



Síntesis no procesiva de levanas por SacB de *Bacillus subtilis*

Enrique Raga Carbajal, Agustín López-Munguía y Clarita Olvera Carranza,
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM.
Cuernavaca, Morelos, México, C.P. 62210, e-mail: eraga@ibt.unam.mx

Palabras clave: levansacarasa, mecanismo no procesivo, aceptores tipo levana.

Introducción. SacB de *B. subtilis* es una enzima que a partir de sacarosa sintetiza levanas, polímeros de fructosa constituidos principalmente por enlaces glicosídicos β 2-6. Esta levansacarasa (EC 2.4.1.10), en ciertas condiciones de reacción, sintetiza preferencialmente una levana de bajo peso molecular (7.2 kDa) denominada LevanB, a través de la formación secuencial de un gran número de intermediarios cuyo grado de polimerización (DP) se incrementa en el transcurso de la reacción. A esta síntesis se le ha asociado un mecanismo de elongación no procesivo [1], en el cual la polimerización ocurre tras numerosos ciclos de captación, transferencia del grupo fructosilo de la sacarosa y liberación al medio de reacción de las moléculas que actúan como aceptores.

En este trabajo se presenta la evaluación y caracterización cinética de moléculasceptoras inherentes a la síntesis de LevanB, con el fin de estudiar la participación de aceptores de distinto DP en el contexto de un mecanismo no procesivo.

Metodología. Aceptores tipo levana con DP entre 2 y 7 fueron sintetizados mediante el método bi-enzimático levansacarasa/endolevanasa [2] y purificados mediante SEC preparativa seguida de rPHPLC [3]. Las reacciones de SacB se desarrollaron a 25°C y pH 6 empleando 0.5 μ M de enzima, 0.29 M de sacarosa y 5 mM para cada uno de los aceptores. Las velocidades iniciales de reacción (transferencia e hidrólisis) se obtuvieron mediante la cuantificación de fructosa y glucosa libres por HPLC. El análisis de los productos de reacción se llevó a cabo mediante GPC y HPAE-PAD.

Resultados. En la evolución del perfil de los intermediarios involucrados en la síntesis de LevanB fue posible diferenciar entre intermediarios formados desde tiempos muy tempranos de reacción (en los primeros 10 min) e intermediarios formados en tiempos posteriores (entre 10 min y 5h). Particularmente, fue posible la síntesis y purificación de intermediarios de la fase tardía para ser utilizados como aceptores en la reacción.

Nuestros resultados muestran claramente que los aceptores añadidos son tomados por SacB y elongados no procesivamente hacia compuestos de tamaño intermedio que finalmente dan lugar a LevanB (Fig. 1). Lo anterior dio lugar a un incremento en la producción del polímero en las reacciones con aceptores.

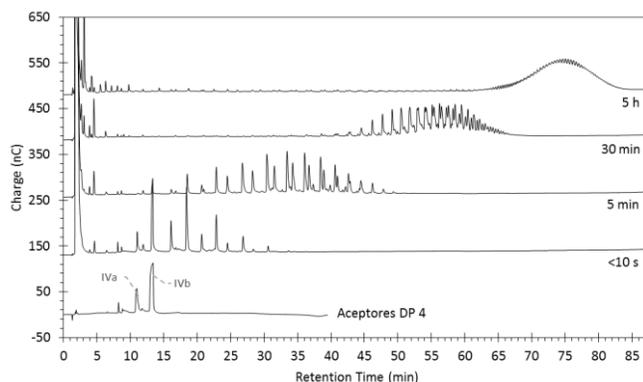


Fig. 1. Evolución en el perfil de HPAE-PAD durante la síntesis no procesiva de LevanB con la adición de aceptores DP4.

Así mismo, los datos cinéticos señalaron un efecto de activación de la reacción para todos los aceptores evaluados. Específicamente, la adición de FOS DP2 incrementó 16% la velocidad de transferencia mientras que los aceptores más grandes (DP3-7) la incrementaron arriba de 4 veces. En contraste, la velocidad de hidrólisis mostró una tendencia a la baja conforme aumenta el tamaño de los aceptores empleados, disminuyendo hasta un 50% en presencia de los aceptores DP7.

Conclusiones. La síntesis no procesiva de LevanB involucra la formación de intermediarios en dos fases de elongación, una temprana y una tardía.

La incorporación al medio de reacción de aceptores inherentes a la reacción genera un efecto activador debido a un incremento en la velocidad de transferencia, la cual se desarrolla preferencialmente sobre las moléculas añadidas.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por el CONACyT, en el marco del proyecto CB-SEP 219728 y la beca No. 420196.

Bibliografía.

1. Raga-Carbajal E. (2013) Estudios sobre el mecanismo de elongación de levanas de SacB de *Bacillus subtilis*. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM. México.
2. Porras-Domínguez J., Ávila-Fernández A., Rodríguez-Alegría M., Miranda-Molina A., Escalante A., González Cervantes R., Olvera C., López Munguía A. (2014) Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochem.* 49, 783-790.
3. Praznik W., Löppert R., Cruz Rubio J.M., Zangger K., Huber A. (2013) Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of *Agave tequilana* Weber, var. Azul. *Carbohydr Res.* 381, 64-73.