

Identificación y caracterización de una nueva “Inulinsacarasa” de *Leuconostoc citreum*.

Vanesa Olivares-Illana, Clarita Olvera Carranza, Agustín López-Munguía.
Departamento de Bioingeniería.
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad No. 2001. Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62250, México.
Fax (73) 17-23-88, e-mail: vanesa@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Inulinsacarasa*, *L. citreum*, *sacarosa*

Introducción. Las fructosiltransferasas (Ftf) son enzimas que catalizan el traslado de un residuo fructosilo de la sacarosa hacia diversos aceptores. Estas enzimas son capaces de producir polímeros de fructosa, como las levanas producidas levansacarosas, que son Ftf de origen microbiano. Otro polímero de fructosa es la inulina producida por complejos enzimáticos en plantas. En el presente trabajo se reporta la identificación y caracterización de una nueva inulinsacarasa (IS) asociada a células que fue obtenida de una cepa de *Leuconostoc citreum* aislada del “pozol” una bebida de maíz, tradicional fermentada originaria del Sureste del país. Esta IS produce un polímero de fructosa que muestra un espectro de ¹³C-NMR muy similar a la inulina. Así mismo se reporta el aislamiento del gen que codifica para esta enzima para realizar estudios comparativos entre este y otros genes codificantes de fructosiltransferasas ya reportadas de otros microorganismos como *Bacillus* y *Streptococcus*.

Metodología. Se creció la cepa en medio con sacarosa y extracto de levadura a 30°C, a 200 rpm durante 8 a 10 horas. Se realizó el seguimiento del crecimiento celular midiendo D.O. a 650nm. Se realizó un tratamieto con Urea 8M para liberar proteínas de membrana (1) y así obtener a la enzima soluble. La reacción de síntesis de polímero se realizó a 30°C y pH 6.5 con 10% de sacarosa. Las reacciones de aceptor se realizaron con maltosa y lactosa como azúcares aceptores en las mismas condiciones. Los productos de estas reacciones se analizaron por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC). Se realizaron geles de electroforesis en condiciones desnaturizantes y geles de actividad glicosiltransferasa.

Resultados y Discusión. Se realizó un análisis de ¹³C-NMR del polímero producido por la IS asociada a células.

Tabla 1. Desplazamientos químicos para el espectro ¹³C-NMR de inulina, levana y el polisacárido producido por la cepa CW28 de *Leuconostoc citreum*.

Carbono	Desplazamientos químicos (ppm)		
	inulina ^a	PCW28	levana ^a
C-1	60.9	62.7	60.7
C-2	103.3	103.6	104.2
C-3	77.0	77.5	76.3

C-4	74.3	74.9	75.2
C-5	81.1	81.8	80.3
C-6	62.2	61.4	63.4

^a Shimamura et al. 1987 (2).

Las posiciones de los picos se compararon con los reportados en la literatura para la inulina y levana (tabla 1). Adicionalmente se trato el polímero producido por la cepa CW28 de *Leuconostoc citreum* con inulinasa, enzima que degrada enlaces β 1-2 y el polímero fue hidrolizado.

La IS de esta cepa tiene un peso molecular de 170 kDa, el mas alto reportado para estas enzimas los cuales varian desde los 40 a los 100kDa con excepción de la Ftf de *Streptococcus* que tienen pesos de 140 kDa.

Con el fin de obtener la secuencia del gen que codifica para esta IS, se secuenciaron dos péptidos de 13 y 15 aa a partir de la proteína purificada por electroforesis en gel de poliacrilamida. Con estos péptidos se diseñaron oligonucleótidos con los que se amplificó un fragmento de 3Kb a partir del DNA cromosomal de la cepa CW28. Este fragmento esta en curso de secuenciamiento y se utilizará como sonda para hibridar en librerías genómicas de CW28 *Leuconostoc citreum* construidas anteriormente.

Conclusiones. La Inulinsacarasa asociada a células de *Leuconostoc mesenteroides* presenta un peso molecular de 170 kDa, el más alto reportado para las fructosiltransferasas. Fue solubilizada mediante un tratamiento con urea y caracterizada tanto asociada a células como en solución, mostrando una alta especificidad para la síntesis de un polímero de fructosa tipo inulina, presentando baja producción de oligosacáridos en presencia de maltosa y lactosa cuando se encuentra libre de células. El pH óptimo para ambas formas de la enzima es de 6.5 mientras que cuando se encuentra asociada a células es mas estable a la temperatura. El gen será expresado y caracterizado en *E. coli*. Con la secuencias del gen se realizaron análisis comparativos con otras secuencias de glicosiltransferasas.

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por CONACyT No-118116. Asistencia técnica de T.L. Fernando González y M.C. Maria Elena Rodriguez. Al Dr. Mariano García Garibay de la UAM-I por proporcionarnos la inulinasa.

Bibliografia.

1. Hamada S., Koga T. 1989. Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan from serotype *c* *Streptococcus mutans*. *Journal of general microbiology*. **135**, 335-344.
2. Shimamura A, Tsuboi K, Nagase NT, Ito M, Tsumori H and Mukasa H. 1987. Structural determination of D-fructans from *Streptococcus mutans*, serotype *d,c,e*, and *f* strains, by ¹³C-NMR spectroscopy. *Carbohydr Res* 165: 150-154.