



Estudio de la regulación de la expresión de la actividad glicosiltransferasa en *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293

Anabel Otero, Enrique Merino, Agustín López-Munguía y Clarita Olvera. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa. C.P. 62210. Fax: (52 777) 3 17 23 88. anabelob@ibt.unam.mx.

Palabras clave: *Leuconostoc*, glicosiltransferasas, regulación

Introducción. Las especies del género *Leuconostoc* producen exopolisacáridos de glucosa (glucanos) y fructosa (fructanas) sintetizados por las glicosiltransferasas (GTFs) y las fructosiltransferasas (FTFs) respectivamente, empleando la sacarosa como sustrato. Estos polímeros se utilizan en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética. En varias cepas de *Leuconostoc mesenteroides* la expresión de las GTFs y FTFs se induce sólo en presencia de sacarosa. En la cepa B-512F la sacarosa no se comportó como un inductor clásico. En *Streptococcus mutans* la ausencia de los genes *regM* y *covR* afectaron la expresión de las GTFs y FTFs. *regM* tiene alta identidad con el regulador transcripcional *ccpA* y *covR* forma parte del sistema de dos componentes *covRS*. En *Bacillus subtilis* el gen *sacX*, con alta identidad con enzimas II del sistema fosfotransferasa de azúcares (PTS) de sacarosa, está involucrado en la inducción por sacarosa de la levansacarasa SacB. En el genoma de *L. m.* ATCC 8293 se localizaron 3 posibles GTFs y 3 FTFs.

Teniendo en cuenta estos antecedentes los objetivos de éste trabajo son estudiar la actividad glicosiltransferasa (GT) en diferentes fuentes de carbono y el efecto de algunos genes potencialmente relacionados con ésta actividad en *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293.

Metodología. Se midió la actividad GT por el método del DNS (1). Se utilizaron los programas BLAST, MAST y MEME para el análisis del genoma. El ADN recombinante se obtuvo por PCRs sucesivas y se clonó en el vector suicida pSET5s para su transformación en *L. m.* ATCC 8293 por electroporación (2). Para obtener la mutación por doble recombinación homóloga se procedió según (3) y las posibles mutantes se analizaron por PCR.

Resultados y discusión. La actividad GT en *L. m.* ATCC 8293 se midió en cultivos crecidos en sacarosa, glucosa, fructosa y xilosa con sacarosa como sustrato (cuadro 1). Tanto en los sobrenadantes como en la fracción asociada a células la actividad en presencia de fructosa y glucosa es alta, incluso a veces mayor que en sacarosa. Además se midió la actividad con rafinosa, un sustrato exclusivo de las FTFs y éstas, en particular, también se expresaron considerablemente en glucosa y fructosa. En otras cepas de *Leuconostoc* se ha visto que la actividad es muy baja en presencia de glucosa o fructosa (4). En esta cepa, la glucosa y fructosa, además de la sacarosa, parecen ser señales o desencadenan mecanismos de regulación de la expresión de las enzimas.

Cuadro 1. Actividad glicosiltransferasa (U/mL). F.I: factor de inducción: actividad en fuente de carbono / actividad en xilosa.

Fuente de carbono	Fracción asociada a células	F.I	Sobrenadantes	F.I
sacarosa	1.3	16.3	0.184	6.7
xilosa	0.08	1	0.027	1
glucosa	0.909	11.4	0.088	3.2
fructosa	1.949	24.4	0.118	4.3

Tomando como molde las secuencias de *regM*, *covR* y *sacX*, se localizaron los genes Leum 0544 (*ccpA*), Leum 1950 (*covR*) y Leum 0288 (EII ABC *PTS* de sacarosa) en el genoma de *L.m* ATCC 8293. Se construyeron fragmentos de ADN con regiones de homología de 400 nts de los genes *ccpA* y *covR* y *PTS* de sacarosa flanqueando un gen de resistencia a kanamicina (Km). Se clonaron en el vector suicida pSET5s que no puede replicarse a 37°C y que tiene un gen de resistencia a cloranfenicol (Clor). Los vectores recombinantes se transformaron por electroporación en *L.m* ATCC 8293 y los transformantes se crecieron a 37°C para favorecer la recombinación homóloga del vector con el genoma. Actualmente las colonias Km+ Clor- se están analizando por PCR para determinar la ubicación de la inserción del cassette. Este es el primer acercamiento al uso de técnicas de biología molecular en *Leuconostoc mesenteroides*.

Conclusiones.

- 1- La sacarosa, la fructosa y la glucosa inducen la expresión de las glicosiltransferasas en esta cepa.
- 2- Se montaron las técnicas básicas de biología molecular en *L.m.* ATCC 8293.

Bibliografía

1. Sumner J.B, Howell S.F. (1935). A method for determination of saccharase activity. *J Biol Chem.* vol(108) :51-54.
2. Jeong S, Park J, Kim J. H. (2006). Transformation of *Leuconostoc mesenteroides* SY1, a Strain Isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* vol 16(1):149-152.
3. Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. (2001).Thermosensitive Suicide Vectors for Gene Replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid.* vol (46): 140-148.
4. Quirasco M, López-Munguía A, Remaud-Simeon M. (1999) Induction and transcription studies of the dextransucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F. *Appl. Environ. Microbiol.* vol(65): 5504-09.