



## CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA LEVANSACARASA (LevS) DE *Leuconostoc mesenteroides* B-512F.

Sandra Morales-Arrieta, Clarita Olvera-Carranza, María Elena Rodríguez Alegría y Agustín López Munguía.  
Instituto de Biotecnología-UNAM. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa,  
Cuernavaca Morelos 62250, fax (01 777 3 11 49 03)  
sandy@ibt.unam.mx

*Palabras clave:* levansacarasa, levana, *Leuconostoc mesenteroides*.

**Introducción.** El uso de fructosiltransferasas que no requieren cofactores para sintetizar polímeros de fructosa, como es el caso de la levansacarasa e inulosacarasa, es de interés especial en la industria de cosméticos, alimentación y farmacéutica. La levansacarasa cataliza la síntesis de levana a partir de la sacarosa, transfiriendo moléculas de fructosa a la cadena creciente, pero en presencia de moléculas pequeñas, puede llevarse a cabo la transferencia al aceptor. *Leuconostoc mesenteroides* es una bacteria ácido-láctica que produce principalmente una glucosiltransferasa, la dextrantransferasa, la cual ha sido extensamente estudiada debido a la aplicación industrial de la dextrana. Sin embargo, se tienen reportes de la presencia de levansacarasa en la cepa industrial de *Leuconostoc mesenteroides* B-512F (1). En nuestro laboratorio el gen de la levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B512F fue aislado, secuenciado y clonado en *E. coli*. La enzima recombinante es una fructosiltransferasa que produce un polímero de levana, según estudios realizados por RMN. En este trabajo, se presenta la caracterización de la levansacarasa (LevS) de *Leuconostoc mesenteroides* B512F en términos de pH, temperatura y estabilidad así como también sus propiedades cinéticas.

**Metodología.** La actividad LevS fue determinada por el poder reductor liberado de la sacarosa utilizando el ácido 3,5- dinitrosalicílico (método DNS, 2). La actividad LevS fue probada en un rango de 20 a 40°C en buffer fosfatos 50 mM mientras que el efecto del pH fue determinado en un rango de 5.0 a 8.0. La termoestabilidad fue evaluada incubando 5U/ml de la enzima a 20, 30 y 35°C. El efecto de la concentración del calcio y EDTA en la actividad enzimática también fue estudiado.

**Resultados y discusión.** Basados en el análisis de secuencia de la fructosiltransferasa aislada de *Leuconostoc mesenteroides* B512F, encontramos que es una proteína mosaico con características estructurales de glucosiltransferasas y fructosiltransferasas. Varias de las propiedades de la enzima recombinante fueron examinadas para encontrar las mejores condiciones para los estudios cinéticos. Se encontró que el pH óptimo de la enzima fue de 6, valor muy similar a los reportados para varias levansacarasa, como la de *B. subtilis*, *Z. mobilis* entre otras. La influencia en la temperatura en la actividad levansacarasa fue llevada a cabo a pH 6. Como en la mayoría de las

glucosiltransferasas, la actividad se pierde rápidamente a temperaturas superiores a 35°C. La temperatura óptima para la LevS fue encontrada en un intervalo de 30-35°C así como también para las levansacarasa recombinantes de *R. aquatilis* y *L. mesenteroides* (MIFT) expresadas en *E. coli*. El efecto del calcio y EDTA en la levansacarasa recombinante fue estudiado al adicionar diferentes concentraciones de EDTA y Ca<sup>2+</sup>. La actividad de la enzima disminuyó al incrementar la concentración de EDTA, alcanzando una reducción del 100% a 1mM. Una activación de 1.3 veces de la actividad original, se observó al adicionar 100 µM de Ca<sup>2+</sup>.

La actividad total de la LevS recombinante mostró una cinética de tipo Michaelis-Menten. Los valores de Km y Vmax fueron de 36.7mM y 84.8 U/ml respectivamente, los cuales fueron derivados de graficas tipo Lineweaver-Burk. A diferencia de otras glicosiltransferasas, las reacciones de aceptor de la LevS recombinante fue muy pobre usando maltosa como aceptor. Por otro lado, la enzima hidroliza un 25% del sustrato cuando se trabaja a 875 mM de sacarosa.

### Conclusiones.

- El pH óptimo de la levansacarasa recombinante es de 6.0
- La temperatura óptima de la LevS esta en el rango de 30-35°C.
- La actividad LevS fue reducida al 100% en presencia de 1 mM de EDTA.
- LevS presenta una cinética de tipo Michaelis-Menten.
- 

**Agradecimiento** Este proyecto es financiado por CONACyT no. 40609-Z y UNAM (PAPIIT No. IN238202). A T.L. Aurelia Ocampo por su asistencia técnica.

### Bibliografía.

1. Summer, J. B., and S. F. Howell. 1935. A method for determination of invertase activity. *J. Biol. Chem.* 108:51-54
2. Miller, A. W., and J. F. Robyt. 1986. Functional molecular size and structure of dextrantransferase by radiation inactivation and gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* 870(2):198-203.