



EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y CARACTERIZACIÓN DE LA INULOSACARASA DE *Leuconostoc citreum* Y DOS VERSIONES TRUNCADAS.

Clarita Olvera Carranza, Rebeca Pérez Morales, María Elena Rodríguez-Alegría, Agustín López-Munguía Canales.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología-UNAM
Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa. C. P. 62210, Cuernavaca, Mor. Fax. (77) 711 49 03
e-mail: clarita@ibt.unam.mx

Palabras clave: Fructosiltransferasas, Inulosacarasa, inulina.

Introducción. Las inulosacarasas son enzimas que transfieren el residuo fructosilo de la sacarosa a un polímero en crecimiento llamado inulina. Los polímeros sintetizados por estas enzimas presentan enlaces β 2-1 y pueden presentar diversos grados de polimerización. Debido a la importancia biológica de los polímeros de inulina en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, así como su beneficio a la salud humana, es de gran interés al conocimiento de las inulosacarasas; sus propiedades cinéticas y mecanismos de reacción.

Se cuenta con el gen *islA* que codifica para la inulosacarasa (IS) de *Leuconostoc citreum*. (1). Esta enzima presenta características de FTF's y GTF's, ya que presente tres dominios; un dominio catalítico que abarca la secuencia completa de algunas FTF's y dos dominios homólogos a los dominios variables y de unión a polímero de la alternansacarasa (ASR) de *L. mesenteroides*.

En el presente trabajo se muestra la expresión de la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* y dos versiones truncadas del gen, bajo un promotor inducible, con la finalidad de aumentar la producción de las enzimas y llevar a cabo su caracterización bioquímica.

Metodología. Las construcciones fueron realizadas en el vector pBAD-thio TOPO un sistema de expresión, que posee un promotor fuerte inducido con arabinosa. Las manipulaciones de DNA se llevaron a cabo según Maniatis, 1982.

Resultados y discusión. Con el fin de explorar las propiedades de versiones más pequeñas de la *islA*, se expresó heterológamente el gen que codifica para la enzima *islA* y dos formas truncadas, para lo cual se realizaron dos deleciones en el extremo C-terminal; en la primera se eliminó la región de alta identidad con la ASR y en la segunda se eliminó la misma región más la zona de transición (figura 1). Las enzimas resultantes se denominaron EIS2 e EIS3 respectivamente.

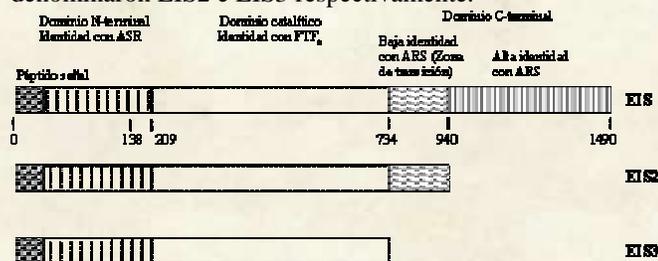


Figura 1. Diferentes formas expresadas de la Inulosacarasa *IslA*.

Se logró sobreexpresar la inulosacarasa y sus versiones truncadas, obteniendo 2.7, 25.62 y 107.41 veces más de actividad enzimática EIS1, EIS2 y EIS3 respectivamente, en comparación con las enzimas recombinantes expresadas bajo su propio promotor.

Las condiciones óptimas para producir las enzimas fueron: temperatura de 23°C, las concentraciones de inductor para las cepas EISR1 y EISR2 fueron de 0.02% y para EISR3 0.2% de arabinosa. Las cinéticas de crecimiento muestran que la cepa EISR3 crece más rápido en comparación con las otras dos.

En todas las enzimas recombinantes el porcentaje de transferencia aumentó proporcionalmente al incrementar la concentración de sustrato. El porcentaje de transferencia para EIS1 se incrementó a 70% a una concentración de sacarosa 730 mM, para EIS2 60% a 584 mM y 30% para EIS3 a 730 mM de sacarosa.

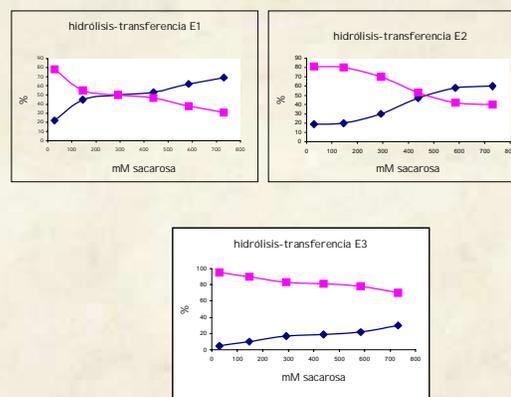


Fig. 1. Porcentaje de hidrólisis (\square) y de transferencia (\diamond) de las enzimas recombinantes con respecto a la concentración de sustrato.

Conclusiones. Se logró la sobre-expresión de la inulosacarasa y sus dos versiones truncadas. En todos los casos se observó que las inulosacarasas son más eficientes para transferir el residuo fructosilo hacia el agua. No obstante se logró dirigir la especificidad de las enzimas hacia la síntesis de polímero aumentando la concentración de sustrato.

Agradecimiento. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento no. 40609-Z y a la UNAM (PAPIIT No. IN238202). Agradecemos a la T.L.C. Aurelia Ocampo por el apoyo técnico.

Bibliografía. Olivares, I. V., López-Munguía A., and C. Olvera. 2003. Molecular Characterization of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a Fructosyltransferase within a Glucosyltransferase. *J. Bacteriol.* **185**: 3606-3612.