

Sobreproducción de dextranosa en *Leuconostoc mesenteroides* modificada genéticamente

Clarita Olvera Carranza., Aurelia Ocampo., 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: clarita@ibt.unam.mx

Palabras clave: *dextranosa*, *Leuconostoc*, *recombinantes*.

Introducción. Las glicosiltransferasas son enzimas que catalizan el traslado de un residuo glicosilo de una molécula donadora hacia diversos aceptores. Dentro de este grupo se encuentran las glucosiltransferasas como las dextranosas que transfieren un residuo glucosilo de la sacarosa a moléculas aceptoras con liberación de fructosa. El producto de la reacción es un polímero de alto peso molecular llamado dextrana compuesto por unidades de glucopiranosas con enlace a (1-6) en la cadena principal y ramificaciones variables que presentan enlaces a (1-3) a (1-4) a (1-6) o a (1-2). Adicionalmente a la síntesis de polisacáridos también catalizan reacciones de síntesis de oligosacáridos. El principal organismo productor de dextranosa es *L. mesenteroides*. El objetivo de este trabajo fue obtener cepas de *L. mesenteroides* capaces de sobreproducir dextranosa mediante modificaciones genéticas.

Metodología Las manipulaciones de DNA se llevaron a cabo según Maniatis, 1982. Las construcciones fueron introducidas a *L. mesenteroides* mediante electroporación. Las cepas fueron crecidas en medio MRS con eritromicina 5 µg/ml a 25°C sin agitación. Las determinaciones de actividad dextranosa fueron llevadas a cabo en sobrenadantes de cultivos crecidos en sacarosa y extracto de levadura a 25°C, sin agitación a una densidad óptica de 6 a (650nm). Las determinaciones de azúcares reductores se llevaron a cabo mediante DNS.

Resultados y Discusión. Debido a la falta de vectores capaces de replicarse en *L. mesenteroides* se llevó a cabo la construcción de herramientas moleculares para ser utilizadas en nuestro análisis. Empleamos el plásmido pGhost9::ISSI (1); fue capaz de replicarse en *L. mesenteroides*, este plásmido es utilizado para realizar mutagenesis al azar, contiene una región de inserción ISSI además de un origen de replicación termosensible. De este plásmido se tomó el origen de replicación, así como el cassette de resistencia a eritromicina para fusionarlo con el plásmido pBluescriptSK (vector de clonación en *E. coli*). La fusión de ambos plásmidos fue denominada pCOC14 (figura 1). Esta construcción contiene dos orígenes de replicación; así como dos cassettes de resistencia uno para *Leuconostoc mesenteroides* y otro para *E. coli*. El gen *dsrS* de 4.6 Kb, que codifica para la dextranosa de *L. mesenteroides* B512F fue tomado del plásmido pCGN1223 proporcionado por la compañía Calgene. Se subclonó un fragmento de 7 Kb que contiene el gen

dsrS en el plásmido pCOC14, esta nueva construcción se denominó pML159 (Figura 1).

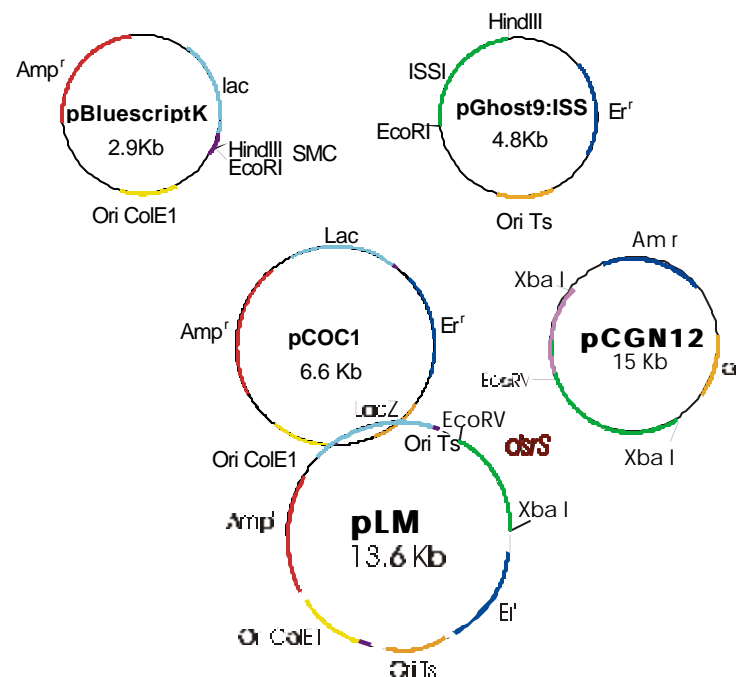


Figura 1. Construcción del vector utilizado en *Leuconostoc mesenteroides*

El pML159 se introdujo a *L. mesenteroides*. Se determinó la actividad enzimática a la cepa recombinante, en la cual se observó un aumento de un 55% en la producción de la dextranosa. Estudios sobre la estabilidad de estos plásmidos en *L. mesenteroides* se llevaron a cabo.

Conclusiones. Es posible la sobreproducción de la dextranosa en *L. mesenteroides* mediante aumento de dosis génica

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por el CONACyT proyectos No. 35535-B y 25281-B.

Bibliografía. 1. Maguin, E., Prevost, H., Ehrlich, D. & A. Gruss. 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram positive bacteria. *J. Bacteriol.* 178:931-935.