1     | tattaatat | ttgtat |
|  | WP_011680100.1     | atatatcat | ttacat |
|  | WP_011680101.1     | ttttaatat | ataaaa |

Este análisis indica que es muy posible que los genes de las posibles GTFs que se identificaron en la cepa de *Ln mesenteroides* ATCC 8293 se expresen. Con estos resultados queda claro que esta cepa posee un alto número de secuencias de GTFs y que existen evidencias teóricas sobre la probabilidad de que estos genes se expresen. Finalmente, en la Tabla 10.13, se concentran las características de las GTFs de la cepa, incluyendo su masa molecular teórica, calculada a partir de las secuencias “maduras”, es decir, sin el péptido señal.

**Tabla 10.13. Resumen de las glicosiltransferasas identificadas en el genoma de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 y algunas de sus propiedades.**

| ID Locus  | ID Proteína    | Tamaño <sup>†</sup><br>(aa) | Masa teórica*<br>(kDa) | Tipo de<br>GTF | Familia<br>GH | Enzima |
|-----------|----------------|-----------------------------|------------------------|----------------|---------------|--------|
| LEUM_1409 | WP_011680099.1 | 1009                        | 108.6                  | FS             | GH68          | LevC   |
| LEUM_1410 | WP_011680100.1 | 1025                        | 109.4                  | FS             | GH68          | LevX   |
| LEUM_1411 | WP_011680101.1 | 1002                        | 108.3                  | FS             | GH68          | LevL   |
| LEUM_1747 | WP_011680348.1 | 1527                        | 165.3                  | GS             | GH70          | DsrD   |
| LEUM_1752 | WP_011680353.1 | 1514                        | 161.5                  | GS             | GH70          | DsrI   |
| LEUM_0857 | WP_049752804.1 | 2841                        | 308.1                  | GS             | GH70          | DsxD   |

<sup>†</sup>Con péptido señal

\* Calculada con la proteína madura

En resumen, los resultados obtenidos hasta esta sección indican que la cepa *L. citreum* CW28 tendría una glucansacarasa que se denominó GsrP, además de la inulosacarasa IslA que ha sido ya caracterizada. En el genoma de la cepa *L. mesenteroides* P45, se localizaron cuatro posibles glucansacarasas (Gpul 1, Gpul2, Gpul3 y Gpul4), una de ellas (Gpul1) posee una alta identidad con la dextranacarasa DsrD de *L. mesenteroides* B512f, mientras que las restantes mantienen identidades menores con las secuencias conocidas. En el genoma de la cepa *L. mesenteroides* ATCC

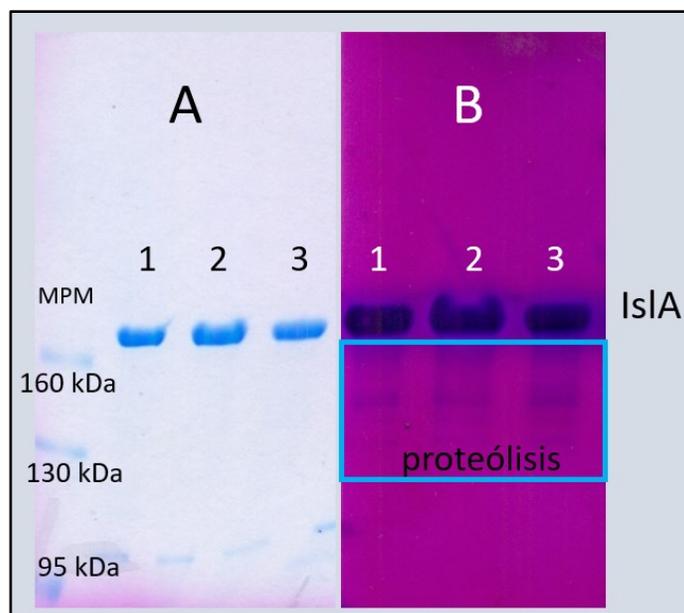
8293 se identificaron seis secuencias que pertenecerían a enzimas GTFs, tres serían fructansacarasas y tres de tipo glucansacarasas, una de ellas también con alta identidad con DsrD. Estos resultados muestran la base de la propuesta que da origen a la hipótesis del proyecto: las cepas del género *Leuconostoc* presentan una alta diversidad y riqueza de GTFs, cuyas propiedades han sido poco exploradas. Además, no se conoce el impacto de estas GTFs en los alimentos fermentados donde pueden hallarse.

## 10.2. Análisis bioquímico de las cepas

La siguiente etapa de este estudio, consistió en determinar cuáles y cuantas de las GTFs identificadas en el análisis bioinformático, pueden ser localizadas por medio de zimogramas y cálculo de su actividad. Dado que la sacarosa es reconocida como el principal inductor de las GTFs en las BAL (Bivolarski *et al.*, 2013; Monsan *et al.*, 2001; Quirasco *et al.*, 1999), se empleó este azúcar como FC y se estableció como condición control.

### 10.2.1. La cepa *L. citreum* CW28

Se obtuvieron muestras del cultivo de la cepa CW28 en el medio con sacarosa como FC al término de la fase exponencial y con ellas se prepararon zimogramas que sirven para identificar a las enzimas por su tamaño y por su actividad. Como había sido reportado con anterioridad, la cepa CW28 parece sintetizar únicamente a la enzima IslA, como puede observarse en la Figura 10.1, donde solo se aprecia una banda de actividad en cada carril (cada carril contiene células de diversos cultivos del final de la fase exponencial) que corresponde al tamaño de la inulosacarasa. Debajo de las bandas que se muestran en la parte derecha del gel se aprecian bandas de menor peso molecular, muy probablemente consecuencia de la proteólisis de IslA, un fenómeno característico de las GTFs (Ortiz-Soto *et al.*, 2004; Vallejo-García, 2017). Dado el antecedente bioinformático antes descrito, es posible que la proteína GsrP, la dextransacarasa identificada y previamente descrita, se encuentre en la misma banda que IslA a consecuencia del tamaño similar de ambas proteínas, con 163.8 kDa y 163.5 kDa respectivamente. Entonces no sería posible identificarlas por medio del zimograma.

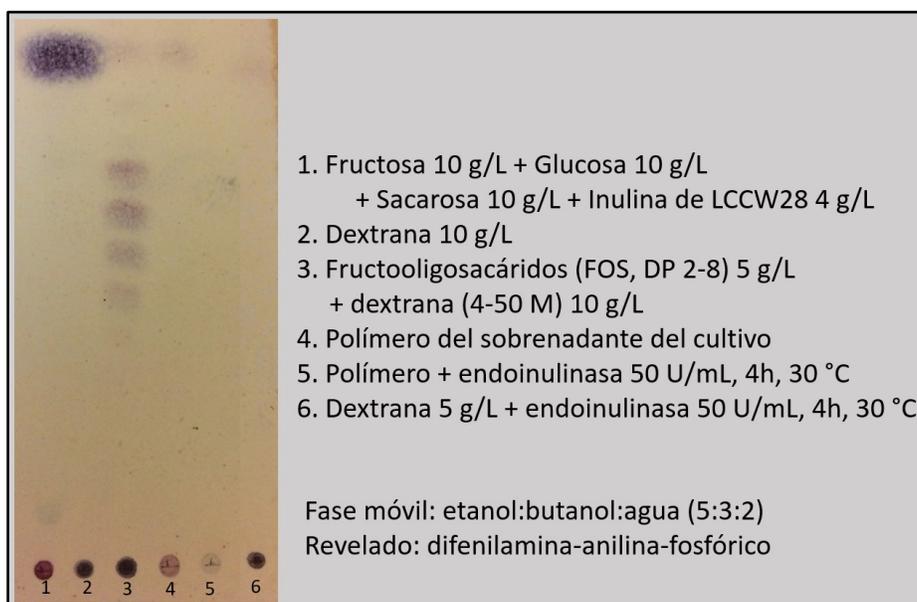


**Figura 10.1. Geles de proteínas de *L. citreum* CW28 tomados al final del cultivo en presencia de sacarosa.** El gel (A) está teñido con azul de Coomassie. El gel (B) es un zimograma incubado con sacarosa y teñido con reactivo de Schiff. Los carriles 1, 2 y 3 indican que se trata de triplicados biológicos. En todos los casos se usó la fracción Bt del cultivo y se cargaron 200 mg de proteína.

En proyectos previos, se ha estudiado con detalle a la enzima IslA tanto producida de forma recombinante, como asociada a la bacteria: en ninguno de estos trabajos se encontraron indicios de producción de otro polímero durante el cultivo de la bacteria o durante el uso de las células completas como catalizador. Sin embargo, como la enzima IslA está asociada a la pared celular, en la realización de zimogramas siempre se ha utilizado la fracción celular (Bt) del cultivo, mientras que el sobrenadante (Sn) ha sido analizado en pocas ocasiones y únicamente para determinar la cantidad de inulina que se produce durante el cultivo. Con base en estos hallazgos, se procedió a analizar el sobrenadante en búsqueda de un polímero de tipo glucana, que permita demostrar la inducción y producción de la enzima GsrP durante el cultivo con sacarosa. Para este objetivo, se pusieron en marcha varias estrategias que se detallaran enseguida.

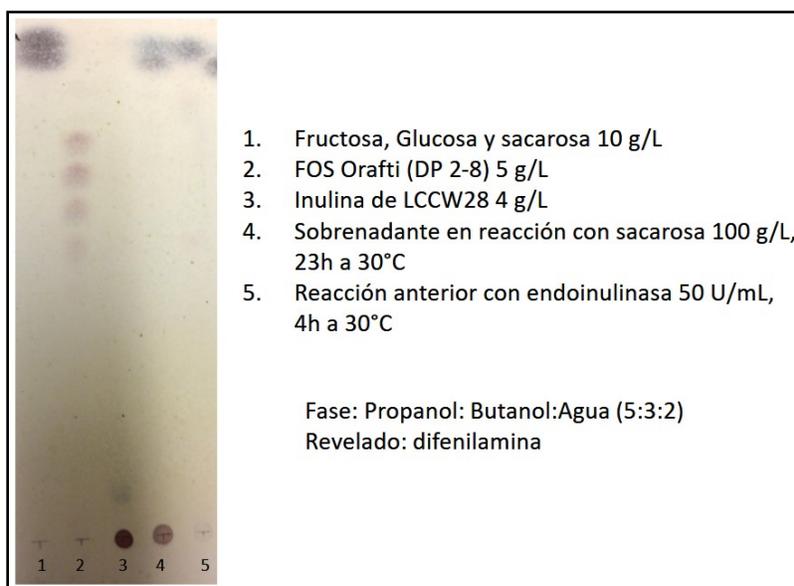
La primera estrategia consistió en precipitar todo el polímero que se produce en el cultivo, para después hidrolizar toda la inulina (producida por la enzima IslA) empleando una enzima de tipo exoinulinasa que permita hidrolizar el polímero hasta obtener fructosa. Finalmente, se analizó la reacción mediante TLC para verificar que la inulina estuviera completamente degradada y

determinar si existía un polímero en la reacción, en concreto una glucana sintetizada por GsrP. Los resultados de la TLC realizada con las muestras de la reacción de hidrólisis, se encuentra en la Figura 10.2. Con esta técnica los polímeros se quedan en los puntos donde se aplicó la muestra y se observan como manchas en la parte inferior de la placa, mientras que los azúcares de bajo peso molecular como los mono y oligosacáridos, migran junto con la fase móvil hacia la parte superior y aparecen en la parte superior. Además, el revelador empleado permite distinguir si la muestra contiene inulina (fructosa) al teñirse de un color rojizo mientras que si es dextrana (glucosa), se revela de color azul. Como puede observarse en la placa, las muestras tomadas del sobrenadante del cultivo de la bacteria contienen inulina (carril 4), que es completamente hidrolizada con la endoinulinasa (carriles 5 y 6). Se realizó un control con dextrana (Sigma) tratada con la endoinulinasa y así descartar cualquier reacción de la enzima sobre la dextrana (carril 7). La ausencia de dextrana en el cultivo, nos permite concluir que no hay producción de dextrana durante el crecimiento de la cepa CW28, y por lo mismo, que la enzima GsrP podría no estar inducida o podría no estar activa.



**Figura 10.2. Placa TLC con los resultados de la reacción de la endoinulinasa.** Se analizó el polímero producido por la cepa CW28 al crecer con sacarosa. Los puntos de la parte inferior de la placa son polímero: inulina (rojo) o dextrana (azul). Las manchas de la parte superior corresponden a monosacáridos y sacarosa. También es posible observar FOS que se usaron como muestra control, en el carril 3. La fase móvil permite separar fácilmente los FOS, aunque no separa la sacarosa de los monosacáridos.

La siguiente estrategia consistió en inducir la síntesis de la glucana en el sobrenadante del cultivo suponiendo que durante el cultivo la actividad predominante hubiera sido la de IslA. Para tal efecto se recuperó el sobrenadante del cultivo, se ajustó el pH a 6.5 y, suponiendo la presencia de GsrP, se empleó como medio de reacción adicionando sacarosa como sustrato. Esta reacción fue tratada con endoinulinasa para eliminar la inulina producida durante el cultivo y las muestras se analizaron por TLC (Figura 10.3). Como puede observarse, existía inulina en el medio de reacción proveniente del cultivo (punto rojo, carril 4), misma que fue totalmente hidrolizada por la endoinulinasa. Sin embargo, al final de la reacción (carril 5) no se observan manchas en la parte inferior de la placa, donde debería poder identificarse a la dextrana. Así, mediante esta segunda opción de búsqueda tampoco se encontraron indicios de dextrana y por lo mismo, de la actividad de la GsrP.



**Figura 10.3. Placa TLC del análisis del sobrenadante enriquecido.** El sobrenadante del cultivo con sacarosa fue enriquecido con sacarosa y tratado con endoinulinasa.

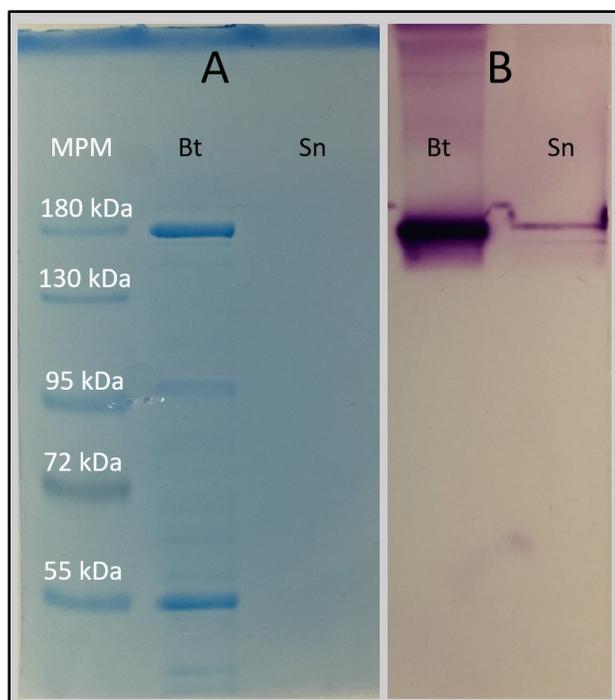
En conclusión y a diferencia de lo que sucede con otras cepas, en el caso de *L. citreum* CW28 solo se encontró evidencia de la actividad de IslA, que está produciendo inulina. Por otro lado, aunque se identificó a la glucansacarasa GsrP en el genoma de la cepa CW28, no se encontró evidencia de que esté produciendo polímero durante el cultivo o en una reacción posterior con el sobrenadante. Esto pudiera deberse a que la enzima no se produce en las condiciones que se

usaron (sacarosa 2%) o que la proteína no tenga actividad. Serán necesarios más análisis para determinar cuál de estas situaciones está pasando realmente.

#### 10.2.2. La cepa *L. mesenteroides* P45

Al igual que con el resto de las cepas seleccionadas, la cepa *L. mesenteroides* P45 se cultivó con sacarosa hasta el final de la fase exponencial (4 h de cultivo). La biomasa que se alcanzó fue de  $6.5 \pm 0.4$  unidades de  $DO_{600nm}$ . Las muestras fueron analizadas mediante un gel nativo de proteínas (Figura 10.4A) y un zimograma (10.4B) con el fin de identificar las actividades GTF. En este caso, se usaron muestras de las células recuperadas mediante centrifugación (Bt) y del sobrenadante del cultivo (Sn), dado que no se cuenta con información previa sobre la actividad y la localización de las GTFs de esta cepa. En la Figura 10.4A se observa que en la fracción Bt sobresale una banda gruesa que correspondería a la GS de 174 kDa identificada como Gpul4 en el genoma y otras bandas que corresponden a proteínas de tamaños menores entre las que podrían encontrarse las demás GSs de la cepa. Por otro lado, en la fracción Sn no se observan bandas, de modo que lo más probable es que las GSs de la cepa se encuentren unidas a la pared celular

Por otro lado, en la parte del zimograma, la Figura 10.4B, se observa una sola banda en la fracción Bt, correspondiente al polímero producido por Gpul4. En el carril de la fracción Sn del zimograma, se observan dos bandas, sin embargo, dado que en el gel teñido con Coomasie no se observan proteínas, lo más probable es que la muestra Bt se haya desbordado del pozo contaminando el carril Sn, de modo que es necesario repetir este experimento para descartar la presencia de GTFs activas en la fracción Sn. Sin embargo, con los datos que se han obtenido hasta este punto, solo es posible asegurar que se está produciendo una enzima activa: la Gpul4.



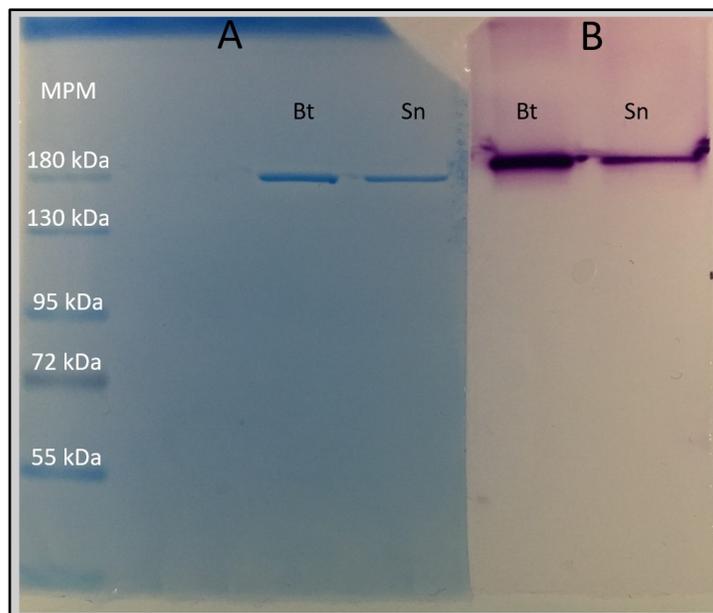
**Figura 10.4.** Gel de electroforesis de proteínas con muestras de la cepa *L. mesenteroides* P45 al final de la fase exponencial. Los carriles contienen muestras de células centrifugadas (Bt) y el sobrenadante (Sn). La sección A muestra las proteínas teñidas con azul de Coomassie. La fracción B corresponde al zimograma de las proteínas y las bandas rosas corresponden al polímero producido por enzimas activas.

Aunque se cuenta con el genoma secuenciado de esta cepa, el que se haya podido detectar solo una enzima usando sacarosa en el medio de cultivo, descarta a la cepa como candidata para el análisis con otras fuentes de carbono.

### 10.2.3. La cepa *L. mesenteroides* IBT-PQ

La cepa *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ fue aislada de una muestra de *pulque* y se sabe que produce al menos una dextransacarasa ya caracterizada (Chellapandian *et al.*, 1998), cuyo gen fue expresado heterológamente (Fernández-Velázquez *et al.*, 2007). Al crecer la cepa en sacarosa, la  $DO_{600nm}$  obtenida al final de la fase exponencial fue de  $8 \pm 0.1$  alcanzada a las 6 horas de crecimiento. Una muestra del cultivo en la fase estacionaria se utilizó para un zimograma, cuyo resultado se presenta en la Figura 10.5, donde se observa claramente una sola banda, tanto en la fracción celular (Bt) como en el sobrenadante (Sn) del cultivo, correspondiente a la enzima DsrP, una dextransacarasa de 166 kDa. Este resultado podría deberse a que una parte de la enzima se

desprende de la pared celular durante el cultivo o por efecto de la centrifugación. Será necesario hacer más pruebas para determinar la localización de esta proteína.



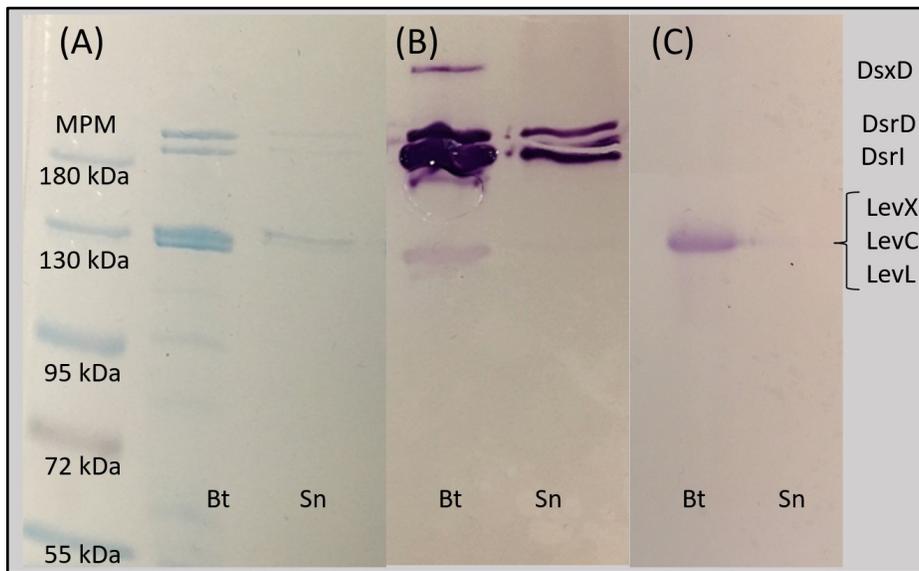
**Figura 10.5. Gel de electroforesis de proteínas con muestras de la cepa *L. mesenteroides* IBT-PQ al final de la fase exponencial.** Los carriles contienen muestras de células centrifugadas (Bt) y el sobrenadante (Sn). La sección A muestra las proteínas teñidas con azul de Coomassie. La fracción B corresponde al zimograma de las proteínas y las bandas rosas corresponden al polímero producido por enzimas activas. Solo es posible identificar una enzima activa en el gel.

Desafortunadamente, no se observa ninguna otra banda en el gel producto del análisis de las células crecidas en sacarosa. Este resultado, combinado con el hecho de que no se cuenta aún con la secuencia del genoma de la cepa de *Ln mesenteroides* IBT-PQ, permite descartar esta cepa de los análisis en diferentes FC. Hay que recordar que uno de los criterios de elección de la cepa, es la presencia de diversos genes de GTF para analizar el comportamiento durante el cultivo, de diversos factores que afectan la regulación.

#### 10.2.4. La cepa *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293

De la misma forma que en los casos anteriores, se analizó el comportamiento de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 en cultivo con sacarosa como FC. Con muestras de la fracción celular (Bt) y sobrenadante (Sn) del cultivo, se realizaron zimogramas con el objetivo de analizar la expresión y actividad de las enzimas GTFs. Dado que en el análisis bioinformático se

hallaron genes de FSs y de GSs, uno de los zimogramas se incubó con rafinosa que es sustrato específico de las FS, de manera que ambos tipos de enzimas pudieran identificarse en los zimogramas. Como se observa en la Figura 10.6, las bandas de actividad que se observan parecen tener un peso mayor al calculado con base a la secuencia aminoacídica, probablemente porque las muestras no están completamente desnaturalizadas. En los geles desnaturalizantes las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas son desacopladas con calor y/o compuestos azufrados; mientras que el detergente permite cargar negativamente toda la proteína, de modo que la movilidad de la proteína en el gel se hace más rápida y la resolución del gel es mayor (Arndt *et al.*, 2019). Pero, en los geles nativos, (como los zimogramas), la proteína no se desnaturaliza y las ventajas anteriores se pierden. En los geles nativos la movilidad de la proteína se ve influenciada por la carga de su superficie (dependiente de su secuencia y estructura secundaria o terciaria) y el tamaño de su molécula, como pasa en este caso, donde las enzimas se mueven más lento que el marcador de peso molecular (MPM) y por tanto aparentan pesos moleculares mayores a los que se calcularon a partir de la secuencia aminoacídica.



**Figura 10.6. Geles nativos de proteínas de *L. mesenteroides* ATCC 8293 cultivada en sacarosa.** El gel (A) está teñido con azul de Coomasie. El gel (B) es un zimograma incubado con sacarosa y teñido con reactivo de Schiff. El gel (C) es un zimograma incubado con rafinosa y teñido con reactivo de Schiff. Se utilizaron muestras de la fracción celular (Bt) y la fracción soluble (Sn) del cultivo. El polímero tipo glucana absorbe agua y sobresale del gel.

En el gel de la Figura 10.6A, se observan bandas correspondientes a las proteínas de la bacteria, tanto en la fracción celular (Bt) como en el sobrenadante del cultivo (Sn). En ambas fracciones sobresalen dos bandas de alrededor de 180 kDa que estarían relacionadas con las enzimas DsrI y DsrD; también se observan dos bandas por debajo de los 130 kDa, que corresponderían a dos o posiblemente tres de las FSs de la cepa. Aunque el gel de electroforesis es muy eficiente para separar proteínas, en el caso de las FSs, donde las proteínas tienen masas moleculares tan similares (108.6, 109.4 y 108.3 kDa respectivamente), es posible que una de las bandas contenga a dos de las proteínas. Por otro lado, en la imagen se aprecia que es en la fracción celular donde se encuentra la mayor cantidad de estas proteínas, lo que se debe a que las GTFs están unidas a la pared celular de la bacteria. Por lo tanto, las bandas que se observan en la fracción Sn podrían ser una porción pequeña de las GTFs que logró desprenderse de la pared al centrifugar la muestra.

En el zimograma incubado con sacarosa (Figura 10.6B) pueden detectarse todas las enzimas activas que produce la enzima al usar sacarosa como FC. En este caso, se observan 4 bandas: una de 308 kDa que sería la enzima DsxD; dos bandas de alrededor de 180 kDa correspondientes a DsrD y DsrI; y por último una sola banda que correspondería al polímero producido por una o las tres FSs de la cepa. El hecho de que solo se observe una banda en la región de las FSs, podría deberse a que solo una de las enzimas esté activa, o a una fusión del polímero producido por las dos bandas que se observan en el gel teñido con Coomassie, debido a las masas moleculares tan parecidas que poseen estas enzimas.

Por otro lado, el gel incubado con rafinosa (Figura 10.6C), demostraría cuales de las enzimas son del tipo FS, pues la rafinosa solo puede ser usada por estas enzimas para producir polímero, mientras que no es sustrato para las GSs. En la imagen se aprecia solo una banda correspondiente a una o varias de las proteínas de menos de 130 kDa, que, según los análisis bioinformáticos, son enzimas FSs. Estos resultados confirman que la cepa produce al menos dos enzimas del tipo GS y al menos una del tipo FS.

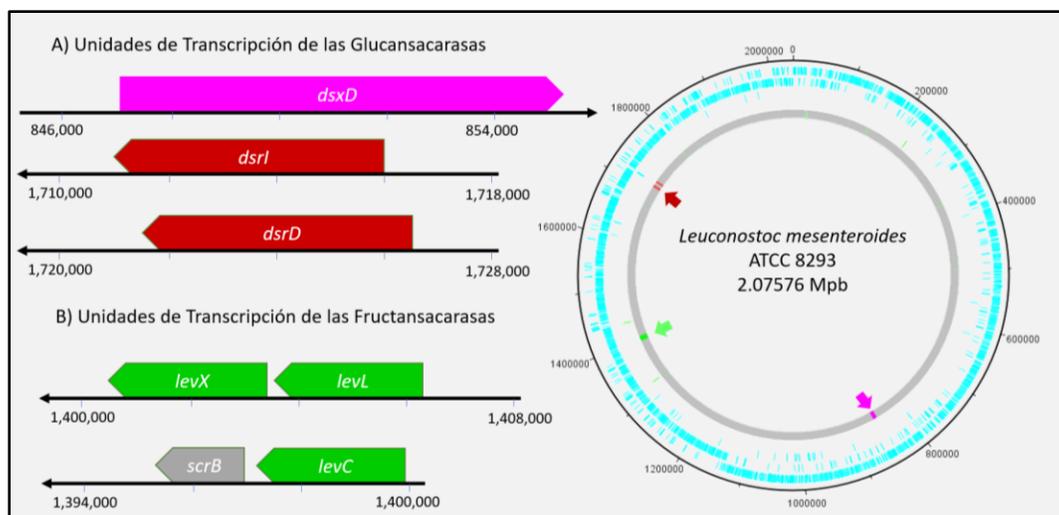
Los resultados obtenidos en esta sección, permiten observar el comportamiento de las GTFs de las distintas cepas de *Leuconostoc* disponibles (todas provenientes de alimentos fermentados de

origen vegetal), en cultivos en los que se incluye sacarosa como FC, condición que se estableció como control, dado el carácter que se ha asignado a este azúcar como inductor. Con base en estos resultados, la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 es la mejor candidata para estudiar el efecto de diversas fuentes de carbono en el cultivo, por varias razones: a) es la cepa que tiene más genes que codifican para GTFs, b) presenta los dos tipos de GTFs, al menos tres FSs y tres GSs y c) durante la caracterización de las cepas mediante geles de actividad (zimogramas), fue la cepa en la que se observó la inducción de un mayor número de enzimas, lo que se manifiesta a través de las bandas de actividad en los propios geles.

### 10.3. La cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 en diferentes FC

#### 10.3.1. Contexto genómico de las GTFs en *L. mesenteroides* ATCC 8293

El genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 tiene 2.07 Mb y contiene 2047 genes. Al visualizar la posición de los genes de las GTFs en el genoma (Figura 10.7), queda de manifiesto que los genes de las GS están dispersos a lo largo del mismo. El gen *dsxD* se encuentra en la hebra sentido (positiva) del genoma, mientras *dsrD* y *dsrI* se ubican en la hebra antisentido (negativa o complementaria) y no forman operones con otros genes, de acuerdo a los resultados de Operon Mapper (Taboada *et al.*, 2018). En contraste, los genes de las FS están localizados en la hebra negativa, dentro de una pequeña región de unos 12 kpb y forman dos operones: el operón *levLX*, formado por los genes *levL* y *levX* y el operón *levC-scrB*, constituido por el gen *levC* y el gen *scrB* correspondiente a una invertasa perteneciente a la familia Glicosil-Hidrolasa de la familia 32.



**Figura 10.7. Arreglo de los genes de las GTFs en unidades de transcripción.** A) las GS están dispersas a lo largo del genoma. B) las FS se localizan en una región y forman dos operones.

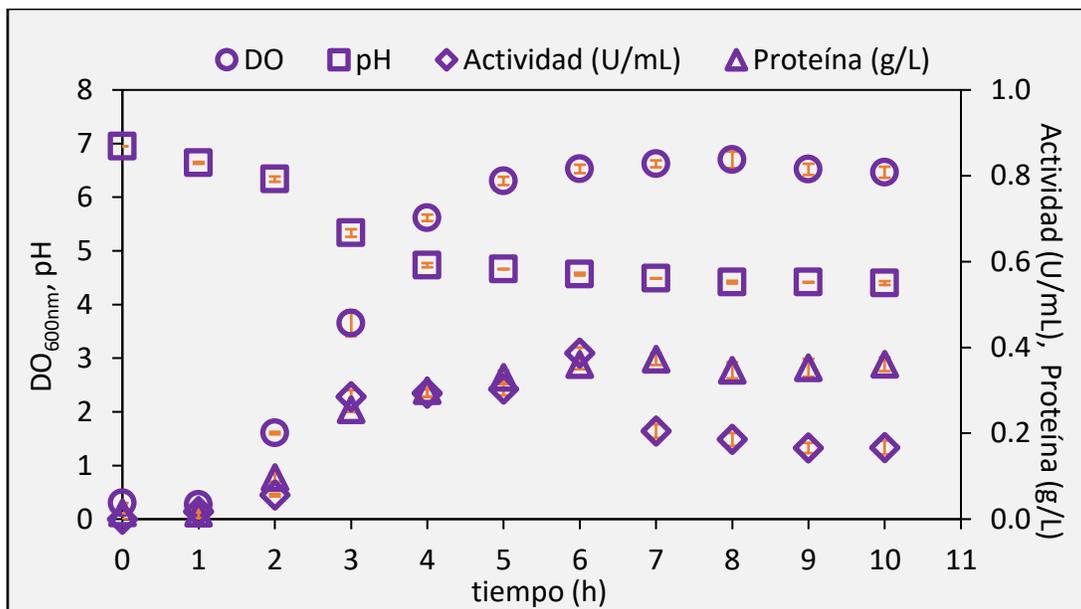
### 10.3.2. Estudio del crecimiento de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 en sacarosa

Con la cepa seleccionada, se procedió a caracterizar el comportamiento del cultivo en sacarosa como FC. Es importante señalar que cuando la cepa crece en sacarosa, se forman conglomerados de polímero y células muy difíciles de dispersar por medios físicos. Durante los estudios fisiológicos, estas estructuras interfieren con la determinación de la densidad óptica del cultivo y el volumen de las muestras, así como con otras mediciones al cultivo. Para evitar esta complicación se usó la enzima dextranasa (ENZIQUIM, México) en concentración de 1  $\mu$ L/mL de medio de cultivo como componente del medio de cultivo, de manera que los conglomerados se degraden al mismo tiempo que se forman.

Al monitorear la actividad del conjunto de GTFs de la cepa (“Actividad U/mL” en la Figura 10.8), se separaron las fracciones celular (Bt) y soluble (Sn) del cultivo mediante centrifugación y analizar las actividades de cada una por separado. Esto permitió demostrar que la mayor parte de la actividad de las GTFs está asociada a la fracción celular (datos no mostrados), mientras que la fracción soluble tiene una escasa actividad (menor a 0.1 U/mL de cultivo), por lo que en todos los casos los ensayos de actividad se refieren a la fracción celular del cultivo. Esto se debe, como ya se mencionó, a que las GTFs de la cepa están ancladas a la pared celular, como en el caso de

las GTFs de las cepas de *L. mesenteroides* IBT-PQ y *L. citreum* CW28, además de otras GTFs que provienen de BAL, como se mencionó en la sección 4.3. (Chellapandian *et al.*, 1998; Olivares-Illana *et al.*, 2003; Soumya y Nampoothiri, 2021; van Hijum *et al.*, 2006).

En la caracterización del cultivo, se determinó la densidad óptica, la actividad de las GTFs (en conjunto), la cantidad de proteína producida (en la fracción celular) y el pH durante el cultivo (Figura 10.8). Los resultados muestran que la actividad de las GTFs (fracción celular) alcanza su nivel máximo cuando el cultivo llega al final de la fase exponencial/principio de la fase estacionaria y va decayendo en las horas siguientes, aunque la densidad óptica se mantiene constante. El resultado sugiere que la actividad de las GTFs está asociada al crecimiento de la bacteria, mientras que la disminución en la actividad podría deberse a la exposición de las GTFs a la acidez (pH 5) que se alcanza al final del cultivo. Estas enzimas son relativamente sensibles al pH en el que se encuentran, por lo que probablemente su exposición a la acidez que se alcanza en el medio pudiera desactivarlas, como se ha reportado para otras GTFs de *Leuconostoc* (Olivares-Illana *et al.*, 2003; Ortiz-Soto *et al.*, 2004; Rabelo *et al.*, 2011; Tsuchiya *et al.*, 1952; Vallejo-García, 2017).



**Figura 10.8. Comportamiento de *L. mesenteroides* ATCC 8293 en cultivo con sacarosa.** Se analizaron tres réplicas biológicas y se presentan los promedios obtenidos de las réplicas. Las líneas naranjas dentro de los símbolos son las barras de error, que representan la desviación entre las réplicas.

### 10.3.3. Comportamiento de las GTFs al usar diferentes FC

El siguiente paso del proyecto, fue explorar el comportamiento de la cepa y las GTFs en otras FC diferentes a la sacarosa. Los compuestos utilizados fueron: D-fructosa, D-glucosa, D-xilosa, ácido ascórbico, D-manosa, D-galactosa y D-celobiosa. Se eligieron estos metabolitos por dos razones primordiales:

- i) la presencia del metabolito en plantas, principal nicho ecológico de las bacterias *Leuconostoc*
- ii) que los componentes de la vía metabólica correspondiente se encuentren completos en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293

En estos experimentos, además de conservar constantes la temperatura (28 °C), la disponibilidad de nutrientes (20 g/L de extracto de levadura en el medio) y la disponibilidad de oxígeno (agitación a 200 rpm), se mantuvo constante la molaridad de las FC en 59 mM, para evitar efectos debidos a cambios en la osmolaridad inicial del cultivo. Para asegurar que las observaciones hechas al cambiar las FC fueran realmente efectos de los cambios, la bacteria pasó por tres ciclos de cultivo con la nueva FC antes de analizar el crecimiento del cultivo, como se detalla en la sección 9.2.2 de la metodología.

Se registró el crecimiento de la bacteria, así como las variaciones en la actividad global, proteína total y pH en cada FC (Figuras S1-S7 del material suplementario). Los resultados demostraron que la mayor cantidad de actividad se obtuvo al final de la fase exponencial, igual que al usar sacarosa, por lo que las muestras para el ensayo de actividad y los zimogramas se tomaron del final de la fase exponencial para hacer una comparación en ese punto en todos los cultivos. En la Tabla 10.14 se presenta la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y la biomasa máxima de todos los cultivos, incluyendo en el que se usó sacarosa, donde resulta notorio que con sacarosa la bacteria crece más rápido, de modo que llega antes a la fase estacionaria. Aunque se puede realizar una comparación de las velocidades máximas de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) con los datos que se obtuvieron, sería interesante realizar un análisis sobre la cantidad de sacarosa que realmente está usando la bacteria como FC, dado que una parte de ese disacárido se convierte en polímero

durante el cultivo. Conociendo esta cantidad se podría hacer una comparación real sobre las FC y determinar cuál de ellas es la que prefiere la bacteria para crecer.

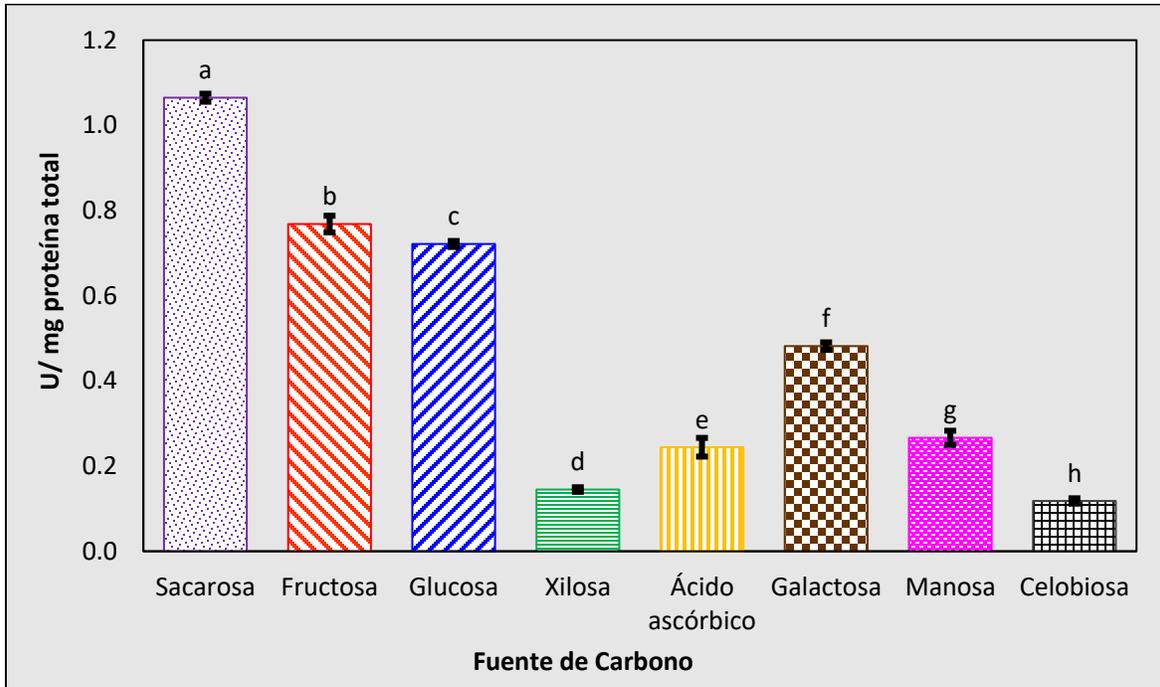
**Tabla 10.14. Velocidades máximas de crecimiento y biomasa producida por *L. mesenteroides* ATCC 8293 en las diferentes FC.**

| FC              | $\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> ) | Biomasa alcanzada (g/L) | pH en fase estacionaria |
|-----------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Sacarosa</b> | 1.02                            | 2.63                    | 4.4                     |
| Fructosa        | 0.43                            | 1.55                    | 5.9                     |
| Glucosa         | 0.56                            | 1.61                    | 5.3                     |
| Xilosa          | 0.20                            | 0.58                    | 6.5                     |
| Ácido ascórbico | 0.47                            | 0.34                    | 5.8                     |
| Galactosa       | 0.37                            | 1.28                    | 4.7                     |
| Manosa          | 0.16                            | 0.64                    | 6.0                     |
| Celobiosa       | 0.27                            | 1.65                    | 4.2                     |

Dentro de las hexosas, resulta notorio que la bacteria crece más rápido en glucosa, probablemente porque el resto de los compuestos debe pasar por procesos de isomerización antes de que la bacteria pueda integrarlos al proceso de glicólisis (Figura 10.9). El caso del ácido ascórbico y la xilosa es diferente: ambos entran a la célula y pasan por vías metabólicas particulares, para convertirse en D-xilulosa-5-fosfato, que se incorpora a la vía de la interconversión de pentosas y luego pasa por la vía de las pentosas fosfato para luego entrar a la glicolisis. Este proceso probablemente es el que ralentiza el crecimiento de la bacteria. Es claro que determinar la cantidad de productos (EPS, ácidos orgánicos, etanol, piruvato) que se forman durante el cultivo es indispensable para poder analizar el flujo de carbono en la bacteria, un objetivo que no pudo completarse por cuestiones de tiempo en el laboratorio, pero que debe ser el siguiente paso en el estudio de esta bacteria.



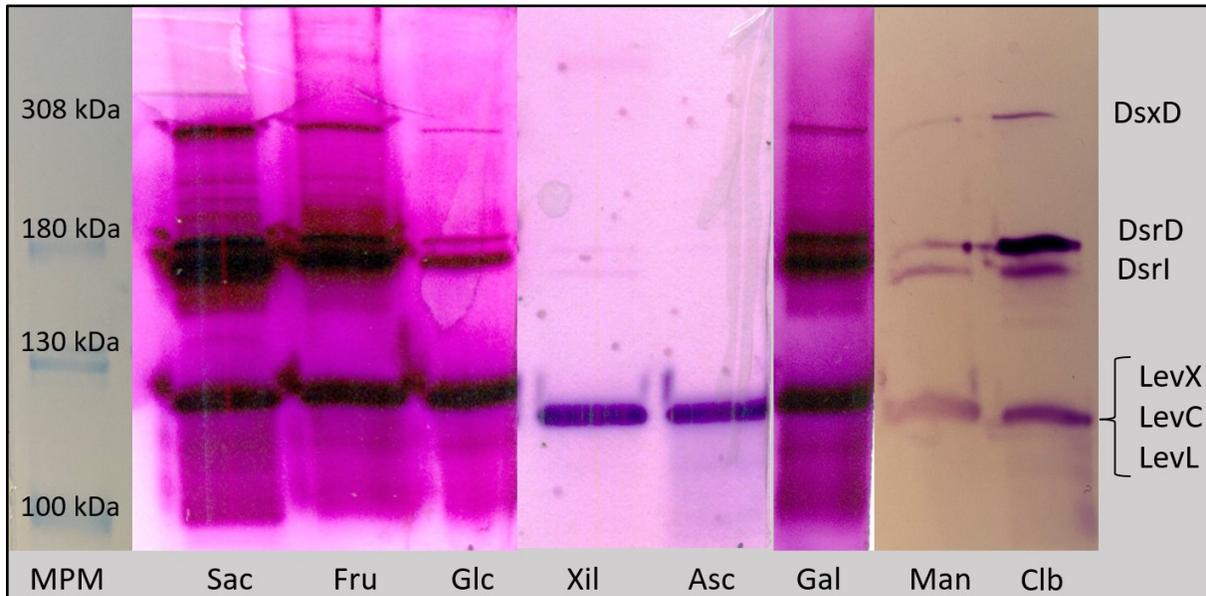
sacarosa no es indispensable para la producción de estas enzimas ya que presentan actividad al usar las otras FC ensayadas, aunque en niveles menores. Este fenómeno se ha observado más recientemente en otras cepas de *L. mesenteroides* que producen varias GTFs (Bivolarski *et al.*, 2013), lo que implica que aunque la sacarosa es un inductor fuerte para todas las GTFs de *Leuconostoc*, podría ser un inductor indirecto que podría estar operando a nivel de la transcripción como en el caso de la cepa *L. mesenteroides* B512f (Quirasco *et al.*, 1999).



**Figura 10.10.** Actividad global de las GTFs en las células de *L. mesenteroides* ATCC 8296, al final de la fase exponencial. Las letras sobre las barras indican diferencia significativa en la actividad total (ANOVA con el test de Tukey, tres réplicas biológicas y  $\alpha = 0.05$ ).

Como experimentos complementarios, se realizaron zimogramas con las células obtenidas al final de la fase exponencial de cada cultivo. Este tipo de experimentos permiten tener un esbozo cualitativo de la actividad enzimática de las proteínas que se puedan separar en el gel durante la electroforesis. En la Figura 10.11 se muestran los zimogramas obtenidos para cada FC, donde pueden observarse bandas que corresponden a los polímeros sintetizados por las enzimas activas. Resaltan los carriles correspondientes a los cultivos que usan xilosa y ácido ascórbico, pues se observan menos bandas que en los carriles de las demás FC: la banda correspondiente a DsxD no

se aprecia, lo que sugiere que la enzima no está presente o se encuentra en muy bajas cantidades. En cuanto a DsrD y DsrI aparecen muy tenues a comparación del resto de carriles, sugiriendo que se produce poca proteína que al usar xilosa y por lo tanto muy poco polímero. Estas diferencias entre la intensidad de bandas en diferentes FC, indica, *grosso modo*, que la expresión de las GS se ve está afectada por la FC utilizada en el cultivo de la bacteria.



**Figura 10.11. Zimogramas que muestran la presencia de 5 enzimas GTFs de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 cuando crecen en diferentes FC.** Sac = sacarosa, Fru = fructosa, Glu = glucosa, Xil = xilosa, Asc = ácido. ascórbico, Gal = galactosa, Man = manosa, Cel = celobiosa. En todos los geles se usó sacarosa como sustrato para las GTFs. Se cargaron 200 mg de proteína total en cada pozo.

Es posible que el comportamiento de las GTFs en ácido ascórbico y xilosa se relacione con su metabolismo, dado que la xilosa y el ácido ascórbico, ambos con 5 carbonos, comparten una vía diferente que el resto de las FC: la interconversión de pentosas. En esta vía las pentosas pasan por una serie de reacciones de isomerización y fosforilación para convertirse en D-xilulosa-5P, un metabolito intermediario común que puede incorporarse en la vía de las pentosas fosfato para completar su metabolismo. Estos hechos permiten sugerir, de manera preliminar, que la regulación del gen *dsxD* (correspondiente a la enzima que no aparece en xilosa y ácido ascórbico, la DsxD) está relacionada con la vía de la interconversión de las pentosas. También es posible que

el contexto genómico de este gen *dsxD* gen tenga influencia sobre su regulación, pues se encuentra alejado de los genes de las demás GSs de la cepa, lo que podría explicar parcialmente que tenga una respuesta diferente al resto de las GSs al usar xilosa o ácido ascórbico.

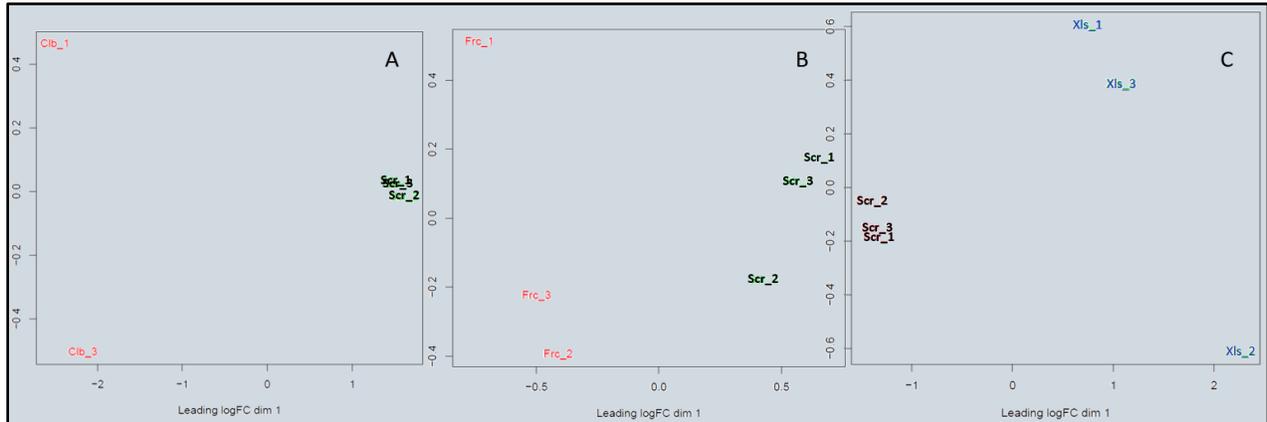
Por otro lado, en el caso de las FSs (LevX, LevL y LevC) la banda que se observa por debajo de los 130 kDa, puede corresponder al polímero producido por al menos dos de las FSs, como se planteó en la sección 10.2.4. Se consideró la posibilidad de usar geles de dos dimensiones para separar a las FS, pero los puntos isoeléctricos de las enzimas son muy similares: 4.63, 4.48 y 4.64 (calculados en ExPasy) por lo que un gel de dos dimensiones tampoco serviría para separarlas.

Es muy probable que el análisis de las condiciones más contrastantes pudiera proporcionar más información sobre la regulación de las GTFs en la bacteria, de modo que, con base a las diferencias en la actividad de las GTFs de la cepa que se han observado en las diferentes fuentes de carbono, se usaron células crecidas en sacarosa como condición control y xilosa, fructosa y celobiosa como tratamientos. Se incluyó en el análisis a la celobiosa, porque es un disacárido, pero no es sustrato de las GTFs, además, es un componente importante en plantas, por lo que podría resultar interesante para entender mejor la ecología de la bacteria y el rol de las GTFs en ese contexto.

#### **10.4. Análisis de expresión diferencial de genes de *L. mesenteroides* ATCC 8293 (AED)**

El análisis transcriptómico se realizó mediante la técnica de RNA-Seq, usando como condición de control a los cultivos crecidos en sacarosa y como condiciones de interés, a los cultivos crecidos en fructosa, xilosa y celobiosa. A partir de los datos obtenidos de la RNA-Seq, se realizó un análisis diferencial, del que se obtuvo una lista con el LOG<sub>2</sub> de la tasa de cambio (LOG<sub>2</sub>TC) entre condiciones para cada gen, así como la clasificación de los genes por su función según la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG). Se realizó también un análisis dimensional de LOG<sub>2</sub>TC para comprobar si las muestras pueden considerarse réplicas biológicas para cada FC, dado que, para asegurar el poder estadístico de las comparaciones, debemos contar con al menos tres réplicas de cada condición. Al examinar las gráficas de escalamiento multidimensional (Figura 10.12) de las muestras, resultó evidente que una de las réplicas de las muestras producidas con celobiosa era muy diferente a las

otras (Clb\_2), que no aparece en la Fig. 10.12A, de modo que no puede considerarse como réplica biológica. Es probable que esto se debiera a un problema con la manipulación de las muestras, un error técnico. Dado que realizar un análisis estadístico con dos muestras no es suficientemente representativo, el análisis se limitó a las muestras con sacarosa, fructosa y xilosa.



**Figura 10.12. Análisis de Escalamiento Multidimensional de las muestras.** A) Sacarosa (negro) vs celobiosa (rojo), B) Fructosa (rojo) vs Sacarosa (negro) C) Xilosa (azul) vs Sacarosa (negro).

Típicamente, cuando se modifica una condición en un cultivo de bacterias, el nivel de expresión de la mayoría de sus genes se ve afectado, dado que la bacteria debe ajustar su fisiología para afrontar las condiciones ambientales a las que se ve sometida. Por lo tanto, es necesario establecer un límite, ciertamente arbitrario, para decidir si existe o no un cambio en el nivel de expresión de los genes. Con el objetivo de enfocar el estudio en los cambios más radicales en la expresión y, siendo esta la primera aproximación hacia la comprensión de la regulación de los genes de las GTFs en la bacteria, se estableció un límite relativamente alto para determinar cuáles genes están diferencialmente expresados: si  $\text{LOG}_2$  de TC  $> 2$  = el gen está inducido, mientras que si  $\text{LOG}_2$  de TC  $< -2$  = el gen está reprimido. En la Tabla 10.15, se compara la cantidad de GED (Genes Expresados Diferencialmente) para cada condición, con ambos cortes en los límites de definición antes descritos.

**Tabla 10.15. Comparación de los GED en cultivos de *L. mesenteroides* ATCC 8293 con fructosa o xilosa como fuentes de carbono relativos al cultivo con sacarosa.**

|                  | LOG <sub>2</sub> TC > 2 < -2 |    |                 |     |
|------------------|------------------------------|----|-----------------|-----|
|                  | Fructosa/Sacarosa            |    | Xilosa/Sacarosa |     |
|                  | SE                           | RE | SE              | RE  |
| <b>Cromosoma</b> | 9                            | 11 | 151             | 323 |
| <b>Plásmido</b>  | 0                            | 0  | 9               | 2   |
| <b>GED total</b> | 9                            | 11 | 160             | 325 |

SE: sobreexpresados, RE: reprimidos

En la Tabla anterior queda de manifiesto que existe una gran diferencia en el número de GED entre las condiciones comparadas. En el caso de la relación fructosa/sacarosa, resultaron muy escasos los genes con cambios significativos en su nivel de expresión, por lo que podría establecerse que no hay diferencia entre ambas condiciones. En cambio, en la relación xilosa/sacarosa, la cantidad de genes es mucho mayor, lo que revela que el uso de xilosa como FC en el cultivo de *L. mesenteroides* ATCC 8293, provoca cambios dramáticos en la expresión de los genes de la bacteria.

Ahora, cuando se revisan los niveles de expresión de los genes de las GTFs de la cepa, también se observa el considerable efecto de usar xilosa en lugar de fructosa, como se muestra en la Tabla 10.16, donde se evidencia la represión que existe sobre los genes de 5 de las GTFs al usar xilosa como fuente de carbono, mientras que el gen de una de las dextranacararas (*dsrD*) no presenta cambio significativo en esta condición.

**Tabla 10.16. Cambios en la expresión de los genes de las GTFs de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293.**

| <b>ID Locus</b> | <b>Gen</b>  | <b>LOG<sub>2</sub>TC (Xil/Sac)</b> | <b>Xilosa</b> | <b>LOG<sub>2</sub>TC (Fru/Sac)</b> | <b>Fructosa</b> |
|-----------------|-------------|------------------------------------|---------------|------------------------------------|-----------------|
| LEUM_1409       | <i>levC</i> | -2.73                              | Reprimido     | -1.44                              | NDC *           |
| LEUM_1410       | <i>levX</i> | -2.13                              | Reprimido     | -0.51                              | NDC *           |
| LEUM_1411       | <i>levL</i> | -2.81                              | Reprimido     | -0.50                              | NDC *           |
| LEUM_0857       | <i>dsxD</i> | -2.06                              | Reprimido     | -0.08                              | NDC *           |
| LEUM_1747       | <i>dsrD</i> | -0.62                              | NCD *         | -0.19                              | NDC *           |
| LEUM_1752       | <i>dsrI</i> | -2.22                              | Reprimido     | -0.15                              | NDC *           |

NDC \* No se detectó cambio usando LOG<sub>2</sub> TC > 2 o <-2.

Este resultado es consistente con los resultados de los análisis bioquímicos, donde la actividad total de las GTFs (Figura 10.10) es mayor al usar sacarosa, mientras existe una disminución en la actividad al usar cualquier otra FC. Los niveles de expresión observados en la Tabla 10.16, indican que hay una expresión considerablemente menor de las GTFs en xilosa, cuando se compara con fructosa, lo que también es consistente con lo observado en la Figura 10.10, donde se mostró que el descenso en la actividad de las GTFs es más severo en xilosa que en fructosa. Como se ha mencionado, hay poca información sobre el efecto de las FC sobre la actividad de las GTFs de BAL o de *Leuconostoc* en particular. El resultado de la Tabla 10.16, constituye un primer hallazgo sobre el efecto de las FC sobre la expresión de las GTFs de la cepa.

Para el caso de los zimogramas (Figura 10.11) la consistencia persiste: en los cultivos con xilosa en el zimograma hay bandas más tenues que en el resto de las FC e incluso la desaparición de la banda correspondiente a DsxD, mientras que en el análisis transcriptómico la mayor represión de los genes ocurre en xilosa. Por otro lado, al usar sacarosa se aprecian bandas más densas en el zimograma y el mayor nivel de expresión en para todos los genes de las GTFs. Asimismo, al comparar los resultados entre sacarosa y fructosa, en el zimograma se observan bandas más tenues en fructosa, mientras que el nivel de expresión también es menor, aunque la diferencia es mínima.

Sin embargo, esta consistencia no se mantiene en el caso de las FSs, pues la banda que corresponde a una o más de estas enzimas parece tener la misma intensidad en todas las FC y en el análisis transcriptómico está clara la disminución en el nivel de expresión de los genes de las FSs. Es posible que esto sea un artefacto del polímero producido, que es lo que se tiñó en el zimograma. Para poder tener una relación clara entre la expresión de las FS y los zimogramas, será indispensable buscar métodos para separarlas efectivamente

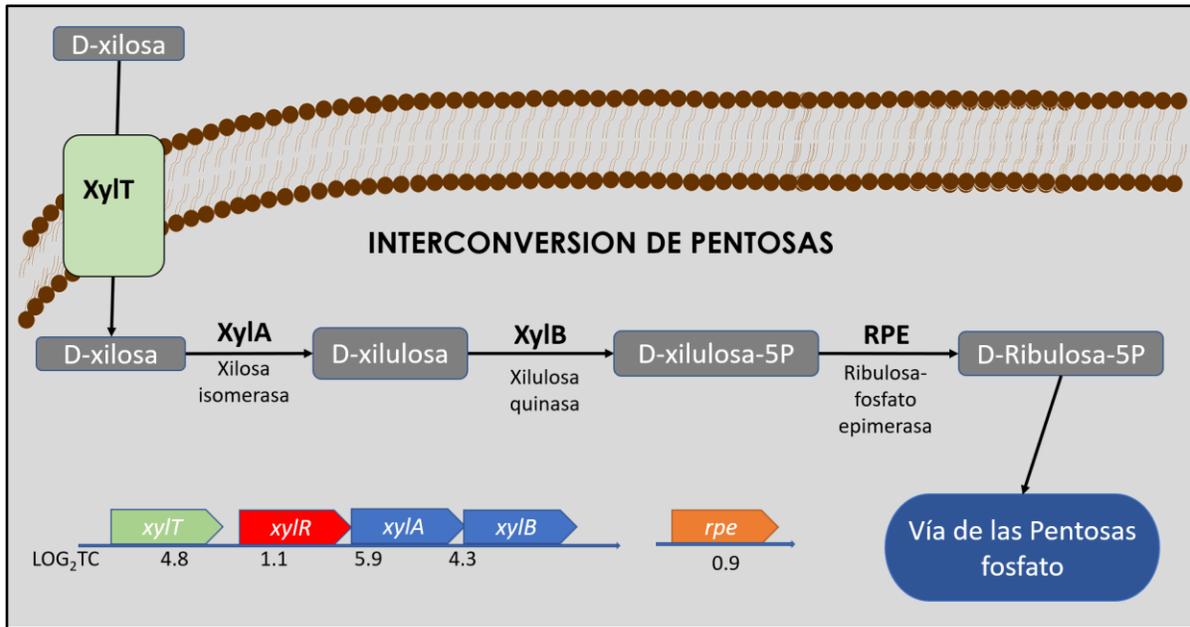
Las grandes diferencias que existen entre la expresión de los genes en xilosa y sacarosa, sugieren que investigar a detalle los cambios que ocurren entre estas condiciones, permitirán encontrar elementos de regulación que pudieran estar interviniendo.

#### 10.4.1. Expresión génica en xilosa

Las cepas de *L. mesenteroides* pueden usar xilosa como fuente de carbono, aunque no está del todo claro que tipo de sistema utilizan para transportar al carbohidrato al interior de la célula (Chun *et al.*, 2017). Dado que la xilosa forma parte importante de la pared celular de plantas, el nicho ecológico de las *Leuconostoc* (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004), es muy posible que este azúcar sea utilizado por las bacterias en su ambiente natural. En el caso del genoma de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 se encuentran 31 genes anotados como transportadores tipo MFS (Major Facilitator Superfamily), aunque no está especificado el compuesto que transportan. En trabajos previos (Otero B. 2009), se especuló que la sacarosa, glucosa y fructosa podían entrar a la célula usando el PTS manosa. Sin embargo, analizando los genes de MFS en el contexto de las FC, resalta el gen de la proteína WP\_011679092.1, que se sobre expresa en esta condición, de modo que sugiere que se trata del simportador para D-xilosa: XylIT (gen: *xylT*, LEUM\_0128, LOG<sub>2</sub>FC = 4.8).

Además del gen del simportador para xilosa, existe un grupo de genes que se induce muy favorablemente y que están relacionados con el metabolismo de la xilosa. Una vez dentro de la célula, la xilosa pasa a la ruta de la interconversión de pentosas donde es convertida primero por la xilosa-isomerasa (gen: *xylA*, LEUM\_0130, LOG<sub>2</sub>FC = 5.9) en xilulosa y luego fosforilada por la xilulo-cinasa (gen: *xylB*, LEUM\_0131, LOG<sub>2</sub>FC = 4.3) produciendo D-xilulosa-5-P, un metabolito intermedio que se incorpora a la vía de las pentosas fosfato para continuar su metabolismo, como

se muestra en la Figura 10.13. Los genes de estas reacciones formarían el operón *xylRAB* que estaría regulado por el Factor de Transcripción (FT) XylR (gen: *xylB*, LEUM\_0129, LOG<sub>2</sub>FC = 1.1) como indica la base de datos RegPrecise (Novichkov *et al.*, 2013). La sobre expresión de los tres genes del metabolismo de xilosa indican que los resultados que se observan en la transcriptómica son debidos uso de xilosa como fuente de carbono.



**Figura 10.13. Consumo y metabolismo inicial de la xilosa en *L. mesenteroides* ATCC 8293.** Los genes de las enzimas que participan en este mecanismo se encuentran en la parte inferior y se muestran los cambios en el nivel de expresión (LOG<sub>2</sub>FC) en xilosa con respecto a sacarosa.

#### 10.4.2. Explorando posibles vías de regulación de las GTFs en la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293

Como se mencionó previamente, la sacarosa parece tener un papel de inductor de las GTFs en cepas de *Leuconostoc*, pero su mecanismo de regulación no se ha elucidado. Son pocos los trabajos publicados que intentan explicar los aspectos fisiológicos y los mecanismos detrás de la regulación de las GTFs de la bacteria; en su lugar, la mayoría de los reportes se limitan a registrar la diferencia en los niveles de expresión como respuesta a un cambio en las condiciones ambientales, por ejemplo: fuente de carbono (Dols *et al.*, 1997), temperatura (Besrouer-Aouam *et al.*, 2019; De Bellis *et al.*, 2022) o disponibilidad de oxígeno (Dror *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2016).

Por otro lado, las GTFs no son exclusivas de *Leuconostoc*, pueden encontrarse en otros microorganismos del phylum *Firmicutes* en los que, en algunos casos, se han encontrado indicios de regulación de las enzimas a nivel transcripcional, como se mencionará en las siguientes secciones. Con el objetivo de determinar si estos indicios pueden aplicarse a la cepa bacteria modelo, se analizaron algunos elementos regulatorios conocidos en el contexto transcriptómico de la comparación xilosa/sacarosa, dado que en esta condición fue donde se hallaron las mayores diferencias en el nivel de expresión de genes.

Al comenzar la búsqueda, resulta llamativo que uno de los genes que más se reprimen al usar D-xilosa es *pgi* (LEUM\_0355, LOG<sub>2</sub>FC = -4.08), correspondiente a la glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi), una enzima implicada en el metabolismo central de carbohidratos y en el metabolismo energético. Dados los resultados que se obtuvieron tanto en el crecimiento de la bacteria en xilosa, como en la expresión de las GTFs en xilosa y la represión de *pgi*, es posible que haya una relación entre el metabolismo energético y la regulación de las GTFs. Dado que CcpA, la proteína A de control catabólico por carbono (Park *et al.*, 2005) es un Factor de Transcripción que afecta directamente a *pgi*, ese factor de transcripción puede ser un buen punto de partida para explorar los elementos de regulación de la bacteria.

#### ♦ *El factor de transcripción CcpA*

Se han propuesto diversos elementos de regulación de las GTFs de las cepas de *Leuconostoc*, usando como modelos otras bacterias lácticas productoras de GTFs. Un modelo que se ha estudiado por su importancia en la salud humana es *Streptococcus mutans*, productora de las dextranacararas GtfB y GtfD, enzimas que contribuyen a la generación de la placa dental. Los genes *gtfB* y *gtfD* forman un operón junto con una proteína de transporte de membrana y se regulan directamente por la proteína CcpA (Zeng *et al.*, 2013). Esta proteína es un Factor de Transcripción (FT) que controla el metabolismo central de carbohidratos en diversas bacterias lácticas y que responde al uso preferencial de algún carbohidrato (Warner y Lolkema, 2003). CcpA pertenece a la familia de FT tipo LacI-GalR, tiene un efecto de represión alostérica sobre la transcripción de sus genes blanco: CcpA forma un complejo con la proteína HPr fosforilada y así se une en un sitio específico en la región promotora para prevenir la transcripción (Ravcheev *et*

*al.*, 2014). El sitio donde se une el complejo CcpA-HPr-P a la hebra de ADN se conoce como sitio *cre* (catabolite-responsive element por sus siglas en inglés) y tiene una secuencia canónica para los *Lactobacillaceae*: WTGWAARCGYTTWCAW; identificada a partir de experimentos genómicos y genómica comparativa ([https://regprecise.lbl.gov/regulon.jsp?regulon\\_id=34354](https://regprecise.lbl.gov/regulon.jsp?regulon_id=34354), (Novichkov *et al.*, 2013; Warner y Lolkema, 2003). En trabajos previos se habían analizado las regiones río arriba de las GTFs de la cepa, sin encontrar la secuencia *cre*, hecho que se comprobó recientemente incrementando la longitud de las regiones río-arriba de las GTFs y tomando en cuenta la formación de operones ya señalada (sección 10.2.5), usando la herramienta de búsqueda de motivos FIMO (Grant *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que CcpA no tiene efecto regulador sobre las GTFs de la cepa. Por otro lado, en el análisis diferencial, se determinó que en xilosa técnicamente no hay cambio en la expresión del gen *ccpA* (LEUM\_0544, LOG<sub>2</sub>TC = -1.17), por lo que es posible que la cantidad de proteína CcpA esté limitada para funcionar como represor. Sin embargo, sería necesario cuantificar la cantidad de proteína CcpA y de la proteína HPr-fosforilada en ambas condiciones para determinar si realmente el sistema CcpA-HPr tiene un efecto represor.

Sin embargo, CcpA tendría efecto sobre al menos 77 genes de la cepa, la mayoría de ellos, sistemas fosfo-transferasa (Phosphotransferase system, PTS por sus siglas en inglés) que permiten el transporte de carbohidratos al interior de la célula; según la base de datos RegPrecise, ([https://regprecise.lbl.gov/regulon.jsp?regulon\\_id=34354](https://regprecise.lbl.gov/regulon.jsp?regulon_id=34354)) (Novichkov *et al.*, 2013). Se sabe que la xilosa y la fructosa entran a la célula por medio de simportadores, pero en el caso de la sacarosa, una parte entra a la células usando el sistema PTS. Esto hace necesario investigar las cascadas de regulación en las que participan los PTS para determinar si hay alguno que pueda afectar la regulación de los genes de las GTFs en la cepa ATCC 8293.

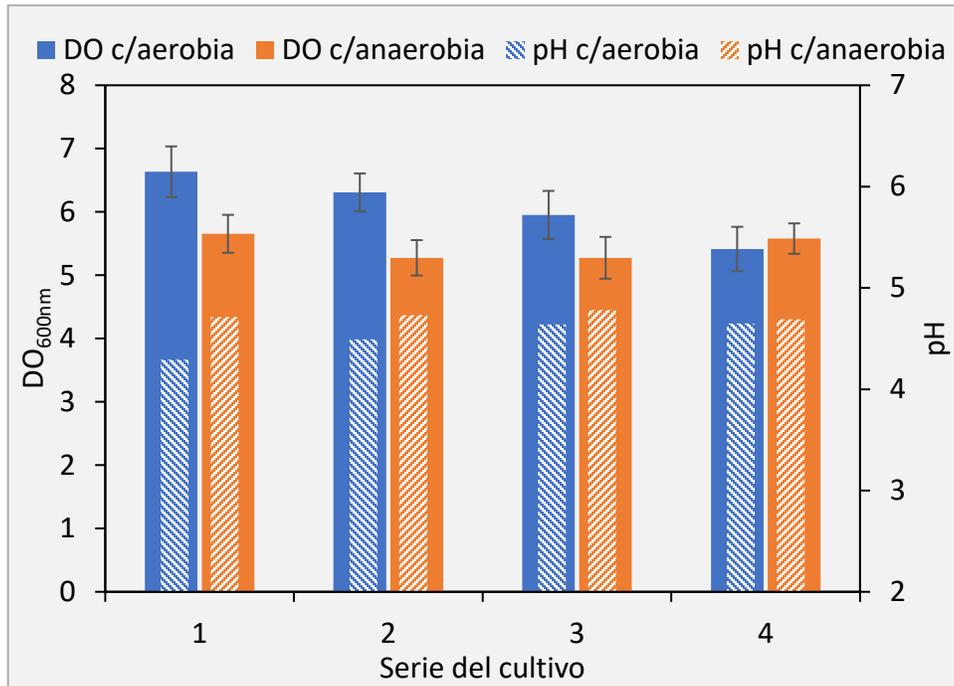
♦ *El factor de transcripción PerR, la respuesta a especies reactivas de oxígeno*

Recientemente algunos trabajos sugieren que la expresión de la GTF Gsy de la cepa *L. mesenteroides* BD3749 está regulada por la exposición de la bacteria a especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) dado que el polímero producido por Gsy es capaz de atrapar a las ROS, protegiendo a las células y mejorando su viabilidad (Yan *et al.*, 2016). Este trabajo nos llevó a especular que la clave de la regulación de las GTFs en *Leuconostoc* es la exposición a ROS, dado que este género de bacterias es catalasa-negativa (Björkroth *et al.*, 2014) y necesita algún sistema para contender con el estrés oxidativo. Uno de estos sistemas es el sensor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PerR, una proteína dimérica que requiere estar unida a un metal para unirse al ADN y prevenir la transcripción del gen que regula; cuando los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se elevan, comienza una serie de reacciones que inducen un cambio conformacional en PerR y ya no puede unirse al ADN (Imlay, 2015).

Con base en estos antecedentes, se investigó el efecto de la exposición de la cepa a especies reactivas de oxígeno (ERO). Para este propósito, se emplearon botellas para suero que pudieran cerrarse para impedir el contacto del oxígeno con la bacteria. Se conservaron las condiciones de cultivo en sacarosa, es decir la relación de volumen cultivo/recipiente (1:5), la agitación y la temperatura de la incubadora. La condición aeróbica se estableció al usar botellas tapadas con algodón, mientras que la condición anaeróbica se consiguió al desplazar el oxígeno del medio y cerrar la botella como se indica en la sección 9.2.3 (metodología). En este experimento se usó dextranasa en los cultivos para poder contrastar los resultados de la sección 10.3.1 con los obtenidos en este experimento. Para complementar el experimento, se realizaron cultivos sin dextranasa con el fin de observar si se formaban conglomerados de polímero, con el objetivo de realizar observaciones directas y cualitativas.

Como en el caso de los cambios de fuentes de carbono, se hicieron fermentaciones seriadas en condiciones anaeróbicas para asegurar que la cepa se habituara a la falta de oxígeno y cualquier cambio en el comportamiento de la cepa fuera resultado de estas condiciones. Las primeras dos fermentaciones se dejaron por 12 horas y las últimas dos, solo hasta llegar a la fase estacionaria. En la Figura 10.14 se presentan los resultados de la biomasa (DO<sub>600nm</sub>) (barras sólidas) y el pH

(barras con textura) finales de los cultivos aeróbicos (barras azules) y anaeróbicos (barras anaranjadas) durante las series de fermentaciones, donde resulta evidente que existe una variación en la cantidad de biomasa producida entre condiciones, que casi desaparece en el último ciclo, lo que implicaría que la bacteria se acostumbra al nuevo ambiente anaeróbico.



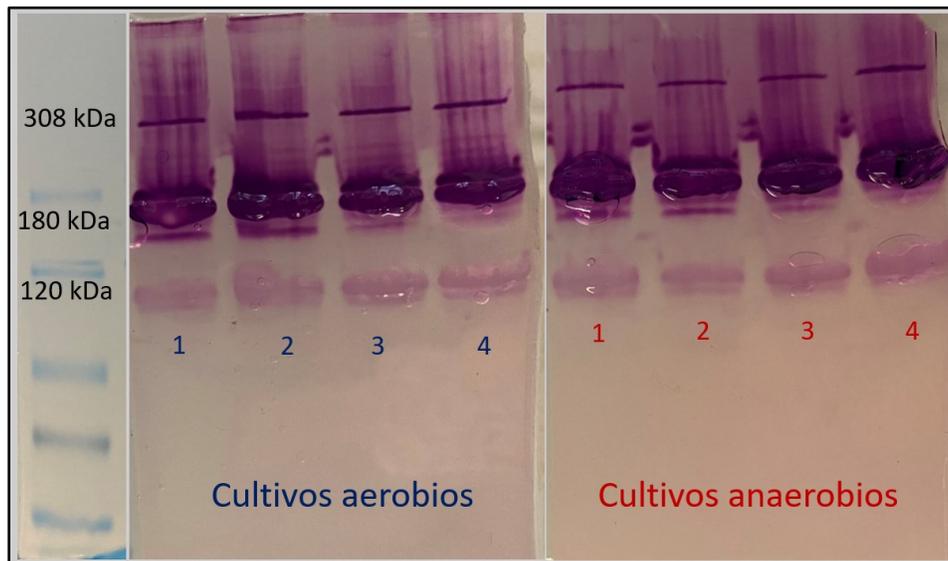
**Figura 10.14. Biomasa y pH finales de las fermentaciones seriadas en condiciones aeróbicas (barras azules) y anaeróbicas (barras anaranjadas) de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293.** Los números se refieren a la serie del cultivo de donde se obtuvieron las muestras.

Sin embargo, lo más interesante resulta al analizar la actividad de las células del cultivo a tiempos finales, los resultados se encuentran en la Tabla 10.17, donde los valores de la actividad de las GTFs son muy similares, lo que sugiere que exponer a la bacteria a condiciones oxidantes, es decir en contacto con oxígeno, no tiene un efecto sobre la actividad de estas enzimas.

**Tabla 10.17. Actividad relativa de las GTFs en la fermentación final (No. IV)**

| Condición          | Actividad total<br>(U/mg de proteína) |
|--------------------|---------------------------------------|
| Cultivo Aeróbico   | 1.06 ± 0.009                          |
| Cultivo Anaeróbico | 1.04 ± 0.009                          |

Por último, se preparó un zimograma de las células cosechadas al final de cada fermentación. Los geles se prepararon en las condiciones habituales (Sección 9.5 de la metodología). En la Figura 10.15 se observan fotografías de los zimogramas: del lado izquierdo se observa el zimograma de condiciones aeróbicas y del derecho las anaeróbicas. En esa figura se aprecian los polímeros producidos por las células en ambas condiciones y no hay una diferencia entre las condiciones utilizadas.



**Figura 10.15. Zimogramas de células obtenidas de las fermentaciones seriadas. En los cultivos se usó sacarosa como FC. Los números indican la serie de donde provienen las células. Los geles muestran las enzimas activas que se producen en cada cultivo.**

Los resultados obtenidos, tanto de la actividad como de los zimogramas, demuestran que no hay cambios significativos entre ambas condiciones; por lo que se puede concluir que, al menos en esta cepa, no parece haber un efecto en la expresión de GTFs en presencia/ausencia de oxígeno.

Por otro lado, en el análisis diferencial de xilosa/sacarosa, el gen *perR* está reprimido en xilosa (LEUM\_0492, LOG<sub>2</sub>FC = -2.3), lo que, posiblemente, podría limitar su actividad como represor. Estos resultados, junto con los zimogramas y la cuantificación de biomasa y actividad sugieren que en la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 el regulador PerR no tiene efecto sobre la expresión de los genes de las GTFs en las condiciones ensayadas. Además, un estudio sobre la cepa *L. mesenteroides* YL48, demostró que la exposición a CO<sub>2</sub> incrementa la producción de polímero debido a un aumento en la expresión de dos GTFs: DsrD y DsrT (Dror *et al.*, 2019). Las evidencias bibliográficas en conjunto con los resultados del experimento con la cepa ATCC 8293, sugieren que posiblemente el efecto de los ROS sobre la expresión de las GTFs sea particular para cada cepa.

♦ *El factor de transcripción LexA*

Otro caso interesante es el de la cepa *Weissella cibaria* C2-32 —una bacteria *Firmicutes* taxonómicamente muy cercana a *Leuconostoc*— para la que se sugiere que la regulación de la GTF que posee, podría estar relacionada con el Factor Transcripcional (FT) LexA (De Bellis *et al.*, 2022). Esta proteína funciona como represor de su propio gen y de genes relacionados con la reparación de ADN en condiciones normales. Cuando ocurre un daño extremo a la célula, la proteína LexA es disociada de la región promotora de los genes que controla, permitiendo su expresión y la reparación del ADN dañado (Butala *et al.*, 2009).

Los datos de transcriptómica muestran la sobreexpresión del gen *lexA* en xilosa/sacarosa (LEUM\_1204, LOG<sub>2</sub>FC = 2.4), mientras que el nivel de expresión se mantiene en fructosa/xilosa (LEUM\_1204, LOG<sub>2</sub>FC = 0.1). Al hacer una búsqueda en las regiones río arriba de los genes de las enzimas GTFs contra las secuencias de reconocimiento de LexA ([https://regprecise.lbl.gov/regulon.jsp?regulon\\_id=46374](https://regprecise.lbl.gov/regulon.jsp?regulon_id=46374)) mediante la herramienta FIMO (Grant *et al.*, 2011), solo se localizó un posible sitio de unión en la región río arriba del operón *levLX*, lo que sugiere que la regulación de este operón puede estar sujeta al represor LexA en xilosa. Es interesante notar que el pH alcanzado al final de la fase exponencial es más bajo en sacarosa (pH = 4.53) y fructosa (pH = 5.26) que en xilosa (pH = 6.13). Existen evidencias de que la proteína LexA de *E. coli* se agrega en pH ácido (2.5), aumentando su afinidad por regiones inespecíficas de ADN

y disminuyendo su capacidad represora (Sousa *et al.*, 2006). Estos hallazgos apuntan, hipotéticamente, a que pudiera ser que el pH más bajo en los cultivos con sacarosa y fructosa sea una condición extrema para la cepa, que favorezca el desacoplamiento de la proteína LexA de la región promotora del operón *levLX*, permitiendo su transcripción y en consecuencia produciendo más proteína y más polímero para proteger a la célula de condiciones ácidas. Es necesario comprobar si la expresión de los genes de las GTFs en sacarosa puede reprimirse si el pH del cultivo se mantiene por arriba de 6, como al usar xilosa, de manera que se pueda comprobar esta hipótesis.

♦ *El sistema de dos componentes VicR/VicR*

Existe un interés importante en la regulación de las GTFs de *S. mutans*, debido a su participación en la formación de biopelículas, la placa bacteriana y la caries (Hamada y Slade, 1980), por lo que la producción de EPS por *S. mutans* cuando hay sacarosa en el medio es considerado un factor de virulencia (Hudson y Curtiss, 1990; Y. Li y Burne, 2001). *Streptococcus* y *Leuconostoc* pertenecen al grupo de los *Firmicutes*, más específicamente al orden de los *Lactobacillales*. Igualmente, las GTFs de ambas especies suelen tener una alta identidad de secuencia (al menos 48%), lo que permite hipotetizar sobre la posibilidad de que las GTFs de ambas especies compartan vías regulatorias. En *S. mutans* la transcripción del operón *gtfBCD* que contiene los genes de las GTFs de la cepa está reprimido, en condiciones normales, por el sistema VicR/VicK (antes CovRK). Este sistema de dos componentes responde a condiciones ambientales extremas, incluyendo una alta temperatura ambiental (40 °C), un pH bajo (< 6.0) o una alta concentración de sales, de manera que el componente VicR se desfosforila y se desprende de la secuencias regulatorias de los genes que afecta, “des-reprimiendo” sus genes blanco (Biswas y Biswas, 2006; Mattos-Graner y Duncan, 2017; Senadheera *et al.*, 2005). Analizando los datos de expresión diferencial, se observa que *vicRK* mantiene su nivel de expresión en las condiciones ensayadas (LEUM\_1949, LOG<sub>2</sub> TC = -0.3; LEUM\_1950, LOG<sub>2</sub> TC = -1.0 respectivamente), por lo que no tendría efecto sobre la expresión de las GTFs. Sin embargo, en las regiones río arriba de las GTFs se realizó la búsqueda de la secuencia canónica de unión de VicR a ADN: TGTWAHNNNNNTGTWAH en *S. mutans* (Senadheera *et al.*, 2005) con FIMO (Grant *et al.*, 2011) encontrando posibles sitios de unión en los operones de las FS

(Tabla 10.18). Estos hallazgos sugieren que la regulación de las FS puede estar afectada por cambios drásticos de temperatura, condiciones que deben ser analizadas para entender el papel de las GTFs en la fisiología de la bacteria.

**Tabla 10.18. Sitios de unión a VicR en las regiones río arriba de las FS.**

| Secuencia Río-arriba de: | Hebra    | Localización río arriba del operón | <i>p</i> -value       | <i>q</i> -value | Secuencia hallada |
|--------------------------|----------|------------------------------------|-----------------------|-----------------|-------------------|
| <i>levC-scrB</i>         | negativa | 90                                 | 2.81x10 <sup>-5</sup> | 0.118           | tgttcctctctgtaa   |
| <i>levLX</i>             | positiva | 408                                | 8.97x10 <sup>-5</sup> | 0.138           | tgtaatactattgaaat |

Todos estos resultados, nos permiten tener un panorama sobre las vías de regulación que afectan a los genes de las GTFs de la bacteria. Por un lado, fue sorprendente hallar que los genes de las GTFs de la cepa responden de manera diferente al cambio de FC, dado que la represión que se observa en los genes de 5 de las GTFs tiene un efecto menor en *dsrD*. Además, los resultados sugieren que la regulación de estos genes podría ser particular para cada unidad de transcripción. Por último, los resultados también sugieren que la regulación de los genes de las GTFs podría ser particular para cada cepa. Serán necesarios otros análisis bioquímicos, e.g. ensayo de pull-down para identificar factores de transcripción que tienen efecto sobre las regiones reguladoras de los genes de las GTFs.

Los resultados que se han presentado dejan claro que aún hace falta mucha investigación para poder establecer la red regulatoria de los genes de las GTFs y poder comprender el verdadero rol biológico que tienen estas enzimas en las BAL.

#### 10.4.3. Validación de la transcriptómica por RT-qPCR

Para validar los resultados de la transcriptómica, se realizó un ensayo de RT-qPCR. El objetivo de este análisis fue comprobar que la tendencia en la expresión diferencial de los genes de las GTFs, fuera la misma que la obtenida con la RNA-Seq. Para este análisis se utilizaron células del final de la fase exponencial de los cultivos, como en el resto de los ensayos realizados. Se utilizó

el método de  $\Delta\Delta Ct$  para determinar la expresión diferencial. El gen *dnaX* se estableció como gen control (housekeeping) para normalizar los resultados de *Ct*.

Como se puede observar en la Tabla 10.19 en la columna RT-qPCR, existe una disminución en la expresión de las GTFs al usar xilosa, cuando se compara con fructosa (LOG<sub>2</sub>FC Xil/Fru). Este resultado es congruente con la misma comparación con los datos de la RNA-Seq, que se encuentran en la misma Tabla 10.19.

**Tabla 10.19. Comparación de los niveles de expresión de los genes de las GTFs de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 mediante RNA-seq y RT-qPCR**

| ID        | Gen         | RT-qPCR                     | RNA-Seq                     |
|-----------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|
|           |             | LOG <sub>2</sub> FC Xil/Fru | LOG <sub>2</sub> FC Xil/Fru |
| LEUM_1409 | <i>levC</i> | -3.73                       | -1.67                       |
| LEUM_1410 | <i>levX</i> | -4.03                       | -2.01                       |
| LEUM_1411 | <i>levL</i> | -3.53                       | -2.69                       |
| LEUM_0857 | <i>dsxD</i> | -6.83                       | -2.24                       |
| LEUM_1747 | <i>dsrD</i> | -1.61                       | -0.93                       |
| LEUM_1752 | <i>dsrI</i> | -4.71                       | -2.45                       |

Este resultado demuestra que los datos obtenidos de la RNA-Seq son confiables y representan lo que estaba sucediendo con los genes en el momento que se tomaron las muestras.

Por otro lado, este análisis podría permitir ampliar los hallazgos que se hicieron con la RNA-Seq, al permitir explorar el comportamiento de los genes de las GTFs en condiciones ambientales diversas como temperaturas y pH diferentes a los que ya se probaron, además de concentraciones diferentes de FC.

## 11. CONCLUSIONES

Se estudiaron diferentes cepas de *Leuconostoc* para este trabajo, todas provenientes de alimentos o bebidas fermentados de origen vegetal y todas producían al menos una enzima GTF.

Los análisis bioinformáticos de los genomas de estas cepas, permitieron encontrar una variedad de secuencias de GTFs. En el genoma de la cepa *L. citreum* CW28 se encontró la secuencia de una glucansacarasa desconocida, pero no se pudo demostrar su expresión en el cultivo de la cepa con sacarosa. En el caso de la cepa *L. mesenteroides* P45 se identificaron cuatro secuencias de posibles glucansacarosas, pero en los zimogramas de cultivos con sacarosa únicamente se observan dos. La cepa *L. mesenteroides* IBT-PQ no tiene su genoma secuenciado aún y en los zimogramas del cultivo de la bacteria con sacarosa, solo fue localizada una enzima, la DsrP ya caracterizada. La cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 posee seis secuencias de GTFs en su genoma, tres de glucansacarosas y tres de fructansacarosas y en los zimogramas de su cultivo en sacarosa se observaron cuatro bandas correspondientes a las 3 GS y a una o varias FS. Con base en estos resultados, se seleccionó a la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 para experimentar con las diferentes fuentes de carbono.

Los análisis de los cultivos con diferentes fuentes de carbono demostraron que al usar sacarosa como FC la cepa crece más rápido y las GTFs tienen más actividad que en cualquier otra FC probada, aunque no es indispensable para que exista actividad GTFs. Por lo tanto, la sacarosa es un inductor atípico de las GTFs en *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293.

Por otro lado, los zimogramas de esta parte del proyecto mostraron que al usar xilosa las bandas correspondientes a las GSs casi desaparecen. De esta manera, fue posible seleccionar las condiciones para el análisis transcriptómico: sacarosa y xilosa, pues al comparar sus cultivos se observaron los resultados más contrastantes. Además, se agregaron las condiciones de fructosa y celobiosa.

El análisis de expresión diferencial de los genes de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293 demostró que existe una represión en 5 de los 6 genes de GTFs en xilosa cuando se compara el nivel de

expresión con fructosa o sacarosa. Es posible que esta represión se relacione con el metabolismo de la xilosa, pues a diferencia de la sacarosa, usa la vía de la interconversión de las pentosas.

Debido a la poca información que existe sobre la regulación de la especie *Leuconostoc mesenteroides*, se usaron otras especies de Firmicutes productoras de GTFs como modelo de regulación para buscar tanto en el genoma de la cepa ATCC 8293, como en el análisis de expresión diferencial que se realizó.

Se descartó el efecto directo del factor de transcripción CcpA (control central del metabolismo de carbohidratos) sobre la expresión de las GTFs en la cepa ATCC 8293, pues no se encontraron motivos de unión de CcpA en las regiones reguladoras de los genes correspondientes.

Se descartó el efecto del factor de transcripción PerR (responde a la exposición a especies reactivas de oxígeno) sobre la expresión de las GTFs de la cepa ATCC 8293, pues al cultivar a la bacteria en condiciones anaeróbicas, no se observó diferencia en la actividad de las GTFs al comparar con cultivos en condiciones anaeróbicas.

Se identificaron elementos de regulación que podrían tener efecto sobre los operones que codifican para las levansacarinas de la cepa. VicK/VicR tendría efecto sobre los dos operones *levLX* y *levC-scrB*, mientras que LexA solo afectaría a *levLX*. Sin embargo, estos elementos de regulación solo responden cuando la cepa está expuesta a condiciones ambientales extremas, que no se probaron durante la realización de este proyecto. Por lo tanto, es necesario analizar el comportamiento de la cepa y sus GTFs en estas condiciones para verificar o refutar estos hallazgos.

Este trabajo ha permitido vislumbrar la compleja regulación de los genes de las GTFs en *L. mesenteroides* y ha quedado de manifiesto que aún hay mucha investigación que debe realizarse para poder comprender tanto las redes de regulación que operan en esta bacteria como la función biológica que tiene los HoPs para la bacteria.

## 12. PERSPECTIVAS

Es necesario complementar el análisis del metabolismo de la bacteria al usar sacarosa, fructosa y xilosa, determinado la producción de EPS, ácidos orgánicos y manitol, además del consumo de las fuentes de carbono. Esto permitirá hacer una mejor interpretación de los resultados del análisis transcriptómico.

Por otro lado, realizar un análisis más profundo del genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 permitirá desvelar información sobre elementos de regulación de la bacteria, necesarios para comprender los mecanismos y las redes de regulación de la bacteria.

Es indispensable someter a la bacteria a condiciones ambientales que pudieran resultarle estresantes, como bajo pH y temperaturas, diferentes a las usadas en este proyecto, para comprobar los hallazgos sobre posibles elementos de regulación sobre los genes de las GTFs. acompañadas de qPCR de genes específicos, podrían darnos más información sobre la regulación.

Por otro lado, también podrían realizarse ensayos “pull-down” con las FC que ya se probaron, es decir, xilosa, fructosa y sacarosa, con el objetivo de determinar si existen proteínas que se unan a la región reguladora de los genes de las GTFs. El siguiente paso consistiría en purificar estas proteínas e identificarlas por medio de proteómica. Este ensayo permitiría identificar nuevos factores de transcripción.

### 13. PRODUCTOS

- De los resultados del análisis de expresión diferencial y la búsqueda de elementos regulatorios, se publicó el artículo “Glycosyltransferases Expression Changes in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 Grown on Different Carbon Sources” en la revista *Foods*, editorial MDPI
  - > Vallejo-García, L. C., Porras-Domínguez, J. R., y López Munguía, A. (2023). *Chapter 9 - Traditional Fermented Foods: Introducing the “Fructan Link”* (W. Van den Ende y E. T. B. T.-T. B. of F. Öner (eds.); pp. 147–166). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85410-8.00002-8>
- Derivado de los resultados sobre el uso de diferentes fuentes de carbono de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293, se presentó el trabajo: “Expresión de las Glicosiltransferasas de *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 En Condiciones De Anoxia”, mediante un poster en el “XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería”, 2021.
- Derivado de los resultados sobre la exposición a especies reactivas de oxígeno de la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8293, se presentó el trabajo: “Expresión de las Glicosiltransferasas de *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 En Condiciones De Anoxia”, mediante un poster en el “XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería”, 2021.
- Se publicó un capítulo en el libro “The Book of Fructans” del 2023
  - > Vallejo-García, L. C., Porras-Domínguez, J. R., y López Munguía, A. (2023). *Chapter 9 - Traditional Fermented Foods: Introducing the “Fructan Link”* (W. Van den Ende y E. T. B. T.-T. B. of F. Öner (eds.); pp. 147–166). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85410-8.00002-8>

## 14. BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anwar, M. A., Kralj, S., Van Der Maarel, M. J. E. C., y Dijkhuizen, L. (2008). The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3426–3433. <https://doi.org/10.1128/AEM.00377-08>
- Argüello-Morales, M. A., Remaud-Simeon, M., Pizzut, S., Sarçabal, P., Willemot, R.-M., y Monsan, P. (2000). Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *FEMS Microbiology Letters*, 182(1), 81–85. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00572-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00572-8)
- Arndt, C., Korista, S., Feldmann, A., y Bachmann, M. (2019). Native polyacrylamide gels. In B. T. Kurien y R. H. Scofield (Eds.), *Electrophoretic Separation of Proteins Methods and Protocols* (Vol. 1, pp. 87–91). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_8)
- Ávila-Fernández, Cuevas-Juárez, E., Rodríguez-Alegría, M. E., Olvera, C., y López-Munguía, A. (2016). Functional characterization of a novel  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 on structurally diverse fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 263–276. <https://doi.org/10.1111/jam.13154>
- Besrouer-Aouam, N., Mohedano, M. L., Fhoula, I., Zarour, K., Najjari, A., Aznar, R., Prieto, A., Ouzari, H.-I. I., y López, P. (2019). Different modes of regulation of the expression of dextransucrase in *Leuconostoc lactis* AV1n and *Lactobacillus sakei* MN. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00959>
- Biswas, S., y Biswas, I. (2006). Regulation of the glucosyltransferase (*gtfBC*) operon by CovR in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 188(3), 988–998. <https://doi.org/10.1128/JB.188.3.988-998.2006>

- Bivolarski, V., Vasileva, T., Dzhambazov, B., Momchilova, A., Chobert, J. M., Ivanova, I., y Iliev, I. (2013). Characterization of glucansucrases and fructansucrases produced by wild strains *Leuconostoc mesenteroides* URE13 and *Leuconostoc mesenteroides* LM17 grown on glucose or fructose medium as a sole carbon source. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(3), 3811–3820. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2013.0017>
- Björkroth, J., Dicks, L. M. T., Endo, A., y H.Holzzapfel, W. (2014). The genus *Leuconostoc*. In W. H. Holzzapfel y B. J. B. Wood (Eds.), *Lactic Acid Bacteria* (First, pp. 391–404). John Wiley y Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch23>
- Brisson, Y., Pijning, T., Malbert, Y., Fabre, É., Mourey, L., Morel, S., Potocki-Véronèse, G., Monsan, P., Tranier, S., Remaud-Siméon, M., y Dijkstra, B. W. (2012). Functional and structural characterization of  $\alpha$ -(1→2) branching sucrose derived from DSR-E glucansucrase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 7915–7924. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.305078>
- Butala, M., Žgur-Bertok, D., y Busby, S. J. W. (2009). The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(1), 82–93. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8378-6>
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M., y Spano, G. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 3877–3886. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7471-2>
- Cantarel, B. I., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., y Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), 233–238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
- Caplice, E., y Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1–2), 131–149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3)

- Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J., y McQuillan, J. A. (2012). Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*, 28(4), 464–469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>
- Chellapandian, M., Larios, C., Sanchez-Gonzalez, M., y López-Munguía, A. (1998). Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from “pulque”, a traditional Aztec alcoholic beverage. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*, 21, 51–16. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900560>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., y Gu, J. (2018). Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Chen, X. Y., Levy, C., y Gänzle, M. G. (2016). Structure-function relationships of bacterial and enzymatically produced reuterans and dextran in sourdough bread baking application. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.010>
- Chun, B. H., Kim, K. H., Jeon, H. H., Lee, S. H., y Jeon, C. O. (2017). Pan-genomic and transcriptomic analyses of *Leuconostoc mesenteroides* provide insights into its genomic and metabolic features and roles in kimchi fermentation. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12016-z>
- Claverie, M., Cioci, G., Vuillemin, M., Bondy, P., Remaud-Simeon, M., y Moulis, C. (2020). Processivity of dextransucrases synthesizing very-highmolar-mass dextran is mediated by sugar-binding pockets in domain v. *Journal of Biological Chemistry*, 295(17), 5602–5613. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011995>
- Claverie, M., Cioci, G., Vuillemin, M., Monties, N., Roblin, P., Lippens, G., Remaud-Simeon, M., y Moulis, C. (2017). Investigations on the determinants responsible for low molar mass dextran formation by DSR-M dextransucrase. *ACS Catalysis*, 7(10), 7106–7119. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b02182>

- Côté, G. L., y Robyt, J. F. (1982). Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating (1→6), (1→3)- $\alpha$ -d-glucan. *Carbohydrate Research*, 101(1), 57–74. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80795-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80795-8)
- Côté, G. L., y Skory, C. D. (2012). Cloning, expression, and characterization of an insoluble glucan-producing glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1118. 2387–2394. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3562-2>
- Crow, W. B. (1922). The structure and affinities of *Leuconostoc mesenteroides* (Cienkowsky) van Tieghem. *Transactions of the British Mycological Society*, 8(1–2), 76–84. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(22\)80010-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(22)80010-3)
- De Bellis, P., Ferrara, M., Bavaro, A. R., Linsalata, V., Di Biase, M., Musio, B., Gallo, V., Mulè, G., y Valerio, F. (2022). Characterization of dextran produced by the food-related strain *Weissella cibaria* C43-11 and of the relevant dextransucrase gene. *Foods*, 11(18). <https://doi.org/10.3390/foods11182819>
- De Vuyst, L., y De Vin, F. (2007). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria. In *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology* (Vols. 2–4, pp. 477–519). <https://doi.org/10.1016/B978-044451967-2/00129-X>
- Dols, M., Chraïbi, W., Remaud-Simeon, M., Lindley, N. D., y Monsan, P. F. (1997). Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2159–2165. . <https://doi.org/10.1128/AEM.00473-18>. Editor
- Dror, B., Savidor, A., Salam, B., Sela, N., Lampert, Y., Teper-Bamnolker, P., y Daus, A. (2019). High levels of CO<sub>2</sub> induce spoilage by *Leuconostoc mesenteroides* by upregulating dextran synthesis genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1), 1–13.

- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., y Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>
- Escalante, A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., y López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>
- Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(Suppl. 2), S287–S291. <https://doi.org/10.1079/BJNBJN/2002550>
- Galle, S., y Arendt, E. K. (2014). Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 891–901. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.617474>
- Gangoiti, J., Van Leeuwen, S. S., Vafiadi, C., y Dijkhuizen, L. (2016). The Gram-negative bacterium *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 employs a new glycoside hydrolase family 70 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase enzyme (GtfD) to synthesize a reuteran like polymer from maltodextrins and starch. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860(6), 1224–1236. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.02.005>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., y Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571–608). <https://doi.org/10.1385/1592598900>
- Giles-Gómez, M., Sandoval García, J. G., Matus, V., Campos Quintana, I., Bolívar, F., y Escalante, A. (2016). In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*, 5(1), 708. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2370-7>

- Giraffa, G. (2014). Overview of the ecology and biodiversity of the LAB. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 45–54. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch4>
- Grant, C. E., Bailey, T. L., y Noble, W. S. (2011). FIMO: Scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics*, 27(7), 1017–1018. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr064>
- Grönwall, A., y Ingelman, B. (1945). Dextran as a substitute for plasma. *Nature*, 155(3924), 45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(45\)90627-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(45)90627-1)
- Hamada, S., y Slade, H. D. (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, 44(2), 331–384. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6446023>
- Hehre, E. J., y Sugg, J. Y. (1941). Serologically reactive polysaccharides produced through the action of bacterial enzymes: I. Dextran of *Leuconostoc mesenteroides* from sucrose. *Journal of Experimental Medicine*, 75(3), 339–353. <https://doi.org/10.1084/jem.75.3.339>
- Hemme, D., y Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467–494. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.005>
- Hudson, M. C., y Curtiss, R. (1990). Regulation of expression of *Streptococcus mutans* genes important to virulence. *Infection and Immunity*, 58(2), 464–470.
- Imlay, J. A. (2015). Transcription factors that defend bacteria against reactive oxygen species. *Annual Review of Microbiology*, 69(1), 93–108. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104322>
- Ito, K., Ito, S., Shimamura, T., Weyand, S., Kawarasaki, Y., Misaka, T., Abe, K., Kobayashi, T., Cameron, A. D., y Iwata, S. (2011). Crystal structure of glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*. *Journal of Molecular Biology*, 408(2), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.028>

- Jung, J. Y., Lee, S. H., Kim, J. M., Park, M. S., Bae, J. W., Hahn, Y., Madsen, E. L., y Jeon, C. O. (2011). Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2264–2274. <https://doi.org/10.1128/AEM.02157-10>
- Kumar, A. S., Mody, K., y Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides - A perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47(2), 103–117. <https://doi.org/10.1002/jobm.200610203>
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabijns, A., y Van Den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: Functional implications. *Journal of Experimental Botany*, 60(3), 727–740. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern333>
- LeBrun, E., y van Rapenbusch, R. (1980). The structure of *Bacillus subtilis* levansucrase at 3.8 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(24), 12034–12036. <http://www.jbc.org/cgi/content/short/255/24/12034>
- Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W., y Dijkhuizen, L. (2013). Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism,  $\alpha$ -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 250–272. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.037>
- Li, W., O'Neill, K. R., Haft, D. H., Dicuccio, M., Chetvernin, V., Badretdin, A., Coulouris, G., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Durkin, A. S., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Lanczycki, C. J., Song, J. S., Thanki, N., Wang, J., Yamashita, R. A., Yang, M., Zheng, C., ... Thibaud-Nissen, F. (2021). RefSeq: Expanding the prokaryotic genome annotation pipeline reach with protein family model curation. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1020–D1028. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1105>
- Li, Y., y Burne, R. A. (2001). Regulation of the *gtfBC* and *ftf* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Microbiology*, 147(10), 2841–2848. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2841>

- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lynch, K. M., Coffey, A., y Arendt, E. K. (2017). Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. *Food Research International*, 110. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.012>
- MacGregor, E. A., Jespersen, H. M., y Svensson, B. (1996). A circularly permuted  $\alpha$ -amylase-type  $\alpha/\beta$ -barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Letters*, 378(3), 263–266. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01428-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01428-4)
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., ... Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15611–15616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., y Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>
- Martínez-Álvarez, O., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., y Montero, P. (2017). Fermented Seafood Products and Health. In J. Frias, C. Martinez-Villaluenga, y E. Peñas (Eds.), *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (pp. 177–202). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00009-1>
- Mattos-Graner, R. O., y Duncan, M. J. (2017). Two-component signal transduction systems in oral bacteria. *Journal of Oral Microbiology*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1400858>

- Molina, M., Moulis, C., Monties, N., Guieysse, D., Morel, S., Cioci, G., y Remaud-Siméon, M. (2020). A specific oligosaccharide-binding site in the alternansucrase catalytic domain mediates alternan elongation. *Journal of Biological Chemistry*, 295(28), 9474–9489. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra120.013028>
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.-M., y Remaud-Simeón, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 675–685. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00113-3)
- Morales-Arrieta, S., Rodríguez, M. E., Segovia, L., López-Munguía, A., y Olvera-Carranza, C. (2006). Identification and functional characterization of *levS*, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene*, 376(1–2), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.02.007>
- Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., y Vandamme, E. J. (2005). *Leuconostoc* dextranase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(8), 845–860. <https://doi.org/10.1002/jctb.1322>
- Novichkov, P. S., Kazakov, A. E., Ravcheev, D. A., Leyn, S. A., Kovaleva, G. Y., Sutormin, R. A., Kazanov, M. D., Riehl, W., Arkin, A. P., Dubchak, I., y Rodionov, D. A. (2013). RegPrecise 3.0 - A resource for genome-scale exploration of transcriptional regulation in bacteria. *BMC Genomics*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-745>
- Ogier, J. C., Casalta, E., Farrokh, C., y Saïhi, A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 286–290. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.012>
- Olivares-Illana, V., López-Munguía, A., y Olvera, C. (2003). Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: A fructosyltransferase within a glucosyltransferase. *Journal of Bacteriology*, 185(12), 3606–3612. <https://doi.org/10.1128/JB.185.12.3606-3612.2003>

- Olivares-Illana, V., Wachter-Odarte, C., Le Borgne, S., y López-Munguía, A. (2002). Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: a *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*, 28(2), 112–117. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000224>
- Olvera, C., Centeno-Leija, S., y López-Munguía, A. (2006). Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 92(1), 11–20. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9128-0>
- Olvera, C., Santamaría, R. I., Bustos, P., Vallejo, C., Montor, J. J., Wachter, C., y Munguía, L. (2017). Draft genome sequence of *Leuconostoc citreum* CW28 isolated from pozol, a prehispanic fermented corn beverage. *Genome Announcements*, 5(48), 17–18. <https://doi.org/https://10.1128/genomeA.01283-17>
- Ortiz-Soto, M. E., Olivares-Illana, V., y Lopez-Munguía, A. (2004). Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22(4), 275–281. <https://doi.org/10.1080/10242420400014251>
- Otero B., A. (2009). Estudio de la expresión de las Glicosiltransferasas en *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. [Tesis de Maestría, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México] Biblioteca UNAM.
- Papadopoulos, J. S., y Agarwala, R. (2007). COBALT: Constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics*, 23(9), 1073–1079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm076>
- Park, J., Kim, J., Jeong, S., Chun, J., Lee, J., y Kim, J. H. (2005). Characterization of the catabolite control protein (*ccpA*) gene from *Leuconostoc mesenteroides* SY1. 15, 749–755.

- Passerini, D., Vuillemin, M., Ufarté, L., Morel, S., Loux, V., Fontagné-Faucher, C., Monsan, P., Remaud-Siméon, M., y Moulis, C. (2015). Inventory of the GH70 enzymes encoded by *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 - Identification of three novel  $\alpha$ -transglucosylases. *FEBS Journal*, 282(11), 2115–2130. <https://doi.org/10.1111/febs.13261>
- Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., y Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, 14(4), 417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>
- Peshev, D., y Van den Ende, W. (2014). Fructans: prebiotics and immunomodulators. *Journal of Functional Foods*, 8(1), 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.005>
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., y Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8, 785. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Pijning, T., Anwar, M. a, Böger, M., Dobruchowska, J. M., Leemhuis, H., Kralj, S., Dijkhuizen, L., y Dijkstra, B. W. (2011). Crystal structure of inulosucrase from *Lactobacillus*: insights into the substrate specificity and product specificity of GH68 fructansucrases. *Journal of Molecular Biology*, 412(1), 80–93. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.031>
- Pijning, T., Vujičić-Žagar, A., Kralj, S., Dijkhuizen, L., y Dijkstra, B. W. (2012). Structure of the  $\alpha$ -1,6/ $\alpha$ -1,4-specific glucansucrase GTFA from *Lactobacillus reuteri* 121. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 68(12), 1448–1454. <https://doi.org/10.1107/S1744309112044168>
- Plengvidhya, V., Breidt, F., Lu, Z., y Fleming, H. P. (2007). DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), 7697–7702. <https://doi.org/10.1128/AEM.01342-07>

- Quirasco, M., López-Munguía, A., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., y Farrés, A. (1999). Induction and transcription studies of the dextransucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5504–5509.
- Rabelo, M. C., Fontes, C. M. L., y Rodrigues, S. (2011). Stability study of crude dextransucrase from *Leuconostoc citreum* NRRL B-742. *Indian Journal of Microbiology*, 51(2), 164–170. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0114-5>
- Ravcheev, D. A., Khoroshkin, M. S., Laikova, O. N., Tsoy, O. V., Sernova, N. V., Petrova, S. A., Rakhmaninova, A. B., Novichkov, P. S., Gelfand, M. S., y Rodionov, D. A. (2014). Comparative genomics and evolution of regulons of the LacI-family transcription factors. *Frontiers in Microbiology*, 5(JUN), 1–1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00294>
- Riveros-Mckay, F., Campos, I., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., y Escalante, A. (2014). Draft Genome Sequence of *Leuconostoc mesenteroides* P45 Isolated from Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage. *Genome Announcements*, 2(6), 730–731. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01130-14>
- Sauer, M., Russmayer, H., Grabherr, R., Peterbauer, C. K., y Marx, H. (2017). The efficient clade: lactic acid bacteria for industrial chemical production: review. *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.05.002>
- Senadheera, M. D., Guggenheim, B., Spatafora, G. A., Huang, Y. C. C., Choi, J., Hung, D. C. I., Treglown, J. S., Goodman, S. D., Ellen, R. P., y Cvitkovitch, D. G. (2005). A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *ftf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *Journal of Bacteriology*, 187(12), 4064–4076. <https://doi.org/10.1128/JB.187.12.4064-4076.2005>
- Shin, S.-Y., y Han, N. . (2015). *Leuconostoc* spp. as starters and their beneficial role in fermented foods. In M. T. Liong (Ed.), *Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals* (Vol. 27, pp. 111–132). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23177-8>

- Smith, M. R., y Zahnley, J. C. (1999). Production of glucosyltransferases by wild-type *Leuconostoc mesenteroides* in media containing sugars other than sucrose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22(3), 139–146. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900621>
- Solovyev, V., y Salamov, A. (2010). Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In R. W. Li (Ed.), *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies* (pp. 61–78). Nova Science Publishers Inc. [https://doi.org/10.1142/9789812814777\\_0009](https://doi.org/10.1142/9789812814777_0009)
- Song, K.-B., Joo, H.-K., y Rhee, S.-K. (1993). Nucleotide sequence of levansucrase gene (*levU*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1173(3), 320–324. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781\(93\)90130-6](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0167-4781(93)90130-6)
- Soomro, A. H., Masud, T., y Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health – A review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1), 20–24. <https://doi.org/10.3923/pjn.2002.20.24>
- Soumya, M. P., y Nampoothiri, K. M. (2021). An overview of functional genomics and relevance of glycosyltransferases in exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 184(January), 1014–1025. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.131>
- Sousa, F. J. R., Lima, L. M. T. R., Pacheco, A. B. F., Oliveira, C. L. P., Torriani, I., Almeida, D. F., Foguel, D., Silva, J. L., y Mohana-Borges, R. (2006). Tetramerization of the LexA repressor in solution: implications for gene regulation of the *E. coli* SOS system at acidic pH. *Journal of Molecular Biology*, 359(4), 1059–1074. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.069>
- Steinkraus, H. K. (2002). Fermentations in world food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1(1), 23–32. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00004.x>

- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70(2–4), 331–345. <https://doi.org/10.1007/BF00395940>
- Taboada, B., Estrada, K., Ciria, R., y Merino, E. (2018). Operon-mapper: A web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes. *Bioinformatics*, 34(23), 4118–4120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty496>
- Tamang, J. P., Watanabe, K., y Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Thierry, A., Pogacic, T., Weber, M., y Lortal, S. (2015). Production of flavor compounds by lactic acid bacteria in fermented foods. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications: Second Edition* (pp. 314–340). <https://doi.org/10.1002/9781118868386.ch19>
- Tian, W., y Skolnick, J. (2003). How well is enzyme function conserved as a function of pairwise sequence identity? *Journal of Molecular Biology*, 333(4), 863–882. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.08.057>
- Tsuchiya, H. M., Koepsell, H. J., Corman, J., Bryant, G., Bogard, M. O., Feger, V. H., y Jackson, R. W. (1952). The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bacteriology*, 64(4), 521–526. <https://doi.org/10.1128/jb.64.4.521-526.1952>
- Vallejo-García, L. C. (2017). Producción de Fructooligosacáridos a partir de sacarosa mediante métodos enzimáticos novedosos. [Tesis de Maestría, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México] Biblioteca UNAM.
- Vallejo-García, L. C., Porras-Domínguez, J. R., y López Munguía, A. (2023). Chapter 9 - *Traditional fermented foods: Introducing the “Fructan Link”* (W. Van den Ende y E. T. B. T.-T. B. of F. Öner (eds.); pp. 147–166). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85410-8.00002-8>

- van Hijum, S. A., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., y van Geel-schutten, I. G. H. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 157–176. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.157>
- van Thieghem, P. (1878). Sur la gomme de sucrerie. *Annales de Sciences Naturelles, Botanique*, 7, 180–203.
- Velázquez-Hernández, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M. P., y Valdez-Alarcón, J. J. (2009). Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 1763–1778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04120.x>
- Versluys, M., Kirtel, O., Toksoy-Öner, E., y Van den Ende, W. (2018). The fructan syndrome: Evolutionary aspects and common themes among plants and microbes. *Plant Cell and Environment*, 41(1), 16–38. <https://doi.org/10.1111/pce.13070>
- Vujičić-Žagar, A., Pijning, T., Kralj, S., López, C. A., Eeuwema, W., Dijkhuizen, L., y Dijkstra, B. W. (2010). Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21406–21411. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007531107>
- Warner, J. B., y Lolkema, J. S. (2003). CcpA-Dependent Carbon Catabolite Repression in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 475–490. <https://doi.org/10.1128/membr.67.4.475-490.2003>
- Waters, D. M., Mauch, A., Coffey, A., Arendt, E. K., y Zannini, E. (2015). Lactic acid bacteria as a cell factory for the delivery of functional biomolecules and ingredients in cereal-based beverages: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4), 503–520. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.660251>

- Welman, A. D., y Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269–274. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00107-0)
- Wu, C., Huang, J., y Zhou, R. (2017). Genomics of lactic acid bacteria: Current status and potential applications. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(4), 393–404. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1179623>
- Yan, M., Han, J., Xu, X., Liu, L., Gao, C., Zheng, H., Chen, Y., Tao, Y., Zhou, H., Li, Y., y Wu, Z. (2016). Gsy, a novel glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*, mediates the formation of cell aggregates in response to oxidative stress. *Scientific Reports*, 6(November 2015), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep38122>
- Yang, W., Sheng, L., Chen, S., Wang, L., Su, L., y Wu, J. (2022). Characterization of a new 4,6- $\alpha$ -glucanotransferase from *Limosilactobacillus fermentum* NCC 3057 with ability of synthesizing low molecular mass isomalto-/maltopolysaccharide. *Food Bioscience*, 46(August 2021).
- Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., y Arendt, E. K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>
- Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M. F., Øregaard, G., y Neves, A. R. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp\_1), S168–S200. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux017>
- Zeng, L., Choi, S. C., Danko, C. G., Siepel, A., Stanhope, M. J., y Burne, R. A. (2013). Gene Regulation by CcpA and catabolite repression explored by RNA-Seq in *Streptococcus mutans*. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060465>
- Zhou, Q., Zang, S., Zhao, Z., y Li, X. (2018). Dynamic changes of bacterial communities and nitrite character during northeastern Chinese sauerkraut fermentation. *Food Science and Biotechnology*, 27(1), 79–85. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0279-8>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

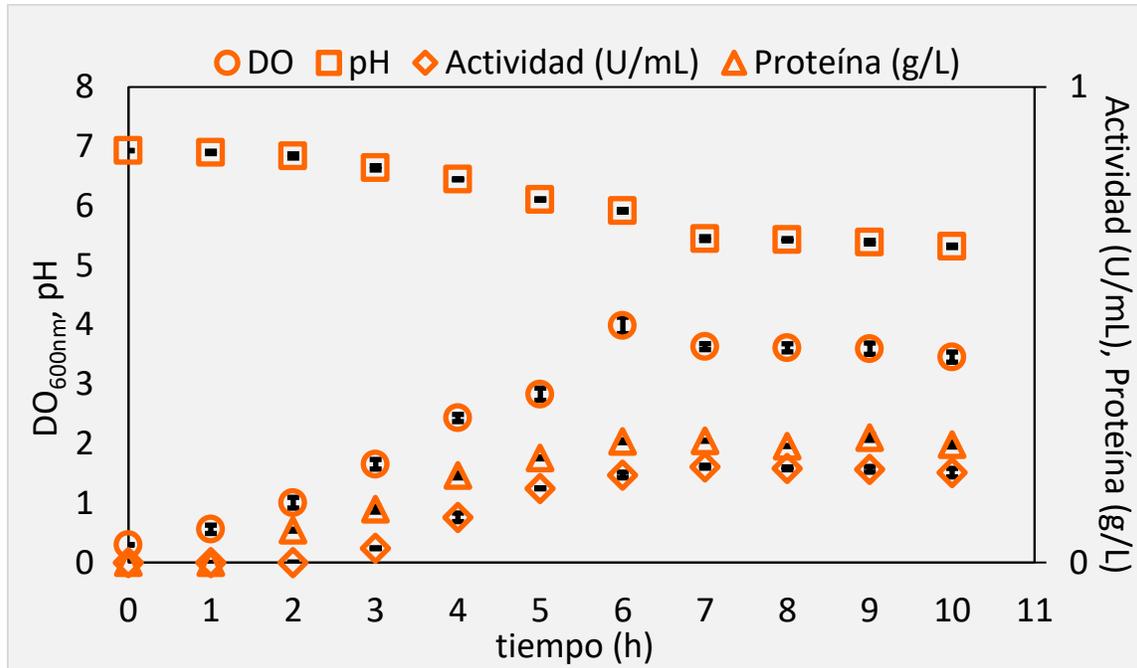


Figura S1. Comportamiento de la cepa ATCC 8293 al usar fructosa como fuente de carbono.

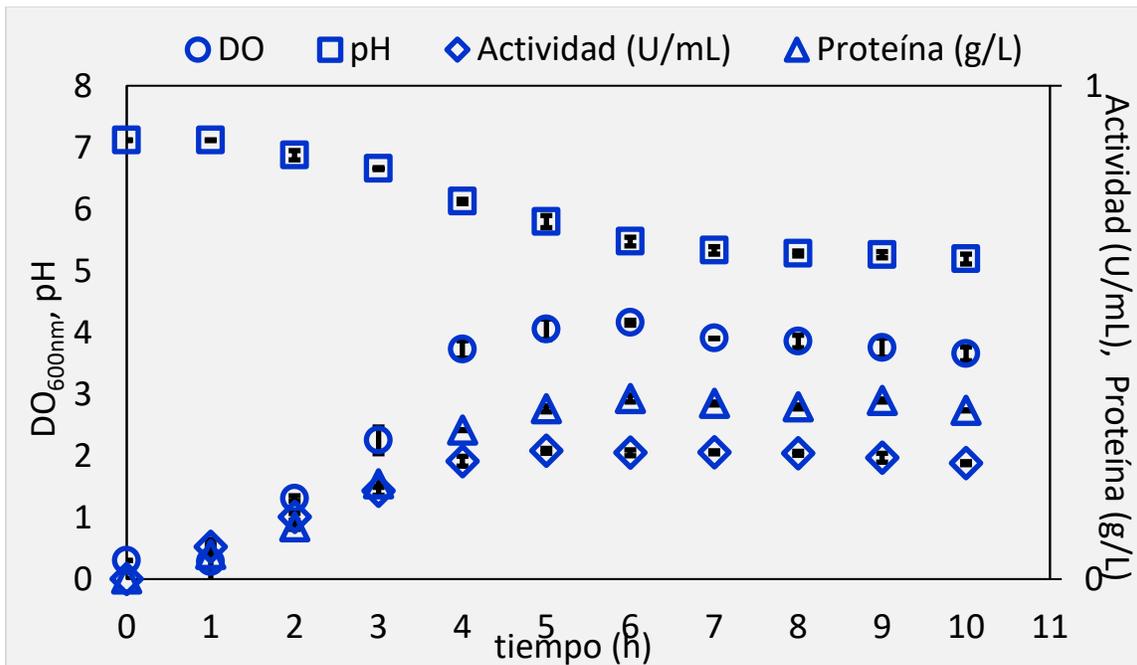


Figura S2. Comportamiento de la cepa ATCC 8293 al usar glucosa como fuente de carbono.

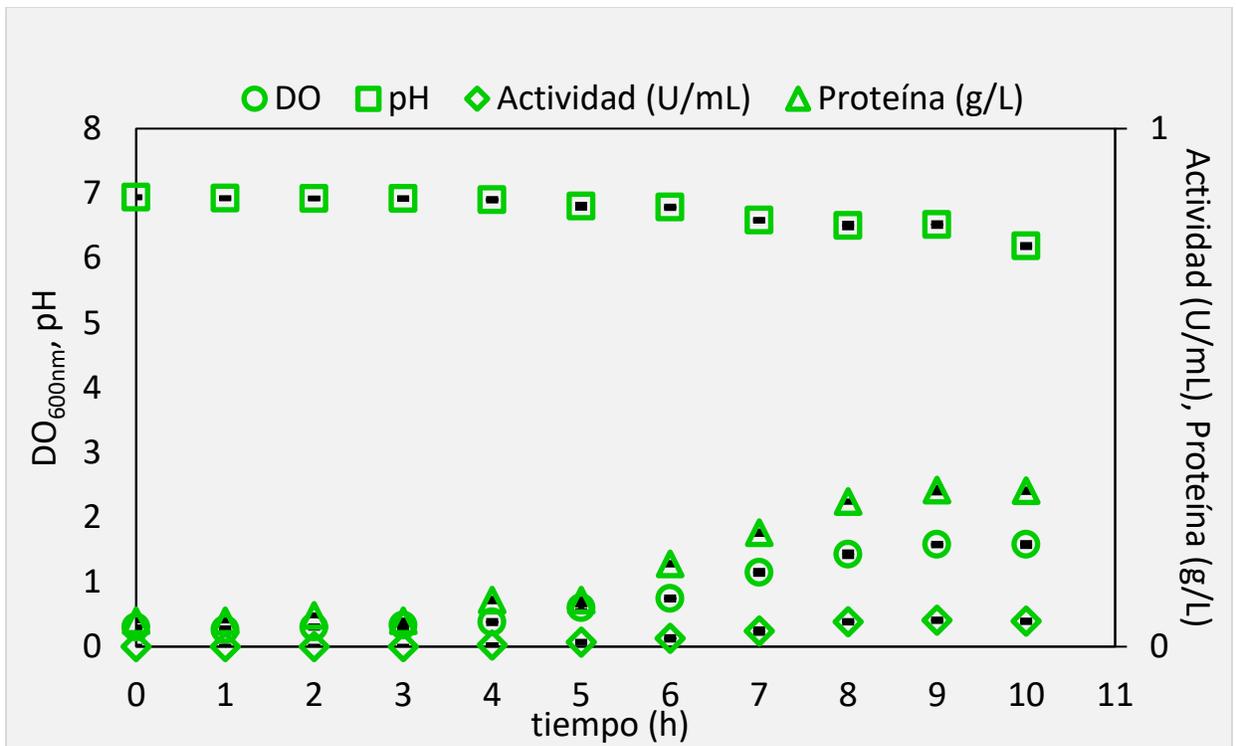


Figura S3. Comportamiento de la cepa ATCC 8293 al usar xilosa como fuente de carbono.

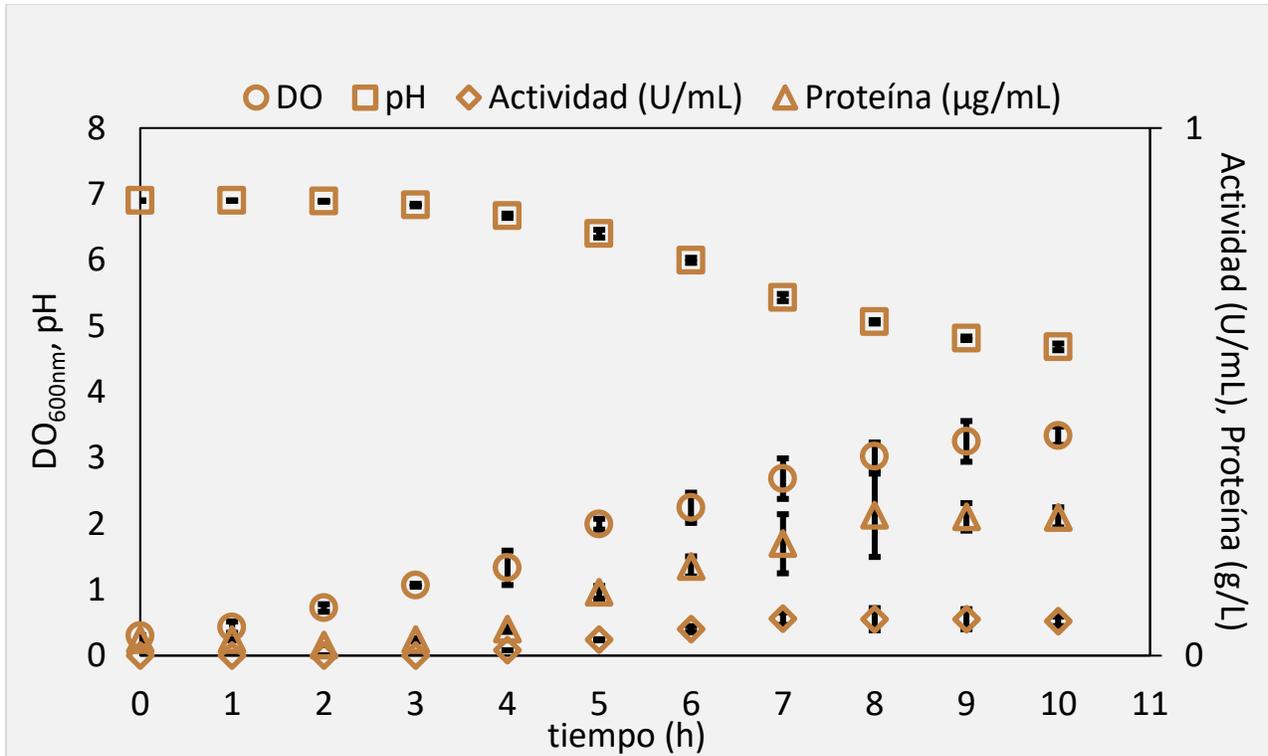


Figura S4. Comportamiento de la cepa ATCC 8293 al usar galactosa como fuente de carbono.

Para las siguientes fuentes de carbono, no fue posible medir la actividad y la proteína para cada muestra, debido a la pandemia. Sin embargo, estos parámetros se determinaron para el final de la fase exponencial/principio de la fase estacionaria.

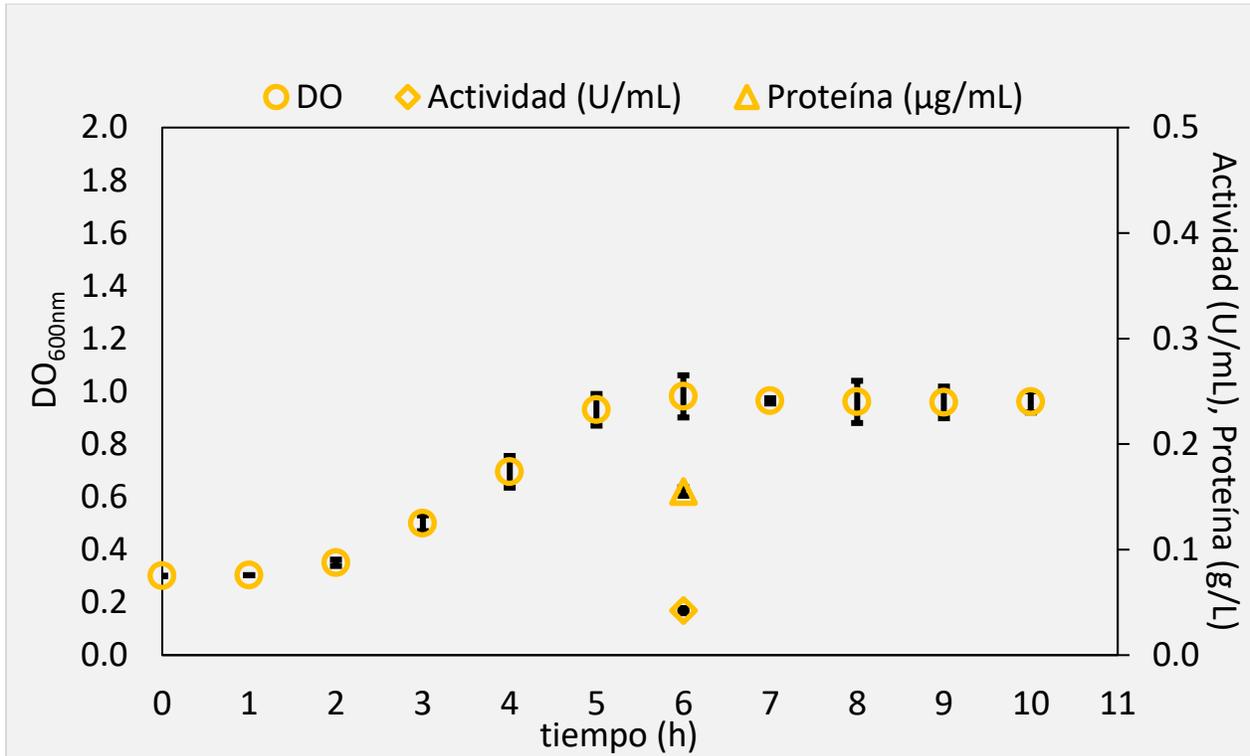


Figura S5. Comportamiento de la cepa ATCC 8293 al usar ácido ascórbico como fuente de carbono. El pH final fue de 6.45 (no aparece en la gráfica)

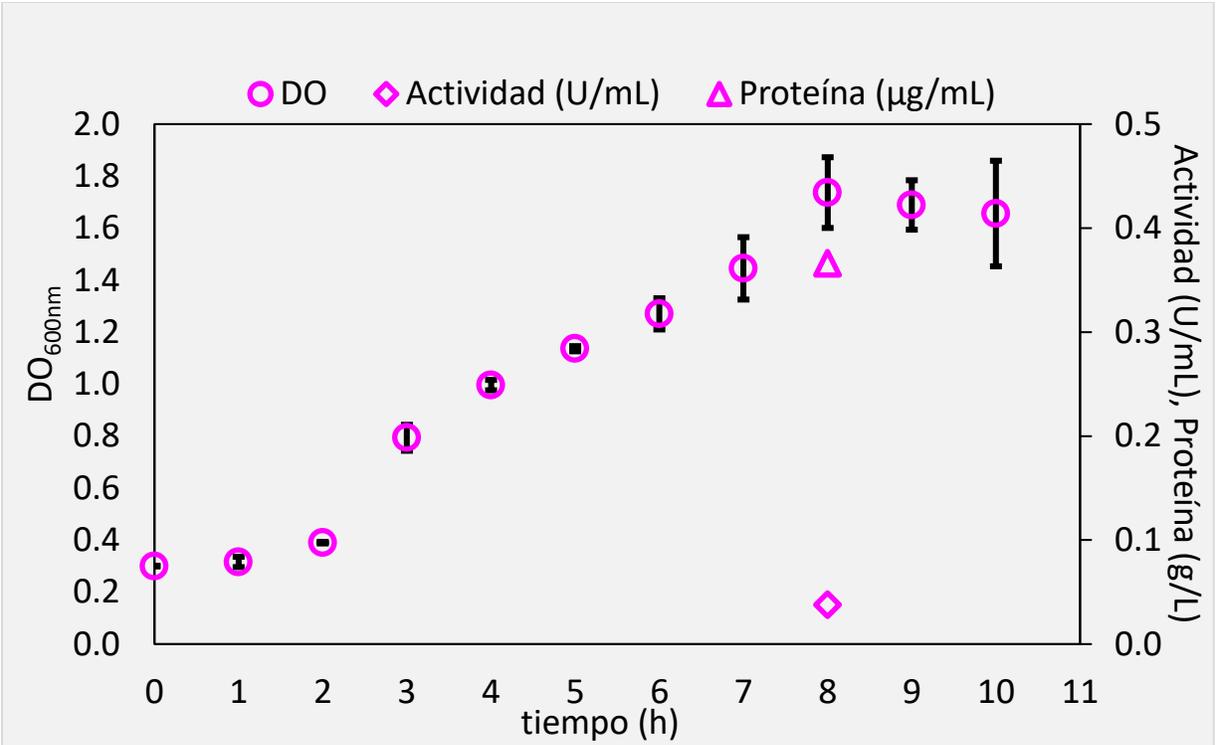


Figura S6. Comportamiento de la cepa ATCC 8293 al usar manosa como fuente de carbono. El pH final fue de 6.05 (no aparece en la gráfica)

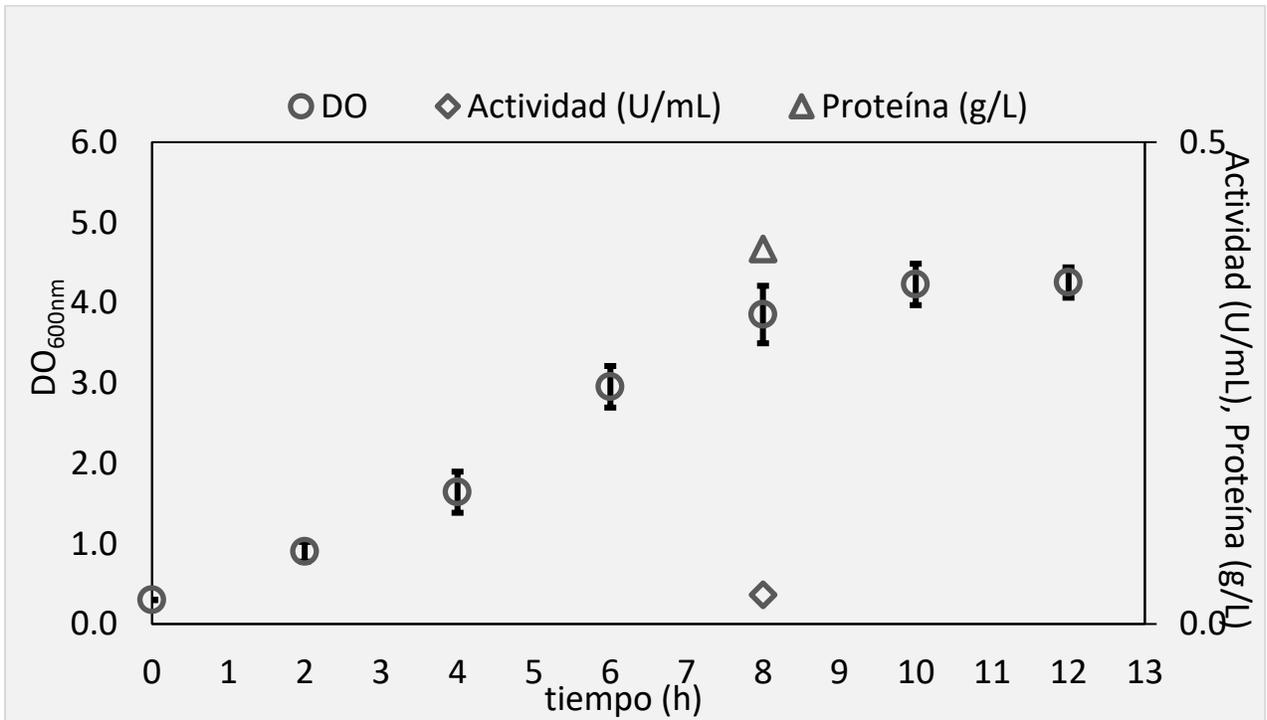


Figura S7. Comportamiento de la cepa ATCC 8293 al usar celobiosa como fuente de carbono. El pH final fue de 4.17 (no aparece en la gráfica)