



## AISLAMIENTO DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA 1-SST (SACAROSA:SACAROSA 1-FRUCTOSILTRANSFERASA) DE *Agave tequilana* Weber Var. azul.

Ángela Ávila Fernández\*, Clarita Olvera Carranza, Agustín López-Munguía Canales.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología-UNAM

Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa. C. P. 62210 A. P. 501-3, Cuernavaca, Mor. Fax. (777) 3 11 49 03

e-mail: [angelaaf@ibt.unam.mx](mailto:angelaaf@ibt.unam.mx)

Palabras clave: Fructosiltransferasas, fructooligosacaridos, agave.

**Introducción.** Los fructooligosacáridos (FOS) son fructanas de bajo grado de polimerización utilizados ampliamente en el desarrollo de alimentos funcionales ya que poseen características prebióticas. Para su uso comercial, los FOS son producidos a partir de sacarosa con enzimas fungales que dan lugar a mezclas de FOS de diferente grado de polimerización. Se ha propuesto que los compuestos de mayor importancia como prebiótico son aquellos de menor grado de polimerización (kestosa, nistosa) (1). Por esta razón, resulta interesante buscar nuevas enzimas que nos permitan obtenerlos de manera selectiva. Una alternativa para su obtención la constituye el uso de las enzimas de plantas que acumulan fructanas, como el Agave. En ellas, la enzima Sacarosa:Sacarosa 1-Fructosiltransferasa (1-SST) produce el trisacárido 1-kestosa a partir de la sacarosa. Este trisacárido es utilizado por otras enzimas del metabolismo vegetal para generar polisacáridos de mayor grado de polimerización, como la inulina en el agave, la cual, constituye el principal sustrato de fermentación en la producción del tequila.

Por la importancia comercial de la 1-kestosa y el interés por conocer la biosíntesis de fructanas en el agave resulta interesante estudiar las características moleculares y bioquímicas de la 1-SST. Este trabajo tiene como objetivo el aislamiento del gen que codifica para la 1-SST en *Agave tequilana* Weber Var. azul.

**Metodología.** El aislamiento del cDNA se realizó a partir del RNA de piña de plantas de 30 cms cultivadas en invernadero e inducidas con sacarosa (2). Se utilizó la técnica RT-PCR para amplificar un fragmento de la región intermedia del gen mediante el uso de un oligonucleótido conservado y otro degenerado diseñados con base en el alineamiento de las secuencias nucleotídicas reportadas en la base de datos. Una vez determinada la secuencia del fragmento se diseñó un oligonucleótido conservado para obtener el extremo 3' mediante la técnica de 3'RACE. Para la obtención del extremo 5' se recurrió a la técnica Genome Walker (GW), a partir de DNA genómico obtenido de hoja de plantas de 30 cms.

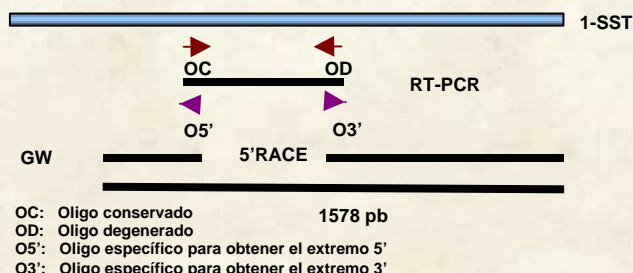


Figura 1. Estrategia de aislamiento del gen de la 1-SST.

**Resultados y discusión.** La homología entre las 1-SST y las invertasas representa una dificultad en el aislamiento del gen, es por ello que se probaron varias estrategias, incluida la búsqueda en un banco de cDNA.

Con la estrategia descrita en la metodología se obtuvo un fragmento de 1578 pb (Figura 1) que fue analizado en el programa BLAST y presentó identidad con diferentes fructosiltransferasas e invertasas reportadas en la base de datos (Cuadro 1). En la secuencia, se localizan 5 de las 6 regiones conservadas en las fructosiltransferasas de plantas y hongos (3), entre ellas, el motivo EC y el motivo RDP que contienen 2 de los 3 residuos que al parecer están involucrados en la catálisis (4).

Tipo de enzima	Especie	% de identidad
1-SST	<i>Allium cepa</i>	75
	<i>Allium sativum</i>	73
Invertasa	<i>Allium cepa</i>	66
	<i>Asparagus officinalis</i>	64
	<i>Oryza sativa</i>	59
6-GFT	<i>Asparagus officinalis</i>	62
1-FFT	<i>Lolium perenne</i>	58
	<i>Triticum aestivum</i>	56

Cuadro 1. Porcentaje de identidad del fragmento con diferentes fructosiltransferasas e invertasas.

El fragmento de 525 aminoácidos constituye el 96.6% del dominio conservado que caracteriza a la familia 32 de las glicosido hidrolasas.

**Conclusiones.** Se obtuvo un fragmento de 1578 pb de un gen que de acuerdo a la identidad observada en el análisis de secuencia es clasificado dentro de la familia 32 de las glicosido hidrolasas y codifica para una Sacarosa:Sacarosa 1-Fructosiltransferasa.

**Agradecimientos.** Agradecemos al CONACYT los financiamientos No. 40609-Z y 181094, a la UNAM el financiamiento PAPIIT No. IN238202 y a la DGEP.

### Bibliografía.

- Kaplan H, Hutkins RW. 2003. Metabolism of fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl Environ Microbiol.* 69(4):2217-22.
- Vijn I, van Dijken A, Luscher M, Bos A, Smeets E, Weisbeek P, Wiemken A, Smeekens S. 1998. Cloning of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined fructan molecules from sucrose. *Plant Physiol.* 117(4):1507-13.
- Pons T, Hernández L, Batista FR, China G. 2000. Prediction of a common  $\beta$ -propeller catalytic domain for fructosyltransferases of different origin and substrate specificity. *Protein Science.* 9:2285-91.
- Ritsema T, Altenbach D, Hernández L, Smeekens S, Boller T, Wiemken A. Fructan-related enzymes: How plants play with sucrose. *Fructan 2004. Fifth International Fructan Symposium.* Center for genetic engineering and Biotechnology. Havana, Cuba. December 5 to 9, 2004. 105.