

SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE LA INULOSACARASA DE *L. citreum*, PARA LA PRODUCCIÓN DE FRUCTOLIGOSACÁRIDOS.

Ma. Elena Rodríguez-A, Andrés Enziso-R, Ma. Elena Ortiz-S, Clarita Olvera y Agustín López-M,A . Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa,Cuernavaca Mor. CP 62210, Tel.(777)3291609 fax, (777)3114903. maelena@ibt.unam.mx

Palabras clave: *inulosacarasa, fructooligosacáridos, mutación sitio-dirigida*

Introducción. La inulosacarasa (IsIA) de *L. citreum*, sintetiza inulina de alto peso molecular a partir de sacarosa. IsIA es una fructosiltransferasa (FTF) que a diferencia de la mayoría de las FTFs reportadas, está compuesta por 3 dominios (1). Para conocer el papel que juegan estos dominios se construyeron 4 versiones truncadas de IsIA (2). Una de ellas, la IsIA4 que consiste básicamente del dominio catalítico, además de producir inulina, sintetizó fructooligosacáridos (FOS). Considerando que IsIA presenta un 32% de identidad con SacB a nivel de aminoácidos en el dominio catalítico, con el objetivo de obtener enzimas con una mayor capacidad de sintetizar FOS se diseñaron mutantes puntuales de la versión IsIA4, basados en resultados obtenidos en mutaciones análogas en la levansacarasa (SacB) de *B. subtilis* (3). Se obtuvieron 10 mutantes, de las cuales 3 presentaron una mejor afinidad hacia la síntesis de FOS. El objetivo de este trabajo fue caracterizar dichas mutantes para seleccionar la idónea para llevar a cabo la producción de FOS a partir de sacarosa.

Metodología. Se llevó a cabo la caracterización cinética, bioquímica así como la estabilidad a la temperatura de las enzimas, empleando sacarosa como sustrato, midiendo azúcares reductores liberados por DNS. La capacidad para producir FOS, inulina, glucosa y fructosa se evaluó por HPLC.

Resultados y discusión. Las tres mutantes productoras de FOS, fueron la L310F, R407K y la S236A. Los valores de pH y temperatura óptimos 6 y 30-35 °C respectivamente fueron los mismos que para IsIA4. La estabilidad térmica fue ligeramente mayor en las mutantes S236A ($t_{1/2}$ 3.3h) y R407K ($t_{1/2}$ 3.5h) comparada con la IsIA-E4 ($t_{1/2}$ 2.2h), la L310F resultó ser muy inestable. En todos los casos la actividad de las mutantes disminuyó drásticamente de k_{cat} 70 s^{-1} en IsIA4, a k_{cat} 27 s^{-1} en R429K, y a k_{cat} 2.3 s^{-1} en S236A. En cuanto a la síntesis de FOS, como se muestra en la tabla 1, todas las mutantes sintetizan más FOS que la silvestre y disminuyen la síntesis de inulina, las mutantes R429K y S236A no producen polímero. Dado que la mutante S236A fue la mejor productora de FOS, el estudio se enfocó en esta mutante con miras a diseñar un biocatalizador para la producción de FOS. Las FTSs catalizan la transferencia del grupo fructosilo de la sacarosa a un polímero en crecimiento (reacción de transferencia, T) o al agua (reacción de hidrólisis, H). La

relación H/T de IsIA4 fue 70/30 y para S236A 50/50. Se determinaron las velocidades iniciales de hidrólisis y transferencia a diferentes concentraciones de sacarosa. En la fig. 1 se observa que la reacción de hidrólisis y transferencia tienen comportamientos tipo Michaelis-Menten y lineal respectivamente. El Km de hidrólisis fue 20.5 mM mientras que la k de velocidad de transferencia fue $6.94 \times 10^{-4} \text{min}^{-1}$.

Tabla 1. Cuantificación de FOS e Inulina

Enzima	FOS (%)*	Inulina (%)*
IsIA4	100	100
L310F	120	28
R429K	133	0
S236A	333	0

*Valores relativos considerando 100% los producidos por IsIA4.

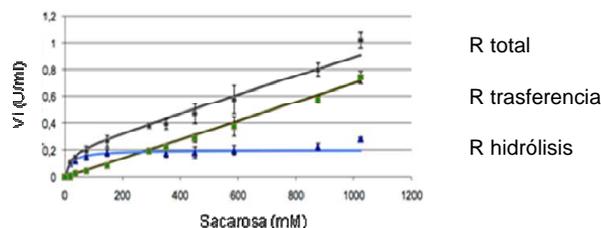


Fig. 1. Comportamiento cinético de la mutante S236A

Conclusiones. La mutante S236A resultó ser la enzima idónea para la producción de FOS, presenta un comportamiento cinético complejo que es la suma de las reacciones de hidrólisis y de transferencia.

Agradecimientos. Proyecto Conacyt CB-2007-81637.

Bibliografía.

- Olivares, V, López-Munguía A, Olvera C.(2003). Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase with in a glucosyltransferase. *J Bacteriol.* 185(12):3606-12.
- Del Moral S. Olvera,C. Rodríguez,M.E. López-Munguía A. (2008). Functional role of the additional domains in inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28 *BMC Biochem* 9 6.
- Ortiz-Soto,M.E. Rivera,M. Rudiño-Pinera,E. Olvera,C. López-Munguía,A. (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties *Protein Engineering Design & Selection* 21 589-595.