



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE LevC, UNA FRUCTOSILTRANSFERASA DE *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* ATCC 8293.

Sara Guillermina Centeno-Leija, Clarita Olvera-Carranza y Agustín López-Munguía. Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca. Mor; CP 62210. sarita@ibt.unam.mx

Palabras clave: Quimera Natural. Levansacarasa. Levana.

Introducción. Las glicosiltransferasas catalizan la transferencia de residuos glicosilo de la sacarosa para formar glicopolímeros llamados glucanos. Entre ellas se encuentran a las glucosiltransferasas (GTF's) y las fructosiltransferasas (FTF's) que sintetizan polímeros de glucosa y fructosa respectivamente. Las FTF's, levansacarasa (LS) e inulosacarasa (IS), producen inulina y levana. La levana tiene especial interés en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. Se ha reportado que la LS LevS¹ e IS IsIA² presentan dominios adicionales (N y C-terminal) con una alta identidad a GTF's, lo que indica que se trata de quimeras naturales.² Basados en la secuencia de levS se encontraron en el genoma de *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 tres FTF's hipotéticas con una alta identidad a levS: 80% levC, 72% Lmes2055 y 67% levL. Lo que implica la existencia de nuevas FTF's con esta dualidad estructural que podrían presentar características funcionales diferentes y/o mejores.

El objetivo es encontrar las glicosiltransferasas presentes en esta nueva cepa y demostrar la naturaleza quimérica de estas 3 FTF's hipotéticas. Con el fin de aislar, clonar y expresar una de ellas para caracterizarla bioquímica y cinéticamente al igual que su producto.

Metodología. Los cultivos de *L. mesenteroides* se llevaron a cabo en medio LM, a 30°C hasta alcanzar una pH de 5. La identificación de las enzimas y del polímero producido se llevo a cabo mediante geles de SDS-PAGE teñidos con Coomassie y de actividad in situ utilizando como sustratos sacarosa y rafinosa. Los análisis computacionales se realizaron mediante BLAST para el análisis de las secuencias y con el programa Geno3D para el modelamiento molecular. Los genes levC y levL fueron aislados, clonados y secuenciados mediante técnicas de biología molecular. La expresión heteróloga de estas enzimas se llevo a cabo en *E. coli* con el sistema de expresión pBAD/TOPO Thiofusion (invitrogen). La purificación de las enzimas se llevo a cabo mediante cromatografía de afinidad con columnas Hi Trap chelating. La actividad FTF y la especificidad fue determinada midiendo el poder reductor liberado de la sacarosa utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y cuantificando los productos de reacción por HPLC. La determinación de la naturaleza y peso molecular del polímero se llevaron a cabo mediante RMN y permeación en gel respectivamente.

Resultados y discusión. Con el fin de identificar todas las GTF,s y FTF's presentes en el genoma de *L. mesenteroides* ATCC 8293 se realizó el alineamiento BLAST el cual reveló, que en el genoma de se encuentran las tres FTF's ya detectadas Lmes2054 -113kDa (LevC), Lmes2058 -112kDa (LevL) y Lmes2055 -87kDa, además de tres GTF's:

Lmes0893-170kDa, Lmes1865-168kDa y Lmes0956-313kDa. En base los análisis de actividad a partir del cultivo de la cepa nativa, encontramos que produce una proteína de 120KDa con actividad FTF (LevC y/o LevL) y dos proteínas con actividad GTF de 180-190KDa (Lmes893 y/o Lmes1865) y >200KDa(Lmes0956). El análisis molecular demuestra que las tres secuencias presentan identidad con GTF's en su dominio C-terminal. El modelamiento de la estructura terciaria del dominio catalítico de LevC, indica que tiene un plegamiento tipo β -propela de 5 hojas característico de FTF's, y además presenta los residuos catalíticos dentro de la cavidad central (sitio activo). Los genes levC y levL fueron aislados, clonados y expresados en *E.coli*. Se logró una expresión para LevC de 1300U/mL (30 veces mayores a los reportados para FTF recombinantes) y para LevL de 11 U/mL. Después de la purificación de LevC se logró obtener un 90% de pureza y una actividad específica de 240U/mg. El análisis de actividad óptima demostró que se haya entre los 30-35°C a un pH de 7-7.5. LevC presenta una Km de 27.3mM, una Vmax de 323 U/mL y una Kcat de 282.89s⁻¹, además se encontró que la enzima LevC transfiere la fructosa un 70% al polímero y un 30% al agua. Una Kcat similar (287s⁻¹) es reportada para la levansacarasa de *Lactobacillus reuteri*³, sin embargo transfiere un 66% al agua y un 33% al polímero. El espectro de RMN indica que el polímero es levana. El peso molecular de esta levana es de 5000KDa.

Conclusiones. Se logró identificar las glucosiltransferasas presentes en *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 y las tres FTF's son quimeras naturales, lo que sugiere la existencia de una nueva sub-familia de FTF's. LevC resultó ser un levansacarasa con altos valores de expresión además de ser rápida y con una buena especificidad. Lo que la hace candidata a explotación industrial.

Agradecimiento. Los autores agradecen a Fernando González y María Elena Rodríguez por el apoyo técnico.

Bibliografía.

- Morales-Arrieta S, Rodríguez M.E, Segovia L, López-Munguía and Olvera-Carranza C. 2006. Identification and functional characterization of *levS*, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Gene*.
- Olivares, I.V., López-Munguía A; and Olvera C. 2003. Molecular Characterization of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a Glucosyltransferase.. *J. Bacteriol.* 185: 3606-3612.
- Van Hijum,S.A., Szalowska,E., van der Maarel,M.J. and Dijkhuizen,L. (2004). Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri* *Microbiology* (Reading, Engl.) 150 (Pt 3), 621-630.