



CAMBIOS EN AMINOACIDOS CERCANOS A LOS RESIDUOS CATALITICOS, MODIFICAN EL PESO MOLECULAR DE LOS PRODUCTOS DE LA INULOSACARASA DE *L. CITREUM*.

Morales-Arrieta Sandra, Rodríguez-Alegría Ma. Elena, Olvera-Carranza Clarita y López-Munguía Agustín.
Departamento de Ingeniería celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos 62250, México. 7773114903, agustin@ibt.unam.mx

Palabras clave: inulina, inulosacarasa y L. citreum.

Introducción. La inulina es un polisacárido compuesto principalmente por unidades de fructosa con enlaces β 2-1 en su cadena lineal y dependiendo de su origen pueden presentar ramificaciones en β 2-6. La inulina es producida a partir de la sacarosa, por múltiples especies de plantas y diversos microorganismos tales como *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*. Debido a sus propiedades, la inulina ha sido utilizada como prebiótico, fibra dietética, sustituto de grasas, texturizante y estabilizante (Roberfroid, 2000). En nuestro grupo de trabajo se aisló una inulosacarasa (IS) de *L. citreum*, que de acuerdo su estructura primaria, es una quimera natural donde su región amino y carboxi-terminal tienen identidad a la alternansacarasa, una glucosiltransferasa de *L. mesenteroides* NRRL 1355 (Olivares, 2003). En el presente trabajo describimos la caracterización bioquímica de mutantes realizadas por mutagénesis sitiodirigida, en aminoácidos cercanos a los residuos catalíticos así como el efecto de dichas mutaciones en el peso molecular de la inulina sintetizada por estas mutantes.

Metodología. Las mutaciones se generaron en una versión truncada de IS donde se eliminó parte del carboxilo terminal dejando una versión truncada de 102 kDa (E2), la cual contiene la región amino terminal y el dominio catalítico. El vector pBad/TOPO fue utilizado para la expresión y clonación de las mutantes. Las proteínas recombinantes se purificaron en una columna por afinidad a Niquel y se caracterizaron cinéticamente. La determinación del peso molecular se llevó a cabo por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Resultados y discusión. Los residuos a mutagenizar se seleccionaron comparando las secuencias de la inulosacarasa de *L. citreum* (AY191311.1) y la levansacarasa de *B. subtilis* (X02730.1). En estos alineamientos se encontraron diferencias en regiones cercanas a los residuos catalíticos hipotéticos Asp501 y Glu600, generándose una triple (KLI502HYV) y cuádruple (IVPF603VFKM) mutantes en las cuales los residuos se cambiaron por los de la levansacarasa. Las dos mutantes se expresaron en *E. coli* y fueron purificadas a homogeneidad a partir de extractos celulares frescos y en presencia de inhibidores de proteasas. De acuerdo con la actividad específica KLI502HYV (0.103 U/mg) es 200 veces menos activa que E2 (22.5 U/mg) mientras que, IVPF603VFKM (1.25 U/mg) es 10 veces menos activa que la parental. A través de resonancia magnética nuclear de ^{13}C se identificó que el polímero sintetizado por IS, E2 y por las dos mutantes corresponde a

inulina, es decir, que ninguna de las mutaciones cambiaron la especificidad hacia el tipo de enlace del polímero.

En términos del mecanismo de reacción, la relación entre sacarosa y la que es transferida por E2 no se observaron cambios significativos, ya que la relación no se modificó (46/54) tanto en las mutantes como en la parental utilizando 10% de sacarosa.

Una característica adicional que presentan algunas inulosacarasas es la capacidad de transferir la fructosa a otras moléculas agregadas al medio de reacción como puede ser la maltosa. En este caso las dos mutantes y E2 fueron capaces de sintetizar fructósidos aunque la IVPF603VFKM en mayor proporción.

Se analizó la distribución de pesos moleculares de las inulinas producidas por las mutantes, E2 e IS. Como puede observarse en la figura 1, la inulina de IS, E2 y la mutante KLI502HYV sintetizan un polímero de alto peso molecular. Sorprendentemente, la mutante IVPF603VFKM produce una inulina de mucho menor peso molecular igual al de la levana producida por la de *Bacillus subtilis*. Es interesante recalcar, que esta mutación se encuentra cercana (a nivel de estructura primaria) al probable residuo catalítico Glu600, sin embargo no contamos con una estructura cristalográfica que nos ayude a interpretar el complejo mecanismo de elongación del polímero.

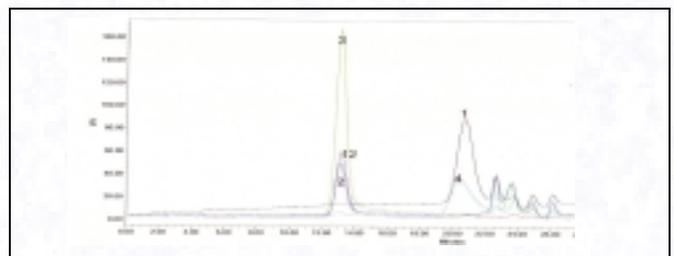


Fig. 1. Distribución de pesos moleculares de fructanas. 1) inulina de IVPF603VFKM, 2) inulina de KLI502HYV, 3) inulina de IS, 4) levana de *B. subtilis* y 12) inulina de E2.

Conclusiones. Los cambios generados por la mutación no modificó la especificidad de la inulosacarasa a levansacarasa sin embargo; La sustitución de IVPF en el residuo 603 por VFKM modificó el peso molecular de la inulina sintetizada por la mutante.

Bibliografía.

1. Roberfroid, M.B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr.* **71**: 1682S-7S.
2. Olivares-Illana, V., López-Munguía, A. y Olvera, C. 2003. Molecular Characterization of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a Fructosyltransferase Within a Glucosyltransferase. *J Bacteriol.* **185**: 3606-3612.