

## AI SLAMI ENTO Y CARACTERIZACION DE LA LEVANSACARASA DE *Leuconostoc mesenteroides* B512F.

Sandra Morales-Arrieta, Agustín López-Munguía y Clarita Olvera-Carranza.  
Departamento de Biología Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología-UNAM  
Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa. C.P. 62210, Cuernavaca, Mor. Fax (77) 711 49 03  
e-mail: sandy@ibt.unam.mx

*Palabras clave:* Fructosiltransferasa, levana, sacarosa.

**Introducción.** *Leuconostoc mesenteroides* B512F es capaz de producir glucosiltransferasas y fructosiltransferasas, responsables de la producción de polímeros y oligosacáridos de glucosa y fructosa respectivamente, los cuales han sido utilizados principalmente como prebiótico, siendo los alimentos y los cosméticos los campos de mayor aplicación (1)

La levansacarasa (LS) es una fructosiltransferasa que produce un polímero de fructosa a partir de sacarosa denominado levana, el cual se caracteriza por tener enlaces del tipo  $\alpha$  (2-6) para la cadena lineal y  $\beta$  (2-1) para la cadena ramificada (2)

La fructosiltransferasa de ésta cepa presenta un peso molecular muy por arriba del normal de las levansacarosas bacterianas, por lo que resulta por demás interesante, realizar un estudio profundo de la levansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* de la cepa NRRL B512F a nivel molecular, que nos permita conocer con base en su estructura primaria si existe homología con el resto de las fructosiltransferasas.

**Metodología.** A través de electroforesis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie, identificamos 3 proteínas de 170, 120 y 80 kDa. Por geles de actividad *in situ* fue posible observar la formación del polímero, dichos geles fueron hidrolizados primeramente con dextranasa y posteriormente con inulinasa. La proteína de 120 kDa fue secuenciada parcialmente obteniéndose péptidos, con los cuales se diseñaron oligonucleótidos degenerados que nos permitieron amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del DNA cromosomal. El producto obtenido fue purificado y secuenciado.

**Resultados y discusión.** Las proteínas fueron producidas por fermentación en tubos de ensayo con 5 ml de medio de cultivo estéril a 30°C y 250 rpm para producir el inóculo a partir de células almacenadas en glicerol, posteriormente se inoculó una fermentación de 50 ml en matraz utilizando las mismas condiciones. Al final de la fermentación se recuperaron las células por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C, después fueron lavadas 2 veces con buffer fosfato de potasio pH 6.5 y se resuspendieron en el mismo buffer.

De acuerdo con los geles de actividad *in situ* fueron identificadas las proteínas de 120 y 80 kDa con actividad levansacarasa, ya que al hidrolizar los polímeros generados por las 3 enzimas con dextranasa e inulinasa, únicamente se

degradó el polímero producido por la enzima de 170 kDa. A partir de la proteína de 120 kDa se secuenciaron 2 péptidos, los cuales fueron utilizados para diseñar un par de oligonucleótidos con los que obtuvimos por PCR un fragmento de aproximadamente 1.2 Kb (FTFlm512). El análisis de la secuencia por BLAST mostró una identidad con la LS de *Bacillus amiloquefaciens* (44%), LS de *Bacillus subtilis* (46%), LS *Streptococcus salivarius* (47%), LS *Lactobacillus reuteri* (48%), LS *Streptococcus mutans* (51%), Inulosacarosa de *Lactobacillus reuteri* (51%), Inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* (51%). Dentro del genoma de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 recientemente secuenciado, encontramos 3 genes hipotéticos que presentan una identidad con levansacarosas. La primera de ellas es Lmes 1837 que tiene un peso molecular de 113 kDa, la segunda lmes 1838 de 87 kDa y la lmes1841 con un peso de 112 kDa. El porcentaje de identidad de éstas 3 con FTFlm512 fue de 89, 82 y 63 respectivamente.

En la secuencia de FTFlm512 localizamos las 8 regiones conservadas en las fructosiltransferasas bacterianas dentro de las cuales se encuentran la caja de sacarosa y el motivo RDP.

**Conclusiones.** La proteína de 120 kDa y la de 80 kDa son las enzimas que presentan la actividad levansacarasa. El fragmento de 1211 pares de bases presenta una alta identidad con la región catalítica de las fructosiltransferasas, así como también las 8 regiones conservadas.

**Agradecimiento.** Este trabajo fue financiado por el CONACyT y DGEP. Agradecemos la asistencia técnica de T. L. Aurelia Ocampo y al M en B René Hernández por la secuenciación de DNA.

### Bibliografía

- Vallette P, V Pelenc, Z Djouzi, C Andrieux, F Paul, P Monsan and O Sylit. (1993). Bioavailability of new synthesized glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *J Sci Food Agri* **62**: 121-127
- Seymour f., R. Knapp and S. Bishop, (1976). Determination of the Structure of dextran by  $^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance spectroscopy *Carbohydrate Res* **51**: 179-194.

