



## CARACTERIZACIÓN DE AGREGADOS CATALÍTICOS ENTRECRUZADOS A PARTIR DE LA LEVANSACARASA DE *Bacillus subtilis*.

Ortiz-Soto M.E., Rivera M.H, Rudiño-Piñera E., Horjales-Reboredo E., Olvera-Carranza C., and López-Munguía A. Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mo. 62271, México. Tel (777) 3291609, Fax (777) 3114903. marisoto@ibt.unam.mx

*Palabras clave:* fructosiltransferasas, levansacarasa, CLEAs.

**Introducción.** Los polímeros de fructosa, sintetizados a partir de sacarosa por fructosiltransferasas (FTF) reciben el nombre de fructanas. Entre las fructanas más importantes se encuentran la inulina y la levana. Las FTF han cobrado relevancia debido a que las fructanas son atractivas desde el punto de vista industrial por sus características estructurales, y por su aplicación en la obtención de glicósidos. La actividad, propiedades y productos de las FTF en solución difieren del comportamiento de la enzima inmovilizada sobre algún soporte, probablemente como resultado de un cambio en el microambiente de la enzima.

En este trabajo se plantea la insolubilización de la levansacarasa silvestre y de las mutantes R360S y R360K mediante inmovilización no convencional en sistemas donde la matriz proteica es a la vez el catalizador y el soporte. Entre los catalizadores que reúnen estas características destacan los CLECs (cross-linked enzyme crystals) y los CLEAs (cross-linked enzyme aggregates).

**Metodología.** El gen que codifica para la LS silvestre y para las mutantes fue ligado en el vector de expresión pET 22 b(+). Posteriormente las enzimas fueron expresadas en *E. coli* BL21 después de inducir con 0.2 mM de IPTG y purificadas mediante intercambio catiónico. Para la obtención de los CLEAs, las enzimas fueron precipitadas con sulfato de amonio y entrecruzadas con glutaraldehído. La actividad se determinó mediante la liberación de azúcares reductores. La relación hidrólisis/transferencia fue analizada por HPLC usando una columna para determinación de carbohidratos.

**Resultados y discusión.** Se determinó la estabilidad de la LS silvestre y de las mutantes en un rango de pH de 4 a 8 incubando sin sustrato a 30 °C. Tanto las variantes en la posición R360 como la enzima silvestre mostraron una mayor actividad a pH 6, sin embargo, se observó una marcada diferencia en la estabilidad de las mismas a 40 °C. De acuerdo con los resultados, la mutante R360K fue más estable, con un tiempo de vida media de 78 min ( $\pm 3.4$ ), en tanto que la enzima silvestre y la mutante R360S presentaron tiempos de vida media de 66 min ( $\pm 2.5$ ) y 17 min ( $\pm 0.98$ ) respectivamente.

Se determinó la relación hidrólisis/transferencia de la LS silvestre y de las mutantes a 37 °C en presencia de 120 g/L de sacarosa o 120 g/L de sacarosa/aceptor, usando maltosa y xilosa como moléculas aceptoras del residuo fructosilo. En todas las enzimas se observó un aumento en la transferencia con la adición de aceptores. El análisis del peso molecular de

los productos mostró que la mutante R360S no sintetiza polímero, en tanto que la mutante R360K y la silvestre polimerizan el 13% y el 45 % de la fructosa proveniente de la sacarosa respectivamente.

Posteriormente se obtuvieron CLEAs de las tres enzimas después de optimizar las condiciones de precipitación y entrecruzamiento (Schoevaart y col. 2004). Los CLEAs obtenidos con la LS silvestre retuvieron 26.9 % ( $\pm 1.37$ ) de la actividad de la enzima en solución, en tanto que las mutantes R360K y R360S el 36.5 % ( $\pm 1.12$ ) y 73.1 % ( $\pm 9.6$ ) respectivamente (Fig.1).

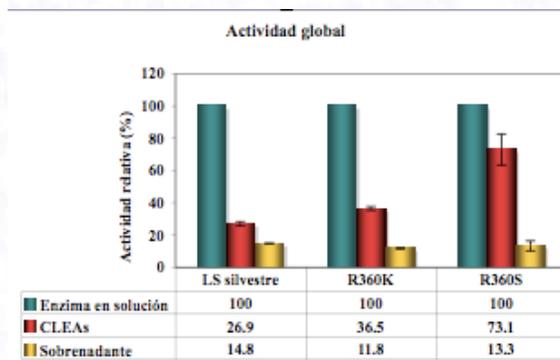


Fig. 1. Actividad global de CLEAs y enzima en solución a partir de la LS silvestre y las mutantes R360K y R360S.

**Conclusiones.** El control del peso molecular de los productos o de la relación hidrólisis/transferencia resulta relevante en la caracterización de una FTF inmovilizada, ya que la producción de polímeros de peso molecular elevado puede resultar en la obstrucción e inactivación del biocatalizador. Ambos parámetros fueron modificados al agregar maltosa y xilosa, observando que son mejores aceptores del residuo fructosilo que la sacarosa o la levana. En la caracterización de los CLEAs la mutante R360S mostró mayor actividad comparada con la enzima en solución. Estos resultados sugieren que la actividad de los agregados puede estar siendo afectada por la síntesis de polímero, ya que los datos indican una actividad mayor en el caso de ambas mutantes, donde la síntesis de levana es menor o nula.

### Bibliografía.

1. Schoevaart R, Wolbers MW, Golubovic M, Ottens M, Kieboom AP, van Rantwijk F, van der Wielen LA, y Sheldon RA. (2004). Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol Bioeng.* 87(6): 754-762.