



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## ESPECIFICIDAD DE FRUCTOSILTRANSFERASAS QUIMÉRICAS

Ruiz Leyva Paulina, Olvera Carranza Clarita y López-Munguía Agustín. Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca. Mor., CP. 62210. [ruizlp@ibt.unam.mx](mailto:ruizlp@ibt.unam.mx)

*Palabras clave: Fructosiltransferasas, SacB, transferencia*

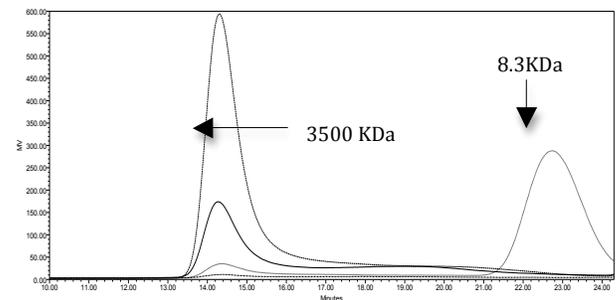
**Introducción.** Las fructosiltransferasas (FTF) utilizan la sacarosa como sustrato para catalizar la transferencia de un residuo de fructosa a una molécula aceptora. Cuando el agua actúa como aceptor ocurre la hidrólisis del sustrato. Si una segunda molécula de sacarosa es la que actúa como aceptor, la enzima le transfiere el residuo de fructosa formando un trisacárido. Éste a su vez actúa como aceptor, y así sucesivamente, hasta dar lugar a un polímero de fructosa llamado fructana, o bien, si el GP es menor a 10, a fructo-oligosacáridos (FOS). Dependiendo de la naturaleza del enlace entre las fructosas, las FTF se clasifican en inulosacarinas ( $\beta$ 2-1) o levansacarinas ( $\beta$ 2-6). La levansacarina de *B. subtilis* (SacB), posee un sólo dominio estructural y es usada como modelo en diversos estudios debido a su robustez. Como en casi todas las FTFs los productos de la reacción de SacB son el resultado tanto de la actividad de hidrólisis como de la de formación de polímero. Por otro lado, existe una subfamilia de FTF multidominio identificadas en el género *Leuconostoc* con un dominio adicional (C-terminal) unido mediante una región conocida como de transición (TN). Se ha comprobado que al fusionar SacB con la TN de FTFs multidominio (1), es posible obtener una quimera -SacBTN- en la que se reduce significativamente la actividad hidrolítica. El objetivo del presente trabajo es analizar el efecto que tiene la fusión de la TN en la actividad y especificidad de productos en la enzima R433A, una mutante de SacB de menor actividad específica, que produce FOS y en menor medida polímero, además de ser altamente hidrolítica (2), y a su vez compararla con la fusión de la enzima silvestre SacBTN.

**Metodología.** Las quimeras R433ATN y SacBTN se recuperaron en forma de cuerpos de inclusión, los cuales se purificaron, solubilizaron y replegaron por dilución. La actividad enzimática global se midió por DNS. Para evaluar los productos de reacción se llevaron a cabo reacciones en buffer de fosfatos 50mM pH 6.5 a 37°C, 300 rpm, a un 80% de conversión de sacarosa. Las reacciones se evaluaron por TLC y HPLC incluyendo como controles las reacciones con SacB y R433A.

**Resultados** SacBTN (65KDa) tiene una act. específica global de 265.3 U/mg, 1.35 veces mayor que la de SacB (50 KDa). La actividad específica de R433ATN (65KDa) es de 98.1U/mg mientras que la de R433A (50KDa) es de 117.8U/mg, lo que no representa una diferencia significativa. La tasa de hidrólisis de SacBTN disminuyó

a tan solo 10% comparada con SacB, cuya tasa de hidrólisis es del 60%. En R433ATN se observó un efecto similar, puesto que la tasa de hidrólisis se redujo a un 61% en comparación con R433A que hidroliza el 94% de la sacarosa.

Al analizar los productos de reacción, encontramos que SacBTN sólo produce polímero de alto PM, a diferencia de SacB que produce polímero con una distribución bimodal con promedios de 8.3 y 3000 KDa. Por otro lado, la mayor capacidad de transferencia de R433ATN se debe a que la quimera “recuperó” la capacidad de síntesis de polímero de alto PM y no a un aumento en la síntesis de FOS.



**Fig. 1.** Perfil del polímero de SacB (—), SacBTN (----), R433A (-.-.-) y R433ATN. (.....). Condiciones de reacción: 0.5U/ml de act. enzimática, 37°C, 350 rpm, 16 horas, Sac 12%.

**Conclusiones.** En el caso de SacB, la adición de la región de transición aumentó la actividad específica de la enzima, mientras que en R433A no se observó este efecto. Por otro lado, tanto la quimera SacBTN como R433ATN presentan una menor tasa de hidrólisis en comparación con sus contrapartes unidominio. Además, el efecto de la TN no sólo se observa en la síntesis de polímero, sino que se modifica también el perfil de PM.

Las modificaciones estructurales inducidas por la fusión de la TN que tienen impacto en el mecanismo de reacción serán analizadas en la siguiente etapa de este proyecto.

**Agradecimiento.** Se agradece el financiamiento otorgado por CONACYT Ciencia Básica No. 81637.

### Bibliografía.

1. Centeno Leija, Olvera-Carranza y López-Munguía A. (2009). Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
2. Ortiz-Soto ME, Rivera M, Rudiño-Piñera E, Olvera C, López-Munguía A. (2008) *Protein Eng Des Sel.* 21(10):589-3.