

Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa

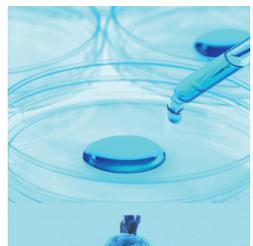
Clarita Olvera, Edmundo Castillo y Agustín López-Munguía

La fructosa es probablemente el azúcar de mayor impacto en la sociedad del siglo XXI, como antes la sacarosa (azúcar de caña). La fructosa, a la que muchos llaman erróneamente “fructuosa”, está presente en varias frutas (de ahí su nombre), es 40% más dulce que la sacarosa. La sacarosa está constituida por una molécula de fructosa y otra de glucosa, es decir, es un *disacárido* (figura 1).

A partir de la segunda mitad del siglo XX se introdujeron en la industria de alimentos los llamados jarabes fructosados o jarabes de fructosa, obtenidos del maíz por un proceso de extracción y transformación del almidón en glucosa, su unidad básica. Posteriormente, la glucosa es convertida en fructosa, en un proceso que da lugar a una mezcla de proporciones similares de ambos azúcares, conocida como *jarabes fructosados*. Hasta la fecha, estos jarabes han sustituido a la sacarosa en muchas de sus aplicaciones, particularmente como endulzante en los refrescos. Por otro lado, este proceso se ubica dentro de una nueva disciplina de la biotecnología, que consiste en el uso de enzimas microbianas a gran escala para hidrolizar primero al almidón en glucosa y posteriormente transformarlo en su isómero fructosa. Las enzimas son proteínas que tienen la función de

catalizar las reacciones biológicas, y son actualmente una de las más poderosas herramientas de la biología moderna y la base de un sector importante de la industria biotecnológica. Al ser proteínas, pueden ser producidas mediante las herramientas clásicas de la biología molecular (ingeniería genética), modificadas para hacerlas más eficientes (ingeniería de proteínas) y, una vez producidas, ser acondicionadas para formularse en un “biocatalizador” que pueda emplearse para llevar a cabo biotransformaciones a nivel industrial (ingeniería enzimática).

En los últimos años, el avance de la ciencia ha puesto en evidencia nuevos escenarios en los que la fructosa juega un papel central. En este sentido destacan las *fructanas*, nombre genérico que se da a compuestos constituidos de largas cadenas de moléculas de fructosa unidas químicamente, y que forman parte del reservorio energético de una amplia diversidad de plantas. En efecto, si bien el *almidón* es la forma más común en la que los cereales como el maíz, el trigo y el arroz, o tubérculos como la papa, la yuca o el camote, almacenan glucosa como fuente de carbono y energía (el almidón es un *glucano* constituido de largas cadenas de glucosa), otro amplio número de plantas (un 12% de las superiores), como la cebolla, el ajo,



1
2
3

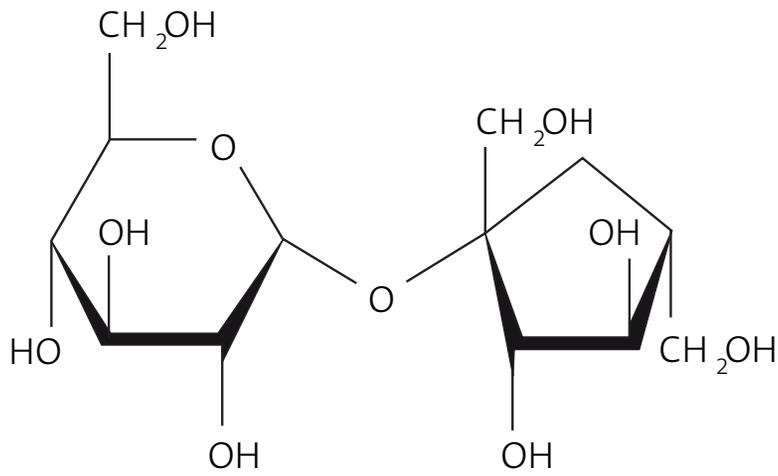


Figura 1.
Sacarosa o azúcar de caña.

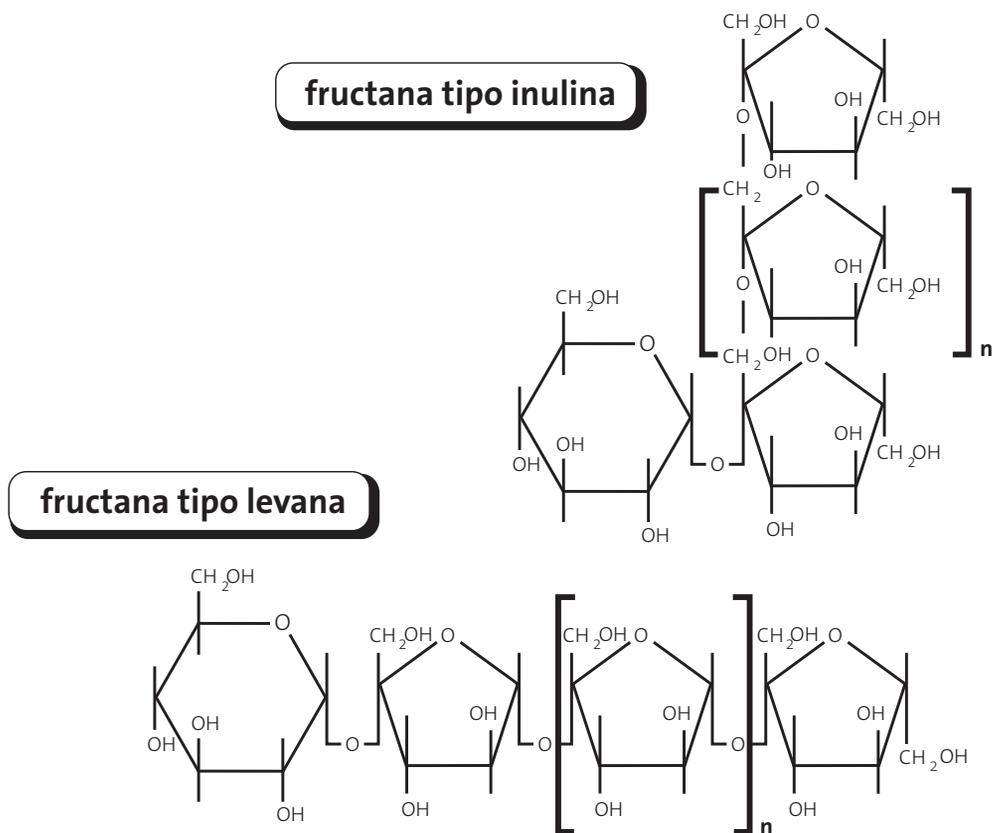


Figura 2.
Polímeros de fructosa sintetizados por inulosacarosas y levansacarosas.

la chicorea, la alcachofa o los agaves, lo hacen mediante la síntesis de *inulina*, o de *levana*, las dos fructanas más abundantes en la naturaleza. La inulina está ligada a una de nuestras más tradicionales industrias, la tequilera, ya que es abundante en las piñas maduras de agave; mediante la cocción de las piñas la inulina se hidroliza en fructosa para que pueda ser fermentada por las levaduras. Los polímeros de fructosa ocupan también un papel preponderante en la nutrición moderna, al haberse reconocido su función tanto de *fibra soluble* como de *prebiótico*, término con el que se denomina al “alimento especial” que beneficia a la microflora intestinal. Millones de hectáreas se siembran anualmente por todo el mundo con chicorea (una raíz parecida al camote) para extraer las más de un millón de toneladas de inulina que el mundo consume, ya sea en su forma original o hidrolizada en fructosa y oligosacáridos. Desde el lado negativo, se ha identificado igualmente la participación de fructanas en la estructura de la placa que se forma en la caries dental. Pero destaca de manera preponderante una amplia gama de aplicaciones potenciales médicas y alimentarias directamente asociadas con las fructanas o con moléculas modificadas con fructosa, *los fructósidos*, lo que ha dado un impulso a esta nueva actividad básica y aplicada que tiene como eje central a este azúcar.

La síntesis de fructanas no es exclusiva de las plantas ya que un buen número de microorganismos pueden llevarla a cabo. ¿Para qué les sirve la fructana a los microorganismos? La respuesta no está clara. Sin embargo, tanto plantas como microorganismos hacen intervenir enzimas del tipo de las *fructosiltransferasas* (FTF) para su síntesis, empleando sacarosa como materia prima para el proceso. Sobre las fructosiltransferasas se centra este capítulo y buena parte del trabajo de investigación de nuestro grupo.

¿Cómo son y cómo funcionan estos maravillosos catalizadores que permiten a plantas y microorganismos producir fructanas? ¿Para qué le sirven dichos polímeros a los microorganismos? ¿Cómo podemos utilizar estas en-

zimas para producir fructanas eficientemente o para obtener derivados con fructosa? ¿Qué aplicaciones podemos darles? En nuestro grupo de trabajo se llevan a cabo proyectos que giran al rededor de estas preguntas básicas, y a lo largo de este texto presentaremos algunas de nuestros modelos de trabajo, sus características y sus aplicaciones.

La fructosa y sus polímeros

Como señalamos, fructanas es el término genérico empleado para referirnos a los polímeros que contienen enlaces glicosídicos fructosa-fructosa en su estructura. Los investigadores usan con mucha frecuencia el término *glicósido* como sinónimo de azúcar. El número y naturaleza de los enlaces presentes en cada fructana establece importantes diferencias en sus propiedades. Cuando se tiene entre 2 y 10 moléculas de fructosa en la fructana hablamos de *oligo-sacáridos* o *fructo-oligo-sacáridos* (*sacárido* es otro sinónimo de azúcar), mientras que una fructana, propiamente dicha, es un polisacárido con más de 10 moléculas de fructosa en la cadena. En lo que al tipo de unión se refiere, hablamos de *levanas* cuando las fructosas se unen mediante enlaces β -2,6 (el segundo carbono de una fructosa con el sexto de la siguiente y así sucesivamente); ocasionalmente se presenta una ramificación cuando al carbono 1 de una fructosa se le agrega otra fructosa, enlazándose con su carbono 2 y creando así un enlace β -2,1 (**figura 2**). Por otra parte, las *inulinas* son polímeros con enlaces β -2,1 entre las fructosas, teniendo un número importante de ramificaciones β -2,6. Si bien las cadenas de fructanas de origen microbiano pueden llegar a tener hasta 100 000 unidades de fructosa, en plantas difícilmente superan las 150 unidades, es decir, son de bajo grado de polimerización.

En las plantas existen fructanas que se construyen a partir de la sacarosa, pero haciendo crecer la cadena tanto a partir de la fructosa como de la glucosa, ambas presentes en la molécula de sacarosa que la planta obtiene mediante la fotosíntesis. A éstas se les conoce

Tabla 1. Especies más representativas de vegetales productores de inulina.

Orden taxonómico	Especies representativas	Tipo de fructana	Observaciones
Asterales	<ul style="list-style-type: none"> • Chicorea (<i>Cichorium spp.</i>) • Tupinambos (<i>Helianthus tuberosus</i>) • Alcachofa común (<i>Cynara scolymus</i>) 	Inulina lineal con $\approx 95\%$ enlaces β -2,1	La alcachofa común produce la inulina más larga de origen vegetal, fructanas con más de 100 unidades de fructosa unidas linealmente
Asparagales o Liliales	<ul style="list-style-type: none"> • Cebolla (<i>Allium cepa</i>) • Espárrago (<i>Asparagus officinalis</i>) • Agaves (<i>Agave spp</i>) 	Neo-serie de inulinas, inicia cadena con fructosas unidas sobre C1 y C6 de la glucosa con enlaces β -2,1	Fructanas de origen vegetal de alta variabilidad estructural
Poales	<ul style="list-style-type: none"> • "Pasto ovillo" (<i>Dactylis glomerata</i>) • Trigo (<i>Triticum spp</i>) • Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>) • Avena (<i>Avena spp</i>) 	Levana lineal con $\approx 95\%$ enlaces β -2,6; levanas mezcladas en proporciones equivalentes de enlaces β -2,1 y β -2,6. Neo-serie de levanas, inicio de cadena con fructosas unidas sobre C1 y C6 de la glucosa con enlaces β -2,6	Orden taxonómico muy disperso formado por una gran variedad de especies. Fructanas de origen vegetal de alta variabilidad estructural

como *neo-series* y pueden ser de inulina o de levana, dependiendo del tipo de enlace de esta segunda cadena (figura 3).

Mediante el aislamiento y la caracterización bioquímica de las enzimas involucradas en los procesos de síntesis de fructanas de origen vegetal, se ha demostrado que, en las plantas, estos procesos se llevan a cabo mediante la acción concertada de al menos dos enzimas, como se verá más adelante. En una primera etapa, la enzima sacarosa-sacarosa fructosiltransferasas (SST) (EC 2.4.1.99) se encarga de iniciar el proceso al incorporar un residuo de fructosa a una molécula de sacarosa formando un trisacárido denominado 1-kestosa. En una segunda etapa, mediante la acción de un segundo grupo de enzimas del tipo fructosiltransferasas, se añaden más residuos de fructosa a los trisacáridos, dando lugar a fructanas de mayor peso molecular (figura 3).

Contrario a lo que sucede en las plantas, en la síntesis de fructanas por microorganismos interviene únicamente una enzima, fructosiltransferasa, que transfiere secuencialmente residuos fructosilo (provenientes de la sacarosa) a una molécula de sacarosa que funciona como iniciador. Dicha transferencia da lugar a las cadenas de inulina o levana que, como señalamos, alcanzan un elevado peso molecular (entre 10^5 y 10^6 Da). Las principales enzimas responsables de este pro-

ceso son la sacarosa-1F-fructosiltransferasa (inulosacarasa), en el caso de la inulina, y la sacarosa-6F-fructosiltransferasa (levansacarasa) en el caso de la levana (figura 4).

Dependiendo del contenido de mono y disacáridos, los fructooligosacáridos conservan un sabor más o menos dulce, contrario a las inulinas y las levanas que poseen un sabor neutro. La solubilidad de estos carbohidratos en medio acuoso está determinada por sus características estructurales; las fructanas más homogéneas resultan las menos solubles y las más ramificadas, las de mayor grado de solubilidad. De hecho, inulinas muy homogéneas tienden a formar arreglos cristalinos que se disuelven sólo a temperaturas superiores a los 50-80°C, aunque sean estables una vez disueltas.

Fructanas en el mundo vegetal

Al menos 40 000 especies de plantas almacenan fructanas en sus hojas, raíces, tubérculos o bulbos. Pero, ¿cuál es la ventaja de almacenar fructanas en lugar de almidones? Parece que una de las principales razones es que la síntesis de fructanas puede realizarse a temperaturas por debajo de los 12°C, mientras que a estas temperaturas el metabolismo del almidón es severamente inhibido. Además, las plantas pueden almacenar una mayor cantidad de fructanas, pues se sinte-

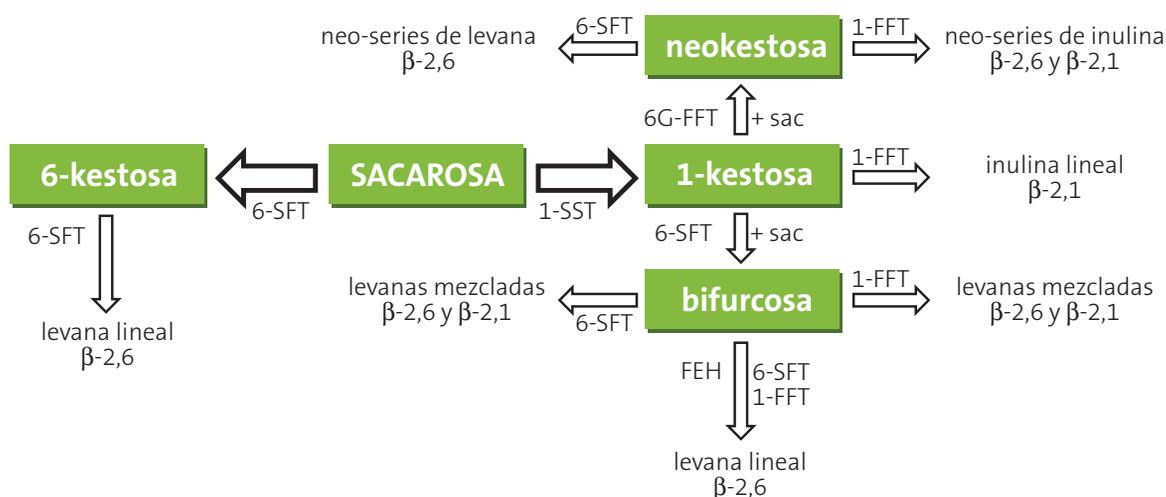


Figura 3.

Biosíntesis de fructanas en plantas. sac: sacarosa, 6-SFT: sacarosa-fructan-6-fructosiltransferasa, 1-SST: sacarosa-sacarosa-1-fructosiltransferasa, 1-FFT: fructan-fructan-1-fructosiltransferasa, 6G-FFT: fructan-fructan-6-glucosa-fructosiltransferasa.

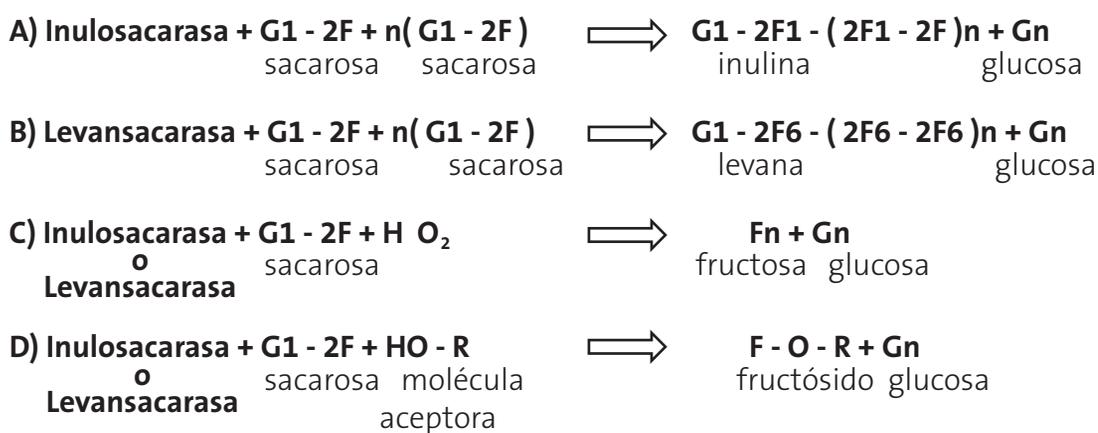


Figura 4.

Reacciones enzimáticas catalizadas por fructosiltransferasas: A) Síntesis de inulina. B) Síntesis de levana. C) Hidrólisis por transferencia a una molécula de agua. D) Síntesis de fructósidos por transferencia a un aceptor. G = glucosa, F = fructosa, R = aglicona.

tizan en las vacuolas que ocupan alrededor del 70% del volumen de las células. No obstante, tanto en climas fríos como en condiciones en donde la fotosíntesis es óptima, predominan las plantas que almacenan almidón. Así entonces, la cuestión es si se trata de un estado transitorio en la evolución, o son un tipo de plantas altamente especializadas. Su presencia se correlaciona con efectos muy variados, tales como la protección contra condiciones extremas de sequía o de bajas temperaturas. Se les ha señalado también como moléculas de señalización en el proceso de floración. Aun cuando en la actualidad los mecanismos de protección ejercidos por las fructanas no han sido bien descritos, se ha demostrado que tienen acción estabilizadora en membranas artificiales que han sido expuestas a secado por liofilización; de manera particular, este efecto se ha estudiado en la estabilización de arreglos membranales formados con moléculas de fosfatidilcolina.

Como se mencionó anteriormente, la naturaleza de las fructanas presentes en las plantas es particular a cada especie. De manera general, se sabe que las inulinas son características de especies dicotiledóneas, mientras que las levanas son más comunes en plantas monocotiledóneas. En la tabla 1 se incluyen algunas de las especies más representativas de vegetales productores de inulina.

Fructanas en el mundo microbiano

Una gran variedad de microorganismos es capaz de sintetizar fructanas, incluyendo patógenos de plantas y bacterias típicas de la flora bucal e intestinal de mamíferos. La función de las fructanas de origen bacteriano se asocia a la protección de las células contra la deshidratación, como auxiliar en los procesos de adhesión celular y, en el caso de algunos microorganismos patógenos, como barrera que previene a la bacteria invasora del reconocimiento del huésped.

Entre los microorganismos productores de fructanas destacan varias especies de bacterias Gram positivas, como algunas del género *Bacillus* incluidas *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. polymyxa*,

B. amyloliquefaciens o *Lactobacillus reuteri*. Los polímeros de fructosa son también producidos por bacterias Gram negativas, como *Zymomonas mobilis*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae pv glycinea*, *P. syringae pv phaseolicola* y *Acetobacter diazotrophicus*. Incluso géneros de mohos, tales como *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Calviceps*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Scopulariopsis* o *Saccharomyces* se han reportado como especies productoras de polímeros de fructosa. Cabe señalar que microorganismos propios de la flora bucal humana, como las bacterias del género *Streptococcus*, son productores de fructanas y están asociados al desarrollo de caries dental.

En general, los microorganismos producen fructanas del tipo levana (enlaces β -2,6), las cuales, aunque son poco ramificadas, llegan a presentar grados de polimerización por arriba de las 100 000 unidades de fructosa. Recientemente se han aislado bacterias lácticas como *L. reuteri*, *Streptococcus mutans* o *Leuconostoc citreum* (esta última en nuestro grupo de trabajo), con la capacidad de producir fructanas de tipo inulina. A diferencia de las fructanas de origen vegetal, las fructanas bacterianas son sintetizadas extracelularmente a partir de sacarosa mediante la acción de una sola enzima denominada fructansacarasa (FT), que puede ser del tipo levansacarasa o inulosacarasa. Es importante señalar que, además de su actividad fructosiltransferasa, muchas de estas FT son capaces de transferir unidades de fructosa a moléculas de agua (actividad hidrolasa) o a otro tipo de azúcares como la glucosa, fructosa o rafinosa.

Los polímeros de fructosa en la industria

Si bien desde los años treinta se conoce el potencial industrial de las fructanas al ser utilizadas en pruebas de funcionamiento de riñones humanos, en los últimos años su relevancia comercial se ha incrementado debido a los beneficios en la salud asociados con su consumo, y el papel que juegan en diversas industrias productoras de bebidas alcohólicas.

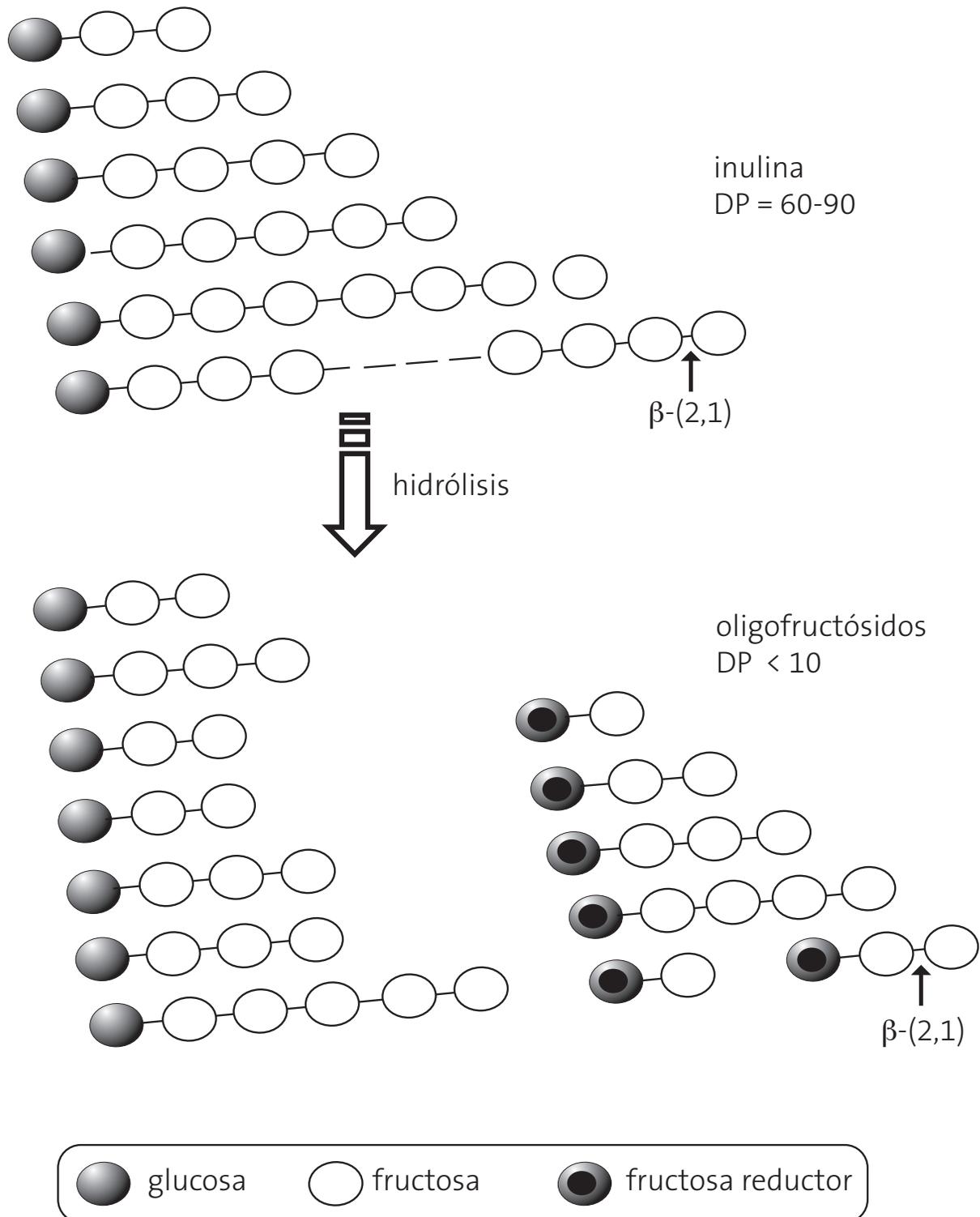


Figura 5.
Inulina lineal obtenida a partir de raíces de chicorea y sus productos de hidrólisis.

Fructanas mexicanas: el tequila, el pulque y el pozol

La producción de bebidas alcohólicas es uno de los sectores industriales más exitosos en el mundo. En el caso de México, si bien la bebida alcohólica emblemática es el tequila, la elaboración de otras bebidas tradicionales, como el pulque, el sotol y otros espirituosos como los mezcales, cubre una parte importante del mercado nacional. El común denominador de estas bebidas es que todas ellas se producen a partir de diferentes clases de agave, siendo las fructanas la fuente principal de azúcares fermentables presentes en estos vegetales. En las agaváceas existen diferencias interesantes en la estructura de sus fructanas que pueden ser, en buena parte, responsables de las diferencias que caracterizan a las bebidas que de ellas se derivan. En *Agave tequilana* y *Agave americana* se había reportado la presencia mayoritaria de fructanas tipo inulina lineal, mientras que en *Agave veracruz* la presencia de fructanas tipo levanas. En un estudio reciente, en el que se utilizaron técnicas de resonancia magnética nuclear, cromatografía de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas y espectrometría de masas de tiempo de vuelo acoplado a desorción/ionización por láser asistida por una matriz (MALDI-TOF) realizado en *Agave tequilana* se demostró que las fructanas de esta variedad no eran exclusivamente inulinas lineales, sino más bien una mezcla compleja de inulinas y levanas ramificadas. En lo que concierne al pulque, no se han realizado estudios para caracterizar a profundidad las fructanas presentes en los aguamiel del *Agave americana* que son utilizados como materia prima para su elaboración. Sin embargo, existen evidencias aportadas por nuestro grupo, de que diversas cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas del pulque también producen fructanas. Esta bacteria había estado asociada a la producción de glucanas (dextranas), a las que se asocia la textura “viscosa” del pulque; sin embargo, nuestros trabajos, y la publicación reciente del genoma de *Leuconostoc mesenteroides*, ponen de manifiesto la existencia de fructanas en este producto fermentado.

De la misma forma, en la microbiota láctica que participa en la fermentación del pozol (un producto tradicional fermentado de maíz del sur de México), hemos puesto en evidencia la presencia de fructosiltransferasas que, vía la síntesis de fructanas, podrían participar en los atributos nutricionales que caracterizan a estos productos.

La inulina

Los reportes recientes sobre los beneficios a la salud asociados al consumo de fructanas han incrementado de manera sustancial su popularidad como ingredientes alimentarios. De hecho, se estima que el consumo diario *per capita* de estos productos es de alrededor de 1 a 4 gramos en Estados Unidos y de 3 a 11 gramos en Europa, siendo las principales fuentes naturales el trigo, la miel, la cebolla, el ajo y los plátanos. A pesar de la presencia de fructanas en una gran variedad de especies vegetales, la principal fuente de inulina utilizada a nivel industrial es la raíz de chicorea. A partir de esta materia prima se obtienen mezclas de inulinas con grados de polimerización no mayores a 60-90 que tienen aplicación en alimentos funcionales. Posteriormente, estas inulinas pueden someterse a hidrólisis parcial para así obtener oligofructósidos o fructooligosacáridos, los cuales por definición tienen un grado de polimerización menor a 10 (figura 5).

Dado que la inulina obtenida de esta forma no es completamente hidrolizada a nivel de intestino delgado, tiene funciones de fibra dietética y se promueve como alimento de bajo contenido calórico (<2 kcal/g). Encuentra además aplicaciones como agente gelificante en formulaciones alimenticias, promotor de la incorporación de calcio al organismo o como prebiótico, al estimular el desarrollo de la flora bacteriana benéfica. Técnicamente, la inulina comercial estabiliza una proporción importante de agua (1 g/g) en formulaciones grasas y genera una textura cremosa lo que permite disminuir el contenido de grasa en la formulación y, en consecuencia, el contenido calorífico.

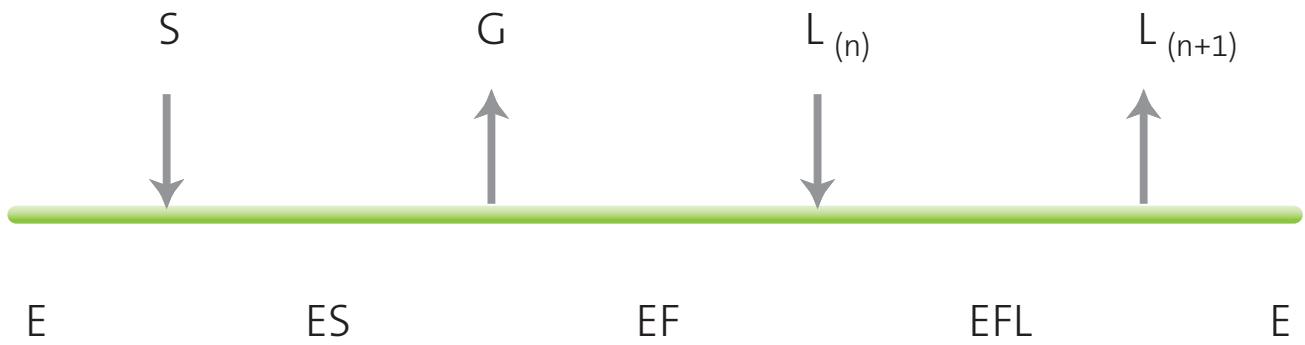


Figura 6.

Modelo del mecanismo Ping-Pong Bi-Bi (notación de Cleland) propuesto para la levansacarasa. E: enzima, S: sacarosa, G: glucosa, L: levana con n residuos de fructosa.

co. En cuanto a las preparaciones industriales de oligosacáridos, éstos contienen proporciones variables de sacarosa, glucosa y fructosa (5-40%), lo que les confiere cierto poder edulcorante, conservando los beneficios propios de la inulina, incluidas su digestibilidad y asimilación. El tamaño específico de los oligosacáridos proporciona además una solubilidad comparable a la de los mono- y disacáridos, pero con una mejor estabilidad térmica. Estas características evitan su cristalización y retardan el desarrollo de reacciones de obscurecimiento.

Fructooligosacáridos (FOS) como prebióticos

La importancia en la salud de la microflora bacteriana es uno de los descubrimientos de mayor impacto en la nutrición de los seres humanos en los últimos años. El intestino grueso contiene más de 500 diferentes tipos de bacterias, las cuales contribuyen a un número importante de funciones biológicas. El mantenimiento de un número balanceado de bacterias benéficas ayuda al control y disminución de bacterias patógenas en el tracto digestivo, entre muchos otros beneficios. Los *prebióticos* son ingredientes alimenticios no digeribles por las enzimas presentes en el tracto digestivo de la mayoría de los mamíferos, pero que al llegar al colon, estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad de la flora intestinal potencialmente saludable, acarreando beneficios tales como la estimulación del sistema inmunológico, la prevención de infecciones intestinales, la absorción de minerales y la disminución en la incidencia de cáncer colon-rectal, entre muchos otros. En consecuencia, el consumo de prebióticos contribuye a un ambiente intestinal sano. Estudios llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* con *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* y *B. angulatum* revelaron un aumento importante en su crecimiento cuando se utilizaron FOS de DP<41 y una disminución en las poblaciones de *Clostridia* y también en la producción de flatulencia. De hecho, al comparar en humanos sanos la ingestión diaria de bajas dosis de FOS (5 g/día) con placebos

ricos en sacarosa, se encontró la presencia de bifidobacterias un orden de magnitud por arriba de las cuentas microbianas normales. Entre los FOS claramente identificados con este efecto benéfico podemos encontrar a la kestosa y la neokestosa, presentes en diversas formulaciones de FOS provenientes de chicorea.

La caries dental

La caries dental es uno de los padecimientos de salud más comunes en todo el mundo. Una de las etapas críticas para el desarrollo de este padecimiento es la etapa de formación de la placa dental, que está constituida principalmente de polisacáridos poco solubles que actúan como soporte y adhesivo de una flora compleja de microorganismos: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.*, *Veillonella spp.* o *Actinomyces spp.*, entre otros. Se ha reportado ampliamente el papel que juega el *S. mutans* para fermentar la sacarosa y formar glucanos insolubles y acidez, condiciones adecuadas para el desarrollo de la placa dental. Algunas especies de *Streptococcus mutans* asociadas al desarrollo de caries dental producen igualmente una proporción importante de fructanas. Estudios estructurales recientes han demostrado que la fructana sintetizada por este microorganismo es una cadena ramificada de fructosas arregladas en forma de esfera, lo que dificulta el paso del solvente a través de ellas. Dicho arreglo estructural haría que estas fructanas se comportaran como un polímero poco soluble, como los polímeros de glucosa sintetizados por esta bacteria (mutanas).

Los fructósidos

Los glicósidos son compuestos que contienen un carbohidrato unido covalentemente a una molécula de naturaleza química diferente (no-carbohidrato), denominada *aglicona*. Estas moléculas se encuentran ampliamente distribuidas en los seres vivos y desempeñan, entre otras funciones, la señalización o la protección de moléculas reactivas. Las aplicaciones de los glicósidos en el área industrial incluyen su uso

como emulsificantes, dada su naturaleza anfílica, así como acarreadores en formulaciones antitumorales y/o como medicamentos relacionados con enfermedades cardiovasculares. El mayor interés por el empleo de moléculas glicosiladas en medicamentos radica en la posibilidad de mejorar las propiedades farmacocinéticas del producto.

En la actualidad, la principal ruta de síntesis química para los compuestos glicosilados resulta muy poco atractiva debido a la alta sensibilidad química de los azúcares, lo que trae como consecuencia la necesidad de protección y desprotección de los sustratos y productos. Aunado a esto, la mayoría de los catalizadores químicos empleados son tóxicos y poco específicos, lo que limita su aplicación en la industria farmacéutica y de alimentos. Alternativamente, la creciente incidencia de la biocatálisis en diferentes procesos de síntesis química ha abierto la posibilidad del desarrollo de procesos alternativos selectivos, eficientes y menos agresivos. Dentro de las enzimas de uso potencial para el proceso de glicosilación de moléculas, destacan las glicosiltransferasas y de ellas las FTF. En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que algunas glicosiltransferasas son estables en solventes orgánicos, lo cual, además de favorecer la reacción de transferencia hacia polímero, disminuye considerablemente la reacción lateral de hidrólisis (**esquema 1**). Este hecho abre la posibilidad de emplearlas en la formación de glicósidos de moléculas hidrofóbicas de interés en la industria farmacéutica. Nuestro grupo ha demostrado que esta reacción es viable aplicando la levansacarasa de *B. subtilis* para fructosilar polifenoles, compuestos hidrofóbicos que han cobrado importancia gracias a sus propiedades antioxidantes y cuyas propiedades farmacocinéticas podrían ser mejoradas mediante la glicosilación.

Estructura y función de las fructosiltransferasas

Como hemos visto hasta ahora, la síntesis y la degradación de fructanas es de gran importancia en diversos sectores industriales. Nuestro

grupo ha estudiado de manera específica algunas de las enzimas involucradas en la síntesis. Algunos elementos generales de estas enzimas serán descritos a continuación.

La reacción

En presencia de sacarosa, y dependiendo de las condiciones de reacción, las fructosiltransferasas son capaces de realizar varias reacciones: pueden sintetizar un polímero, transfiriendo la fructosa a las cadenas que van creciendo, o bien, pueden hidrolizar la sacarosa (**esquema 1**). Cuando se agrega una molécula ajena al medio de reacción, molécula a la que denominaremos “aceptor”, la enzima puede transferirle también fructosa, dando lugar a la molécula fructosilada, es decir, un “fructósido”. Una propuesta sobre el mecanismo de reacción de estas enzimas fue planteada por Chambert y Treboul, quienes sugieren, a partir de estudios cinéticos en velocidad inicial, que el comportamiento es del tipo “Ping-Pong Bi-Bi” (**figura 6**). En éste se plantea que la enzima y la sacarosa forman un intermediario enzima-fructosa (Ping), y se libera la glucosa (Pong), este complejo interacciona, por ejemplo, con una molécula de agua (Ping) y la fructosa es entonces transferida liberando un segundo producto: la fructosa (Pong). Este segundo producto puede ser la cadena de fructosas que crece o el fructósido. Es de hacer notar que cuando el segundo sustrato es la cadena de fructosas (como se muestra en el **figura 6**), el producto es la misma cadena adicionada de una molécula de fructosa.

La enzima

Las fructosiltransferasas bacterianas en general tienen pesos moleculares entre 45 y 64 kDa, aunque las producidas por bacterias ácido lácticas suelen tener pesos moleculares superiores (de 80 a 170 kDa). La mayoría de estas enzimas son extracelulares, es decir, son secretadas al medio de cultivo cuando crecen las bacterias; otras se quedan asociadas a la pared

celular. En uno de los extremos de la cadena de proteína (el amino) cuentan con un dominio (un segmento de estructura claramente definida) con un plegamiento conocido como del tipo “ β -propela”, que es el sitio donde se lleva a cabo la catálisis. En algunos casos, en el otro extremo de la cadena de proteína (el carboxilo) se encuentra una región cuya función no se ha definido del todo, y hemos demostrado que, en algunos casos, puede servirle para anclarse a la pared celular. Éste es un tema de investigación de varios grupos en el mundo, incluido el nuestro. Debido a su estructura y actividad, las FTF bacterianas han sido clasificadas dentro de la familia 68 de las glicósido-hidrolasas. Se trata de una clasificación de las enzimas basada en su estructura tridimensional obtenida una vez que la enzima logra ser cristalizada. Recientemente fue reportada la estructura cristalográfica de la levansacarasa de *Bacillus subtilis*, la primera de esta familia: esta enzima presenta una estructura de tipo β -propela con cinco “hojas” que adopta una topología en “W” de cuatro hebras β -antiparalelas como puede observarse en la **figura 7**, donde también alcanza a apreciarse una cavidad central en forma de embudo. Una vez obtenida la estructura en tres dimensiones, es posible ubicar detalles muy finos, como puede ser el sitio en el que la enzima fija una molécula de calcio que necesita para mantenerse estable.

La FTF de plantas tienen un peso molecular promedio de 70 kDa y, según análisis de modelamiento con la fructan 1-exohidrolasa de *Chicorium intybus*, parecen estar constituidas por dos dominios: el dominio catalítico, con nuestro ya conocido plegamiento del tipo β -propela, como las FTF bacterianas, pero en este caso seguido de un segundo dominio que tiene un plegamiento denominado del “tipo β -sandwich”. Al observar la **figura 8** es posible reflexionar no sólo sobre cómo es esta enzima, sino también sobre la manera en que los cristalógrafos miran a estas estructuras. ¿Para que le sirve este segundo dominio a las FTF de las plantas? No lo sabemos, pero si podemos afirmar que lo necesitan, pues si se les elimina, usando las herra-

mientas de la biología molecular, se quedan sin actividad catalítica. Este modelo corresponde al de una enzima cuyo gen aislamos del agave, y es el primero que se describe de esta importante planta de nuestra agroindustria.

Las fructosiltransferasas de mohos tienen un rango de peso molecular entre 60 y 75 kDa, aunque se han reportado algunas más grandes. En las FTF de mohos y plantas se reconocen seis regiones muy parecidas (se dice conservadas), en tres de las cuales se ubican los posibles amino ácidos que están implicados en la catálisis: una de estas regiones permite a la enzima unirse a la sacarosa (se le denomina “caja de sacarosa”). Curiosamente, dada la similitud entre la estructura de estas enzimas (las FTF de mohos y plantas) y la de las enzimas que hidrolizan sacarosa (invertasa) y otros fructósidos, están clasificadas dentro de la familia 32 de las glicósido hidrolasas. Parte del trabajo que se realiza con estas enzimas consiste en encontrar las similitudes y diferencias entre las que catalizan la misma reacción, pero en diferentes sistemas: bacterias, mohos o plantas.

El mecanismo

Gracias a la reciente obtención de la estructura cristalográfica de la levansacarasa de *Bacillus subtilis*, el mecanismo bioquímico utilizado por estas enzimas ha sido mejor comprendido. En medio de la β -propela, que como ya dijimos constituye el dominio catalítico, se encuentran dos aminoácidos muy importantes: un ácido aspártico en la posición 86 y otro en la 247 (D86 y D247), siguiendo la numeración de los aminoácidos de la proteína de *B. subtilis*, y un glutámico en la posición 342 (E342), todos ellos implicados en la catálisis. Como ya señalamos al describir la reacción, ésta se lleva en dos pasos: la sacarosa (glucosa-fructosa) entra al sitio activo, interacciona con él, y se forma un enlace covalente entre la fructosa y la enzima; pues bien, ahora se sabe que este enlace es con el aspártico 86, siendo así que la enzima “amarra” covalentemente a la fructosa. En el segundo paso, una nueva molécula de sacarosa se aco-

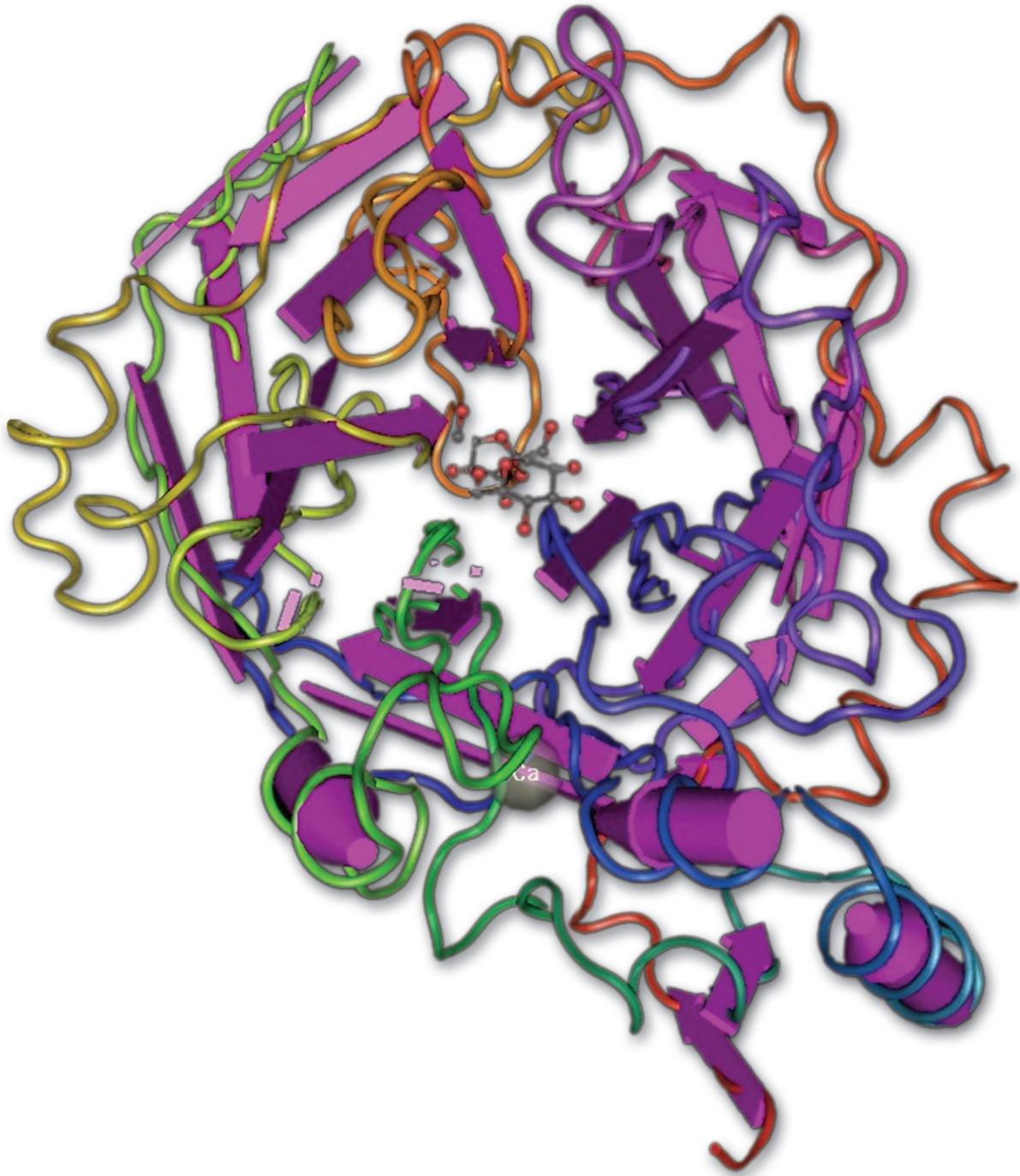


Figura 7.
Estructura de la levansacarasa de *Bacillus subtilis*. La molécula de sacarosa (en gris y rojo), así como el ión Ca, se ven representados en la estructura.

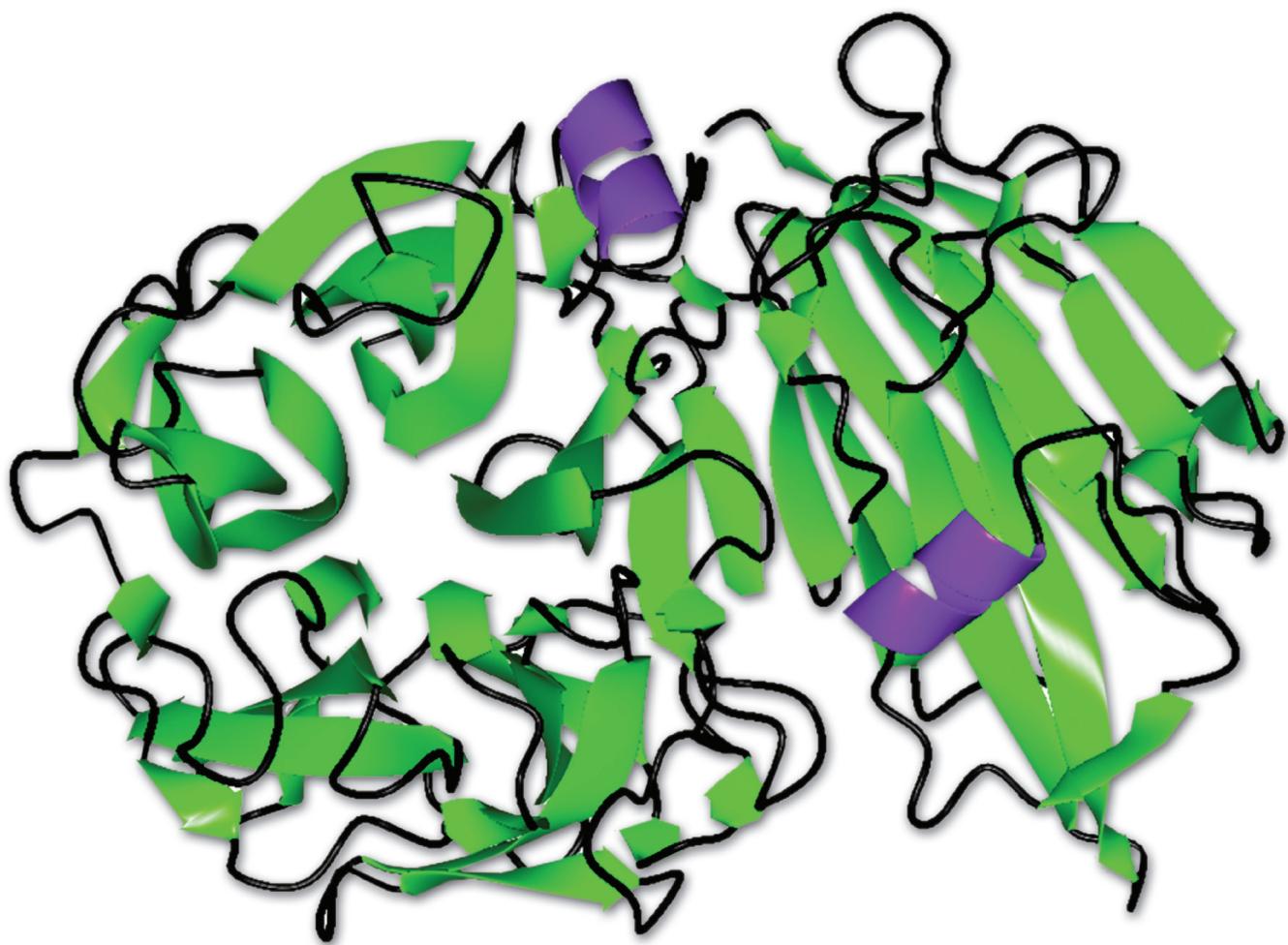


Figura 8.
Modelamiento de la 1-SST de *Agave tequilana* Weber var. Azul basado en la estructura cristalográfica de la 1-exo-hidrolasa de *Chicorium intybus*, llevado a cabo en nuestro grupo.

pla al sitio activo, en el sitio donde antes se encontraba la glucosa: la fructosa unida a D86 es entonces transferida. Se sabe que el aspártico 247 estabiliza el estado de transición entre estos dos pasos. En la **figura 9** intentamos ilustrar estas interacciones.

Biología molecular de las fructosiltransferasas: genes

Se conocen muchos genes que, en diversas especies, son responsables de la actividad enzimática que permite hacer fructanas. Sólo de bacterias Gram negativas se han reportado más de 30 secuencias, entre las que destacan las presentes en los géneros *Pseudomonas*, *Zymomonas*, *Rahnella*, *Burkholderia*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Sphingomonas* y *Erwinia*, entre otras. Todos los genes presentes en estas bacterias codifican para levansacarinas y presentan propiedades físicas y catalíticas similares (masa molecular 50-52 kDa, pl ~ 5, actividad óptima a pH 6 y temperatura de 30-40°C). El número de genes identificados en bacterias Gram positivas es mucho menor y todas las FTF reportadas pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Paenobacillus*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. El gen *sacB* de *Bacillus subtilis* codifica para la levansacarasa de 473 aminoácidos (52.9 kDa; pl 5.61), que en un inicio queda asociada a la membrana citoplasmática.

En bacterias Gram positivas se han reportado tanto levansacarinas como inulosacarinas; en algunos casos ambos genes se encuentran en el mismo microorganismo, lo que genera una gran interrogante: ¿para qué quiere un microorganismo polímeros tanto de glucosa como de fructosa? Aunque es probable que su función sea a nivel fisiológico, probablemente contribuyendo a una mejor adaptación a su nicho ecológico, aún no hay una respuesta contundente.

En este aspecto, las FTF de mohos han sido poco estudiadas, a pesar de la gran importancia que tienen en la industria. Únicamente se han reportado los genes de la FTF de *Aspergillus sydowi* y de *Aspergillus foetidus*. En el genoma de *A. foetidus* existe una única copia del gene

para la FTF y codifica para una proteína precursora de 537 aa (59.1 kDa). La FTF deducida presenta regiones conservadas con diferentes β -fructofuranosidasas, pero dentro de ellas comparte mayor homología con levansasas, a pesar de no poseer actividad hidrolítica sobre levana.

En el caso de las plantas, hasta el momento se ha aislado un alto número de genes que codifican para las FTF, por ejemplo once genes en total para la 1-SST de *Allium cepa* (cebolla), *Allium sativum* (ajo), *Chicorium intybus* (chicoreia), *Cynara scolymus* (alcachofa), *Triticum aestivum* (trigo), entre otras plantas. Por otro lado, únicamente se han reportados siete genes que codifican para 1-FFT en *Lolium perenne*, *Chicorium intybus*, *Cynara scolymus*, *Bellis perennis*, entre otras. Sin embargo, se han reportado alrededor de 28 genes que codifican para 6-SFT en los géneros *Chicorium*, *Cynara*, *Festuca*, *Helianthus*, *Lolium*, *Festuca*, entre otros.

Como ya señalamos, recientemente en nuestro grupo de trabajo se aisló un gene de 1863 pares de bases (pb) que codifica para la 1-SST de *Agave tequilana* Weber var. Azul. El gene codifica para una proteína 621 aminoácidos y presenta las secuencias conservadas típicas de las enzimas que pertenecen a la familia 32 de las glicósido hidrolasas

Relación estructura función

En estudios de estructura-función realizado con la levansacarasa de *Z. mobilis*, se encontró que uno de los aminoácidos catalíticos está involucrado únicamente en la hidrólisis de la sacarosa, ya que su modificación disminuyó la velocidad de hidrólisis cerca de 200 veces, sin que se afectara la velocidad con que se produce el polímero. Además, se encontró que una histidina, ubicada en la posición 296, es crucial para la reacción de transferencia de la fructosa, ya que su alteración no modificó la reacción de hidrólisis y sí la de polimerización. Se piensa, a raíz de observaciones de la estructura cristalográfica de la LS de *B. subtilis*, que la carga positiva de estos aminoácidos funciona como "ancla" de la molécula aceptora, posicionándola hacia los aminoácidos

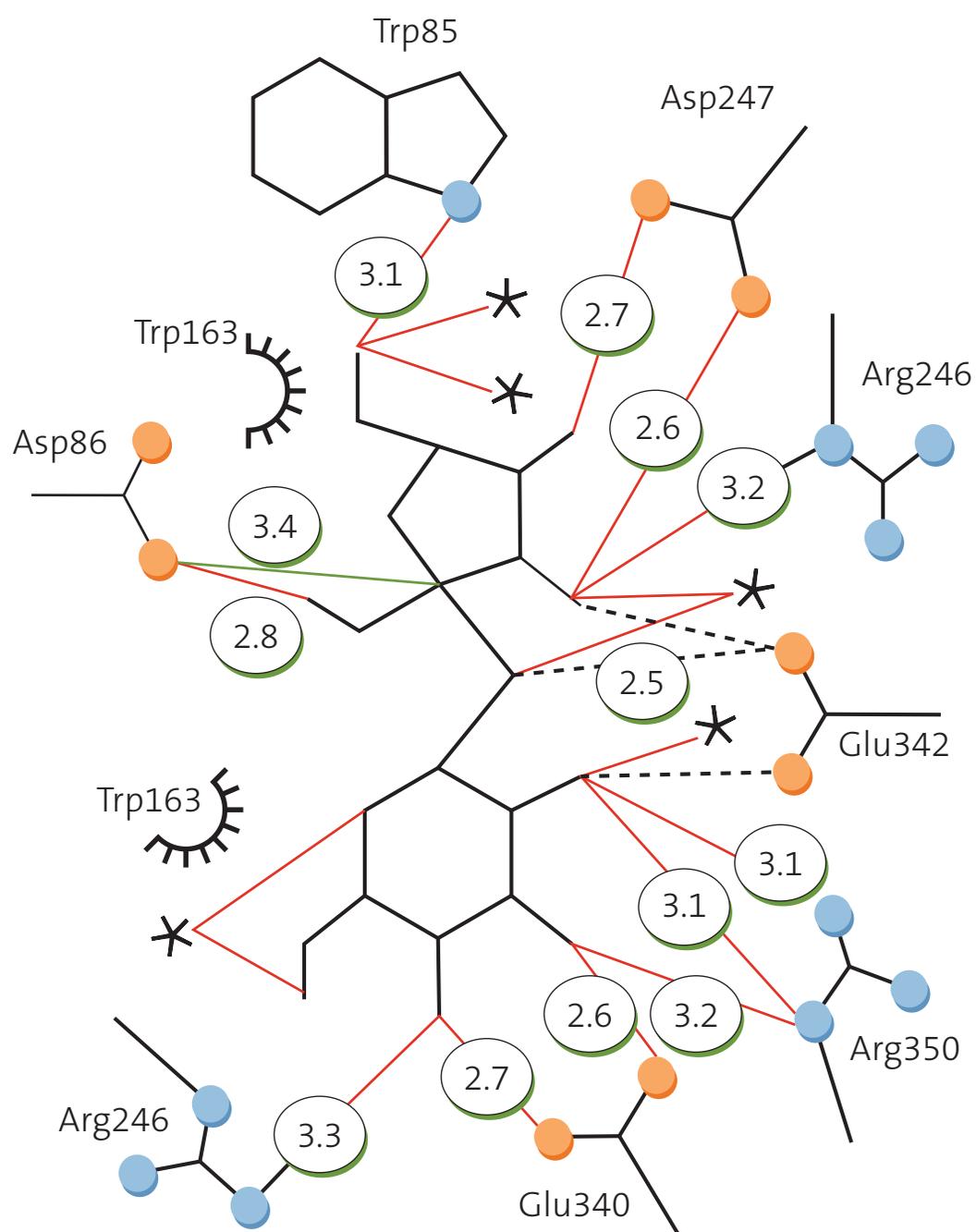


Figura 9. Distancia y contactos entre la enzima y la sacarosa basados en la estructura cristalográfica de la levansacarasa enlazada al sustrato.

catalíticos, originando así la transfructosilación. Por esta razón, su mutación evita que el fructooligosacárido (FOS) recién formado pueda actuar como molécula aceptora, formando así únicamente oligosacáridos de DP3. Esta conclusión es importante pues, como señalamos en la introducción, existe un interés especial por los FOS que tienen función de prebiótico.

Una nueva familia

Recientemente nuestro grupo identificó una nueva subfamilia de las FTF en el género *Leuconostoc*. Como si algún distintivo debiesen llevar las enzimas relacionadas con nuestra cultura, encontramos algo extraño cuando estudiamos la enzima inulosacarasa (IsIA) producida por *Leuconostoc citreum* CW28, una bacteria aislada del Pozol, producto de la cultura maya y, hasta la fecha, una de las bebidas fermentadas no alcohólicas más populares en el sur de México. Esta enzima es una FTF asociada a pared celular, pero muy grande: tiene un peso molecular de 165KDa, el más alto reportado hasta el momento para este tipo de enzimas. Al aislar el gene, encontramos, mediante el análisis de su secuencia, que esta FTF posee tres dominios: el dominio N-terminal muy parecido (identidad del 40%) con una glucosiltransferasa de otra cepa de *Leuconostoc mesenteroides* (la cepa NRRL 1355); el dominio C-terminal, también con una similitud del 80% con la región C-terminal de la cepa antes mencionada, dominio conocido como de unión a polímero (GBD); y finalmente el dominio catalítico, ése sí, con alta identidad con las levansacarases ya descritas de *Bacillus subtilis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Erwinia amylovora* y *Ranheella aquatilis*. La dualidad de las características de esta enzima, tanto para FTF como con GTF, sugiere que se trata de una proteína mosaico (por no llamarle un monstruo), resultado de la inclusión de una FTF dentro de una GTF.

Posteriormente, encontramos el gene que codifica para la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides* B512F, con un tamaño de 113 kDa. La estructura primaria de la proteína

presenta un patrón similar a las inulosacarases: una región variable en el amino terminal con identidad con la dextransacarasa (glucosiltransferasa) de *Leuconostoc mesenteroides*, un dominio catalítico con alta identidad con las FTF de las especies de *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* y, finalmente, la región carboxilo terminal con parecido al GBD de algunas especies de *Streptococcus* y *Leuconostoc*. Por si esto no fuera interesante, cuando se publicó el análisis de la secuencia del genoma de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293, identificamos la existencia de otras dos FTF con homología a LevS, las cuales denominamos LevC y LevL. Curiosamente, estas dos proteínas tienen una distribución en su estructura primaria tanto de FTF como de GTF, como se muestra en la **figura 10**. Con base en estos elementos, llegamos a la conclusión de que habíamos descubierto una nueva subfamilia de FTF con una estructura que combinaba características tanto de GTF como de FTF.

El futuro

Después de haber identificado esta nueva subfamilia de proteínas mosaico con características combinadas de FTF y GTF, surge un sinnúmero de interrogantes: ¿cuál es la función de estos dominios adicionales en estas enzimas? ¿Qué sucede si se eliminan?, y para un grupo de investigación aplicada como el nuestro: ¿Qué ventajas podemos aprovechar de este fenómeno en la aplicación de fructanas y fructósidos en la industria? Para responder estos cuestionamientos nos hemos dado a la tarea de expresar diferentes formas de la inulosacarasa, eliminando el C-terminal y N-terminal del gene *isIA*. Estas mutantes retienen la capacidad de sintetizar inulina, pero pierden estabilidad; aunado a esto, aumenta la hidrólisis de la sacarosa, disminuyendo la transferencia de la fructosa al polímero, lo que sugiere la hipótesis de que la presencia de los dominios adicionales incrementa la estabilidad y reduce la transferencia de los residuos glicosílicos al agua, favoreciendo la actividad de síntesis de la inuli-

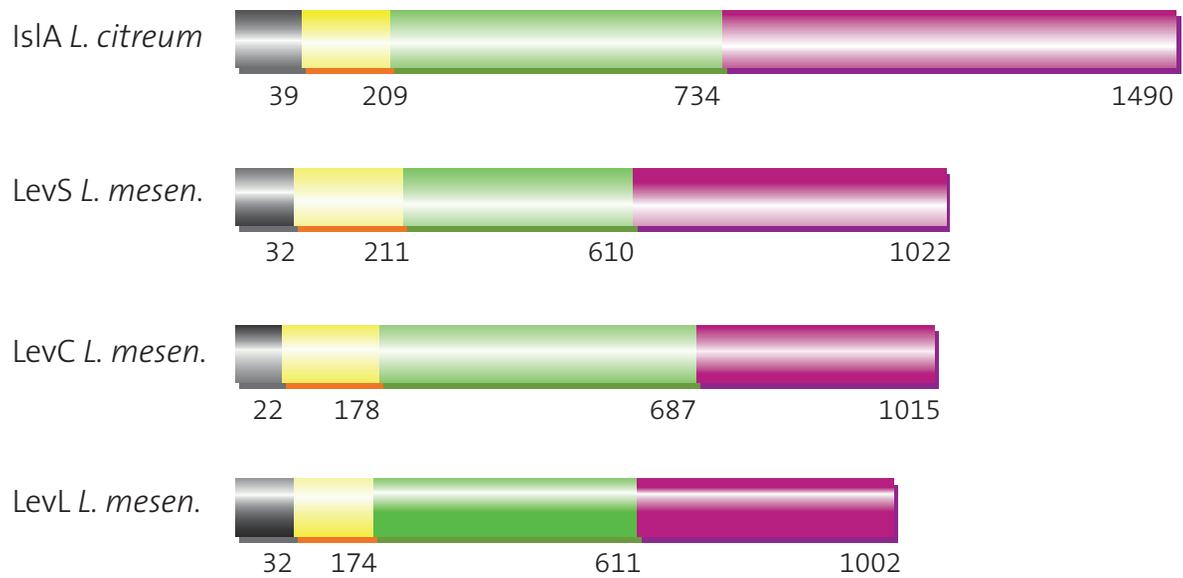


Figura 10. Estructura de la subfamilia de las fructosiltransferasas de *Leuconostoc mesenteroides* (la zona en verde es similar a la de todas las FTF, mientras que las restantes son características de GTF).

na, probablemente por el acceso limitante del agua al dominio catalítico. Actualmente realizamos mutaciones-sitio dirigidas en los genes de estas enzimas, con el fin de obtener variantes que presenten ventajas para su aplicación en la industria: estabilidad, eficiencia catalítica, especificidad y capacidad para formar biocatalizadores, entre otras. ●

Bibliografía

- López, M. G., N. A. Mancilla-Margalli y G. Mendoza-Díaz, "Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul", en *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2003.
- Meng G. y K. Fütterer, "Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase", en *Nature Structural Biology*, 10, 2003.
- Morales-Arrieta, S. *et al.*, "Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F", en *Gene*, 376, 2006.
- Olivares-Illana, V., A. López-Munguía y C. Olvera, "Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferase", en *J. Bacteriol.*, 185, 2003.
- Olvera, C., S. Centeno-Leija y A. López-Munguía, *Structural and functional features of fructansucrases present in Leuconostoc mesenteroides ATCC 8293*, Antonie Van Leeuwenhoek, en prensa, 2006.
- Pérez, M. y A. López-Munguía, "Properties of levansucrase from *Bacillus circulans*", en *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 1996.
- Ritsema, T. y S. Smeekens, "Fructans: beneficial for plants and humans", en *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 2003.
- Roberfroid, M. B. y N. M. Delzenne, "Dietary fructans", en *Annu. Rev. Nutr.*, 18, 1998.
- Sangeetha, P. T., M. N. Ramesh y S. G. Prapulla, "Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides", en *Trends in Food Science and Technology*, 16, 2005.
- Steinberg, D. *et al.*, "Regulation of fructosyltransferase activity by carbohydrates, in solution and immobilized on hydroxyapatite surfaces", en *Carbohydrate Research*, 337, 2002.
- Van Hijum, S. A. *et al.*, "Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria", en *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70, 2006.
- Vijn, I. y S. Smeekens, "Fructan more than a reserve carbohydrate?", en *Plant Physiol.*, 120, 1999.
- Wolff, D. *et al.*, "Globular shape of high molar mass inulin revealed by static light scattering and viscometry", en *Polymer*, 41, 2000.
- Won Yun, J., "Fructooligosaccharides. Occurrence, preparation and application", en *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 1996.

