



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la levansacarasa SacB y la endolevanasa LevB<sub>1</sub> para el diseño de un sistema simultáneo de producción de fructooligosacáridos a partir de sacarosa.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. C. Jaime Ricardo Porras Domínguez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Agustín López Munguía Canales

Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dra. Claudia Díaz Camino.

Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dr. Miquel Gimeno Seco.

Facultad de Química, UNAM.

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

Facultad de Química, UNAM.

Dr. Daniel Genaro Segura González.

Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca Morelos

mayo 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Enzimas del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía Canales y la asesoría técnica de la M.C. María Elena Rodríguez Alegría.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca No. 339186 y por el apoyo económico otorgado por la UNAM a través del proyecto DGAPA/PAPIIT/UNAM IT200316 y por el proyecto FONCICYT-BMBF-267620.

## Dedicatorias

A mi madre, gracias por todo el apoyo que me has brindado en toda mi vida, por todos tus consejos y siempre creer en mí. Recuerdo que desde pequeño siempre te decía que quería ser Doctor, con un doctorado en algo de física, química o matemáticas, obviamente no tenía la más remota idea de lo que significaba eso. Yo sólo tenía la idea de estudiar y estudiar, de superarme, de saber más. Pues bien, por fin lo logré, gracias a ti mamá.

A mi hijo, Bastian Porras, mi felicidad. Aunque cuando fue escrito esto no sabías leer en algunos años lo estarás haciendo y sabrás que cada sonrisa tuya y que cada “papito te amo” que me decías me dieron la motivación necesaria para culminar mis estudios. Espero que todo esto te sirva de ejemplo, de lo que puedes llegar a lograr cuando te apasiona algo, que luches por tus sueños y que nunca te rindas. Siempre estaré contigo para apoyarte y verte feliz. Te amo hijo.



A mis hermanos Karen y Daniel quienes siempre me han mostrado su apoyo.

A mi amigo, carnal y hermano, Icken quien desde el otro lado del océano siempre me estuvo dando ánimos.

A mi amiga Maira que siempre estuvo ahí para escucharme, aconsejarme y brindarme su amistad.

A mi buen amigo Francisco por dejarse molestar y hacer más amena mi estancia en el IBT.

A mi amigo Carlos por abrirme las puertas de su casa.

# Agradecimientos

Al Dr. Agustín López Munguía, tutor y amigo, que durante casi 8 años me ha dejado un sin número de enseñanzas, consejos y oportunidades que me han permitido crecer enormemente de manera personal y profesional. Gracias.

A la M.C. María Elena Rodríguez Alegría, compañera y amiga, por todo el apoyo, consejos y por formar parte de un gran equipo de trabajo.

Al Dr. Alfonso Miranda por su ayuda en la resolución de estructuras por RMN, así como por su apoyo en el desarrollo del método de purificación de fructooligosacáridos.

A la Dra. Angela Ávila por sus consejos y aportaciones al proyecto.

A Fernando González Muñoz por el soporte técnico en el uso de los equipos empleados durante esta investigación.

A Aurelia Ocampo por todo su apoyo en la preparación de medios de cultivo, soluciones y resto de material de laboratorio.

Al Dr. Edmundo Castillo por sus consejos y apoyo en el desarrollo de la metodología para la purificación de los fructooligosacáridos.

A Mario Trejo y Martín Patiño por el apoyo y consejos en cuanto a los procedimientos administrativos para la obtención de la patente.

A la Dra. Clarita Olvera Carranza y al Dr. Rubén Paul Gaytán Colin por el apoyo en el diseño de la enzima de fusión.

A la Dra. Romina Rodríguez Sanoja y a la Dra Gloria Saab por todos sus consejos durante el desarrollo de este proyecto.

# Índice

|  |      |
|--|------|
| Índice de Figuras.....   | viii |
| Índice de Tablas .....   | xiv  |
| 1.- Resumen.....   | 1    |
| 2.- Introducción .....   | 3    |
| 2.1 Fructanas .....  | 3    |
| 2.2 Síntesis de Fructanas .....  | 5    |
| 2.3 Mecanismo de reacción de las FTFs .....  | 6    |
| 3. Antecedentes.....   | 8    |
| 3.1.-Levansacarasa de <i>B. subtilis</i> .....   | 8    |
| 3.1.1 Influencia del mecanismo de la reacción en el perfil de productos de la levansacarasa SacB. .... | 9    |
| 3.2    Endolevanasa .....  | 12   |
| 3.3 Antecedentes de sistemas bi-enzimáticos para la síntesis de oligosacáridos. ....                   | 13   |
| 3.4 Enzimas de fusión .....  | 15   |
| 4.- Hipótesis.....   | 18   |
| 5.- Objetivos.....   | 18   |
| 5.1.- Objetivo principal .....   | 18   |
| 5.2.- Objetivos secundarios .....  | 18   |
| 6.    Estrategia experimental .....  | 20   |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 7.     | Materiales y Métodos.....  | 21 |
| 7.1    | Expresión de LevB <sub>1</sub> .....   | 21 |
| 7.2    | Purificación LevB <sub>1</sub> .....   | 21 |
| 7.3    | Expresión de SacB. ....  | 21 |
| 7.4    | Purificación de SacB. ....   | 22 |
| 7.5    | Medición de actividades de SacB y LevB <sub>1</sub> . ....   | 22 |
| 7.6    | Cuantificación de fructosa, glucosa y sacarosa por HPLC.....   | 23 |
| 7.7    | Perfil de productos por cromatografía de intercambio aniónico de alta eficiencia con detector de pulso amperométrico HPAEC-PAD ..... | 23 |
| 7.8    | Cromatografía de permeación en gel (GPC).....  | 24 |
| 7.9    | Cromatografía en capa fina. ....   | 24 |
| 7.10   | Cromatografía de intercambio catiónico preparativa. ....   | 24 |
| 7.11   | Clonación y expresión de la enzima de fusión LevB <sub>1</sub> SacB. ....  | 25 |
| 8.     | Resultados y discusión.....  | 26 |
| 8.1    | Caracterización de SacB y sus productos .....  | 26 |
| 8.1.1  | Identificación de cadenas de levana reductoras en el perfil de productos de SacB. ....   | 26 |
| 8.1.2  | Cuantificación de extremos reductores en las cadenas de levana. ....   | 33 |
| 8.1.3. | Ausencia de fructosa en las síntesis de levana con SacB. ....  | 36 |
| 8.1.4  | Equilibrio de las estructuras conformacionales de la fructosa en solución.....   | 38 |
| 8.1.5. | Productos finales de la síntesis de levana .....   | 39 |
| 8.2    | Estudio de LevB <sub>1</sub> .....   | 42 |

|  |    |
|--|----|
| 8.2.1. Especificidad de la endolevanasa LevB <sub>1</sub> .....  | 42 |
| 8.2.2. Identificación y caracterización del producto principal de la endolevanasa LevB <sub>1</sub> .<br>.....               | 46 |
| 8.2.3. Síntesis de levano FOS por un sistema secuencial. ....  | 49 |
| .....  | 51 |
| 8.3 Estudio del sistema simultáneo SacB/LevB <sub>1</sub> para la síntesis de levano-FOS.....                                | 52 |
| 8.3.1 Influencia de la relación levansacarasa/endolevanasa en Un sistema simultáneo<br>para la producción de levano FOS..... | 52 |
| 8.3.2 Efecto de la concentración de SacB en el sistema bi-enzimático .....   | 58 |
| .....  | 58 |
| 8.3 .3 Comparación de los sistemas secuencial y simultáneo de síntesis de FOS.....   | 59 |
| 8.4 Diseño de una proteína de fusión LevB <sub>1</sub> SacB.....   | 62 |
| 8.4.1 Caracterización bioquímica de LevB <sub>1</sub> SacB.....  | 63 |
| 8.4.2 Estabilidad térmica de LevB <sub>1</sub> SacB.....   | 69 |
| 8.4.3 Síntesis de FOS empleando LevB <sub>1</sub> SacB.....  | 72 |
| 8.5 Análisis del perfil de productos de síntesis de LevB <sub>1</sub> SacB y su comparación. ....                            | 78 |
| 8.6 Purificación de FOS.....   | 83 |
| 9. Conclusiones.....   | 95 |
| 10. Publicaciones. ....  | 96 |
| 11.- Prospectivas.....   | 97 |
| 12. Bibliografía.....  | 98 |



# Índice de Figuras

*Página*

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Estructuras de los diferentes tipos de fructanas.  | 3  |
| Figura 2. Mecanismo de síntesis enzimática de las levansacarosas.  | 6  |
| Figura 3. Estructura terciaria de la levansacarasa SacB.   | 8  |
| Figura 4. Modelo de la endolevanasa LevB <sub>1</sub> .  | 12 |
| Figura 5. Cromatograma obtenido a través de HPAEC-PAD, en el que se muestra el cambio en el perfil de productos al emplear el sistema simultáneo SacB/LevB <sub>1</sub> con respecto al método separado o hidrolizado de levana.   | 15 |
| Figura 6. Cromatograma en HPAEC-PAD que muestra el perfil de productos obtenidos con SacB a 10 U/mL después de 2h de reacción, cuando se emplean diferentes relaciones de sacarosa: fructosa.  | 27 |
| Figura 7. Cromatograma obtenido por GPC que muestra el perfil de la distribución de levana de alto peso molecular obtenido en presencia de diferentes concentraciones de fructosa cuando se emplea una concentración de SacB equivalente a 1 U/mL, después de 24h de reacción. | 29 |
| Figura 8. Estudio cinético de una reacción de SacB (1μM) a 200 g/L de sacarosa, empleando una relación molar sacarosa: fructosa de 1:10, comparado con una reacción control sin  |    |

|   |    |
|---|----|
| fructosa A) Evolución del consumo de sacarosa y B) Evolución de la liberación de glucosa.   | 29 |
| Figura 9. Estudio cinético de una reacción de SacB empleando 10 U/mL ,200 g/L de sacarosa pH 6.0 a 37°C, empleando una relación molar sacarosa: fructosa de 1:10, comparado con una reacción control sin fructosa. Evolución de la fructosa en el medio de reacción.  | 31 |
| Figura 10. Evolución de la reacción de síntesis de FOS empleando la enzima SacB a pH 6.0 37°C 200 g/L de sacarosa 10 U/mL con una relación de fructosa de 10:1.   | 31 |
| Figura 11. A) Cromatograma en HPAEC-PAD que muestra el perfil de productos empleando una relación sacarosa: fructosa 1:10 y el control con sacarosa. 1) blastosa 2) levánobiosa. B) Comparación con el estándar de inulina. 3) inulobiosa.  | 32 |
| Figura 12. Cromatograma en HPAEC-PAD que muestra el perfil de productos de levana de bajo peso molecular antes (negro) y después (gris) de tratar la levana con NaBH <sub>4</sub> .   | 34 |
| Figura 13. Comportamiento cinético de la hidrólisis (círculos abiertos) y transferencia (círculos cerrados) en función de la conversión de sacarosa. a 37°C y pH 6.0. A) Condiciones de síntesis de levana de bajo peso molecular 600 g/L y 10 U/mL de SacB. B) 200 g/L y 0.1 U/mL.   | 35 |
| Figura 14. Estructura del complejo fructosa-ácido bórico. Kim N. et al. (2008).   | 36 |
| Figura 15. Análisis del perfil de productos obtenidos mediante reacciones con diferentes condiciones relativas a la fructosa presente en la reacción. a) Reacción control sacarosa 100 g/L, 10 U/mL de SacB, Reacción en presencia de boratos: sacarosa 100 g/L, 10 U/mL de SacB con una relación molar de sacarosa: ácido bórico de 1:3. Reacción en presencia de fructosa: Sacarosa 100 g/L, 10 U/mL de SacB con una relación 1:3 de sacarosa: fructosa. Los productos se identifican por flechas: 1 inulobiosa, 2 blastosa. 3 levánobiosa. 4 levánotriosa, 5 levánotetraosa y 6 levánopentosa. | 37 |

- Figura 16. Equilibrio de los conformeros de la fructosa a 35° C. 39
- Figura 17. Evolución de la reacción de la síntesis de levana de bajo peso molecular a tiempos largos de reacción. círculos claros glucosa, círculos negros fructosa y triángulos sacarosa. B) Evolución del peso molecular y la concentración de levana. 40
- Figura 18. Estudió cinético de la endolevanasa LevB<sub>1</sub> empleando como sustrato levana de bajo peso molecular (LMW) y levana de alto peso molecular (HMW) ambas producidas por la levansacarasa de SacB. 37 °C pH 6.0. 42
- Figura 19. Acción de la endolevanasa sobre GF2: 1-kestosa y 6-kestosa, después de 24 h de reacción empleando 1 μM de LevB<sub>1</sub> a 37°C pH 6.0 empleando un buffer de acetatos 50mM y 1 mM de CaCl<sub>2</sub>. 44
- Figura 20. Liberación de fructosa resultado de la actividad tipo exo de la endolevanasa LevB<sub>1</sub> utilizando como sustratos fructooligosacáridos. obtenidos por la hidrólisis de levana de bajo peso molecular empleando 100 g/L de levana y 0.1 μM de LevB<sub>1</sub> con buffer de acetatos 50 mM pH 6.0 a 37°C. 45
- Figura 21. Evolución del perfil de FOS al ser hidrolizados por la endolevanasa LevB<sub>1</sub> monitoreados por HPAEC-PAD. 45
- Figura 22. Estructura de la levanobiosa, con las respectivas señales de los desplazamientos (dadas en ppm) químicos en los espectros de H<sup>1</sup> y C<sup>13</sup>. 47
- Figura 23. Liberación de Fructosa a diferentes relaciones molares de SacB/LevB<sub>1</sub> en un sistema secuencial con levansacarasa (SacB) activa e inactiva. 50
- Figura 24. Perfil de Productos obtenidos del sistema secuencial empleando 1.0 μM de LevB<sub>1</sub> (3h de reacción, después de la síntesis de levana llevada a cabo empleando 1.0 μM de SacB, 600 g/L de sacarosa, pH 6.0 37°C. G y F indican las señales correspondientes a la glucosa y

|   |    |
|---|----|
| fructosa. GP# indica el probable grado de polimerización de cada señal o grupo de señales.  | 51 |
| Figura 25. Evolución del A) consumo de sacarosa, B) liberación de glucosa y C) liberación de fructosa a diferentes relaciones de SacB/LevB <sub>1</sub> .   | 53 |
| Figura 26. Comparación del perfil de productos al final de la reacción analizando los productos de bajo peso molecular (90% de consumo de sacarosa) por HPAEC-PAD para diversas relaciones molares SacB/LevB <sub>1</sub> a 1.0 μM de SacB.   | 55 |
| Figura 27. Comparación del perfil de productos por GPC a diferentes tiempos de reacción en reacciones con diferente relación SacB/LevB <sub>1</sub> empleando una concentración de 0.1 μM de levansacarasa a 600 g/L de sacarosa 37°C y pH 6.0.   | 58 |
| Figura 28. Comparación del perfil de productos de los FOS obtenidos a partir de un hidrolizado de levana purificada con el perfil de la levana purificada. Se incluye también el perfil de FOS obtenido mediante el sistema simultáneo (1:1) y el de la levana sin purificar.   | 59 |
| Figura 29. Comparación del perfil de productos de los FOS obtenidos a partir de un hidrolizado de levana purificada, FOS presentes en levana purificada, síntesis de FOS por sistema bienzimático simultáneo y secuencial. Empleando las condiciones óptimas del sistema simultáneo previamente reportado. Dentro de los FOS se identifica a: 1) 1-kestosa 2) blastosa, 3) 6-kestosa, 4) levanobiosa. | 60 |
| Figura 30. Gel desnaturalizante de la fracción pura de proteína de fusión LevB <sub>1</sub> SacB obtenida de la purificación por cromatografía de afinidad a níquel. Carril 1 SacB purificada, carril 2 LevB <sub>1</sub> purificada y carril LevB <sub>1</sub> SacB purificada.  | 63 |
| Figura 31. Comportamiento cinético de la actividad levansacarasa de LevB <sub>1</sub> SacB en función de la concentración de sustrato. 37 °C pH 6.0. empleando 0.05 μM de enzima.   | 64 |

Figura 32. Comportamiento cinético de la actividad endolevanasa de LevB<sub>1</sub>SacB (claros) y LevB<sub>1</sub> (oscuros) en función de la concentración de levana de 7.6 KDa (círculos) y 3.3 KDa (triángulos). 65

Figura 33. Comportamiento cinético de la actividad endolevanasa de LevB<sub>1</sub>SacB (triángulos claros) y LevB<sub>1</sub> (triángulos oscuros) en función de la concentración de levana de 3.3 KDa a bajas concentraciones de sustrato 67

Figura 34. Perfil de productos por HPAEC-PAD a diversos tiempos de reacción, a pH 6.0 y 37°C empleando 30 mM de levana 7.7 KDa. El tiempo de 24h muestra el perfil de productos final indicando el número de moléculas de fructosa que compone cada uno de ellos. 68

Figura 35. Estabilidad de LevB<sub>1</sub>SacB a 37°C pH 6.0 empleando 0.1 μM de enzima. 69

Figura 36. Perfil de FOS por HPAEC-PAD a 2h de reacción obtenido con LevB<sub>1</sub>SacB a 50°C después de haber sido incubada a esa misma temperatura a diferentes tiempos que se señalan en la figura, junto con la respectiva tasa de conversión de sacarosa alcanzada a las 2 horas. 71

Figura 37. Evolución de la reacción de síntesis de FOS empleando la enzima LevB<sub>1</sub>SacB a pH 6.0 37°C. 1-1kestosa, 2- blastosa, 3 6-kestosa, 4 levanobiosa. 72

Figura 38. Comparación del perfil cinético del sistema simultáneo a relación molar 1:1 SacB/LevB<sub>1</sub> a 10 U/mL de SacB y la enzima de fusión LevB<sub>1</sub>SacB con una actividad equivalente a 10 U/mL de levansacarasa. A una concentración de sacarosa de 600 g/L 37°C pH 6.0 en buffer de acetatos pH 6.0. 73

Figura 39. Comparación del perfil de FOS por HPAEC-PAD al final de la reacción de las enzimas SacB y LevB<sub>1</sub> en relación 1:1 reaccionando en forma simultánea y la enzima de fusión. 1) 1-kestosa, 2) blastosa, 3) levanobiosa. 74

|   |         |
|---|---------|
| Figura 40. Comparación del perfil de FOS por HPAEC-PAD y TLC de los sistemas simultáneo, LevB <sub>1</sub> SacB y SacB.   | 75      |
| Figura 41. Cromatograma en HPAEC-PAD del producto mayoritario purificado antes y después de ser hidrolizado. 1) Glucosa, 2) fructosa 3) sacarosa.                               | 78      |
| Figura 42. Estructura de la blastosa.   | 79      |
| Figura 43. Cromatograma en HPAEC-PAD perfil de productos final de varios sistemas de síntesis de FOS.   | 80      |
| Figura 44. Complejos de carbohidratos con iones metálicos. Yu E Alekseev et al. (1998).   | 83      |
| Figura 45. TLC de las fracciones recolectadas de la purificación por columnas de intercambio catiónico con columnas cargadas con A) Na <sup>+</sup> y B) Ca <sup>2+</sup> .     | 84      |
| Figura 46. Conformaciones de la glucosa y fructosa, capaces de formar complejos con el ácido fenil borónico.  | 85      |
| Figura 47. Diagrama de purificación de FOS por complejación con el ácido fenil borónico.  | 86 y 87 |
| Figura 48. Equilibrios de la formación de complejos con dioles y el ácido fenil borónico (Springsteen & Wang, 2002).  | 88      |
| Figura 49. Equilibrios de la formación de boroxinas en la deshidratación del ácido fenilborónico.   | 90      |
| Figura 50. Composición de la mezcla de carbohidratos después de ser purificados mediante el proceso de complejación con ácido fenil borónico a diferentes equivalentes.         | 91      |
| Figura 51. Composición de la mezcla de carbohidratos después de ser purificados mediante el proceso de complejación con ácido fenil borónico empleado B) etanol:agua 50:50 y C) |         |

|   |    |
|---|----|
| acetonitrilo:agua 50:50, empleando 2.5 eq. de ácido fenil borónico. A) Composición original.  | 92 |
| Figura 52. Equilibrio de la formación de la alfa glucofuranosa (Wu et al. 2013).  | 93 |
| Figura 53. TLC de A) mezcla original de FOS B) Mezcla de FOS purificada con 2.5 equivalentes y C) estándar de monosacáridos glucosa y fructosa. | 94 |

## Índice de Tablas

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Pesos moleculares de levana sintetizada en condiciones de bajo peso molecular, 10 U/mL pH 6.0, buffer de acetatos 50 mM con 1 mM de CaCl <sub>2</sub> , determinados por GPC al término de la reacción. | 28 |
| Tabla 2. Determinación de Glucosas, Fructosas totales y fructosas terminales.  | 34 |
| Tabla 3. Relación de concentraciones y actividades entre la levansacarasa (SacB) y la endolevanasa (LevB <sub>1</sub> ) empleadas en la caracterización de la reacción bienzimática simultánea.                  | 52 |
| Tabla 4. Rendimientos de los diferentes perfiles de productos obtenidos a diferentes relaciones SacB/LevB <sub>1</sub> .   | 57 |
| Tabla 5. Comparación de las constantes cinéticas de la actividad levansacarasa de SacB y LevB <sub>1</sub> SacB. (pH 6.0, 37°C, buffer de acetatos 50mM con 1 mM de CaCl <sub>2</sub> .                          | 64 |

|  |    |
|--|----|
| Tabla 6. Constantes cinéticas de modelos de MM que describen la reacción de la endolevanasa dentro de la proteína LevB <sub>1</sub> SacB. La velocidad se midió a pH 6.0 37°C. | 66 |
| Tabla 7. Rendimientos de los sistemas de producción de FOS.  | 81 |
| Tabla 8. Constantes de equilibrio de la formación de esteres a pH 7.0 con sus respectivos pKas.  | 89 |



# 1.- Resumen

Los fructooligosacáridos (FOS) son moléculas compuestas por unidades de fructosa cuyo grado de polimerización (GP) va entre 2 y 10 unidades, este tipo de moléculas se caracterizan por tener propiedades prebióticas, es decir, moléculas que son utilizadas selectivamente como fuente de carbono por la microbiota benéfica intestinal. Los FOS más utilizados por estas características son los del tipo  $\beta$  (2-1) mejor conocidos como de tipo inulina. La vía actual de obtención de fructooligosacáridos comerciales es a partir de la hidrólisis de las inulinas de bajo peso molecular (10 KDa) extraídas de las raíces de achicoria, en donde se emplean enzimas capaces de hidrolizar de forma endo los enlaces tipo  $\beta$  (2-1) para dar lugar a inulo FOS como producto principal. En analogía a las etapas de este proceso, en un trabajo realizado en el laboratorio de Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la UNAM se logró establecer un método alternativo para la producción de levano FOS, que consiste, en una primera etapa, en la síntesis de levana de bajo peso molecular a partir de sacarosa empleando la levansacarasa de *Bacillus subtilis* (SacB), seguida de la recuperación e hidrólisis de la levana obtenida en la primera reacción, empleando la endolevanasa de *B. licheniformis* (LevB<sub>1</sub>), producida como parte del proyecto, capaz de hidrolizar selectivamente la levana para la producción de levano FOS (Porrás-Domínguez, 2012). Tomando en cuenta la actividad de estas dos enzimas: SacB y LevB<sub>1</sub>, se propuso en este trabajo el diseño de un sistema simultáneo para la síntesis de FOS a partir de sacarosa, con el fin de lograr un proceso más eficiente. Como primer objetivo, se analizó el comportamiento de estas dos enzimas actuando conjuntamente en solución, en la búsqueda de condiciones de reacción compatibles y el análisis del comportamiento cinético que resulta de su acción simultánea, encontrando que en la proporción equimolar a 37°C y pH 6.0 se obtuvieron los mejores rendimientos del 40% con productos cuyo grado de polimerización va de 2 a 10 unidades de fructosa. Tomando en cuenta que la relación

equimolar fue la más adecuada para la producción de levano FOS, se exploró el diseño de una enzima nueva, fusionando la levansacarasa SacB de *B. subtilis* con la endolevanasa LevB<sub>1</sub> de *B. licheniformis*. Vía el diseño de un sólo gen, se logró obtener de una sola estructura proteica, con una actividad enzimática que permite la síntesis de levano FOS a partir de la sacarosa. Se logró expresar, purificar y caracterizar cinéticamente ambas actividades de la nueva enzima de fusión LevB<sub>1</sub>SacB, encontrándose una diferencia en el comportamiento cinético de la actividad endolevanasa, mientras que en la endolevanasa se encontró un comportamiento cinético de primer orden en la enzima de fusión se observó un comportamiento de tipo Michaeliano. A pesar de las diferencias en el comportamiento cinético en la actividad endolevanasa, en el proceso de síntesis de levano FOS, se observó el mismo perfil de productos a lo largo de la reacción cuando se compara con el sistema simultáneo de las dos enzimas en solución.

## 2.- Introducción

### 2.1 Fructanas

Las fructanas son polímeros u oligómeros compuestos por unidades de fructosa unidas mediante enlaces del tipo  $\beta$  (2-1) clasificados como inulina (figura 1a) y por enlaces del tipo  $\beta$  (2-6) conocidos como levanas (figura 1c). Existen otro tipo de fructanas que contienen ambos tipos de enlaces y son llamadas fructanas mezcladas, como las neofructanas (figura 1b) y las gramíneas (figura 1d).

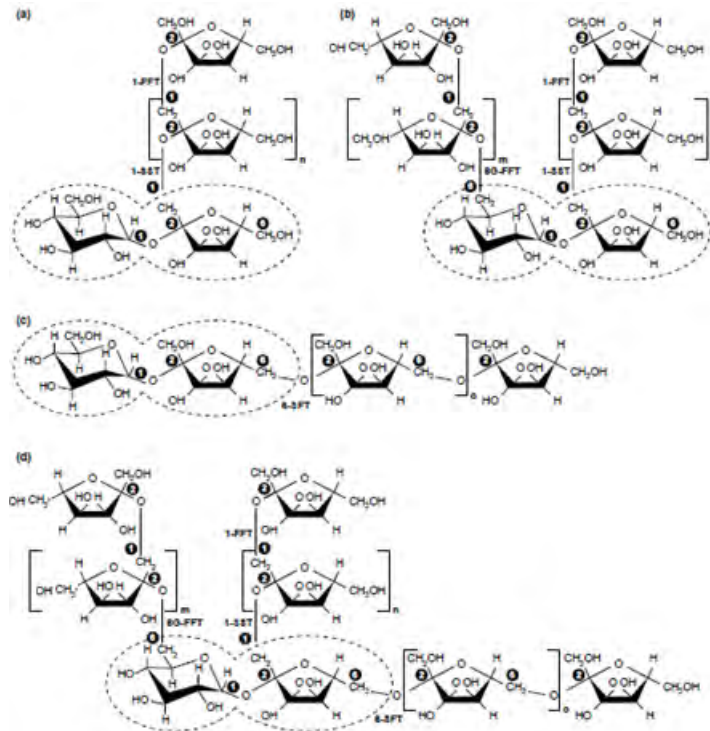


Figura 1. Estructuras de los diferentes tipos de fructanas (Ritsema et al. 2003), a) inulina, b) neofructanas. c) levana, d) gramíneas.

Un punto importante dentro de las estructuras de estos carbohidratos es la presencia de una unidad de glucosa, generalmente localizada en el extremo de la cadena, aunque en algunos tipos de fructana, como las fructanas mezcladas, neofructanas y gramineas, también se ubica en el interior de la molécula pues, la glucosa también es fructosilada por el C6. La presencia de esta molécula de glucosa resulta de la forma en que son sintetizadas, ya que las enzimas agregan unidades de fructosa a una molécula inicial de sacarosa, proceso que se detallará más adelante.

Cuando los polímeros tienen un grado de polimerización entre 2 y 10 unidades, se denominan fructooligosacáridos (FOS). Los FOS tienen una gran importancia en la industria alimentaria, ya que son considerados como prebióticos, es decir son sustancias selectivamente fermentadas por la microbiota intestinal provocando cambios específicos en su composición y/o actividad, confiriendo beneficios sobre el bienestar y la salud del huésped (Roberfroid 2007). A pesar del hecho que los FOS de tipo inulina, con enlaces  $\beta$  (2-1) entre las fructosas (inulo FOS), predominan en el mercado nutracéutico, ya existen un alto número de publicaciones científicas en las que se demuestra que los FOS de tipo levana, con enlaces  $\beta$  (2-6) (levano FOS) también poseen propiedades prebióticas (Kang et al. 2000; Marx et al. 2000; Kilian et al. 2002; Gomez et al. 2010).

Hasta ahora, la principal fuente de inulina y FOS han sido las plantas, muy particularmente las raíces de achicoria, la alcachofa de Jerusalén, los agaves, entre otras. Para ello, las plantas disponen de una serie de enzimas que les permiten la síntesis de fructanas a partir de la sacarosa, obtenida de la fotosíntesis y eventualmente, su hidrólisis cuando la planta requiere de la energía ahí almacenada.

## 2.2 Síntesis de Fructanas

La síntesis de fructanas en microorganismos se lleva a cabo también a partir de sacarosa, involucrando a una sola enzima perteneciente al grupo de las fructosiltransferasas (FTFs). Las enzimas que sintetizan moléculas del tipo inulina son denominadas inulosacarasas y las que sintetizan moléculas tipo levana son conocidas como levansacarasas (Velázquez-Hernández et al. 2009). En el caso de las plantas la síntesis de fructanas requiere de una primera enzima responsable de la formación de una molécula base adicional a la sacarosa (la 1SST para la síntesis de la 1-kestosa en el caso de inulinas o la 6-SST para la síntesis de 6-kestosa en el caso de levanas). Una vez sintetizadas las moléculas iniciadoras, 1-kestosa o 6-kestosa, otras FTFs elongan las cadenas para la obtención de los polímeros, haciendo así necesaria la participación de más de una enzima.

En la naturaleza existe una gran variedad de FTFs capaces de sintetizar fructanas con enlaces  $\beta$  (2-1), tanto a nivel de FOS (denominadas simplemente fructosiltransferasas y casi todas de origen fungal) como polímeros de alto peso molecular (denominadas inulosacarasas, en su mayoría bacterianas). En contra parte, las enzimas que sintetizan levana, las levansacarasas, predominan en bacterias, dentro de las cuales destacan *B. subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Zymomonas mobilis*, *Serratia spp.*, *Microbacterium laevaniformans*, etc. (Tanaka 1979; Morales-Arrieta et al. 2006; Velázquez-Hernández et al. 2009). Algunas especies de plantas también contienen levanas, aunque en muy baja proporción, como es el caso del pasto azul (Hendry, 2006).

## 2.3 Mecanismo de reacción de las FTFs

Las fructosiltransferasas, de manera general, catalizan la transferencia del grupo fructosilo de una molécula de sacarosa a la fructosa de una molécula aceptora (sacarosa o polímero en crecimiento), al tiempo que liberan al medio de reacción una molécula de glucosa que se encontraba unida al grupo fructosilo donador. La energía almacenada del enlace glicosídico de la sacarosa permite la transferencia eficiente de un residuo fructosilo para la formación del producto, por lo que la reacción no requiere de cofactores ni compuestos fosforilados de alta energía para formar el enlace. (Velázquez-Hernández et al. 2009). El complejo formado a través del ataque nucleofílico forma un intermediario conocido como fructosil-enzima. en este punto este residuo de fructosa puede ser transferido a una molécula de sacarosa, o a algún polímero en elongación a través de un segundo ataque nucleofílico, que en el caso de las levansacarinas es llevado a cabo por el hidroxilo del carbono 6 de una molécula de fructosa (figura 2), a esto se le conoce como reacción de transfructosilación.

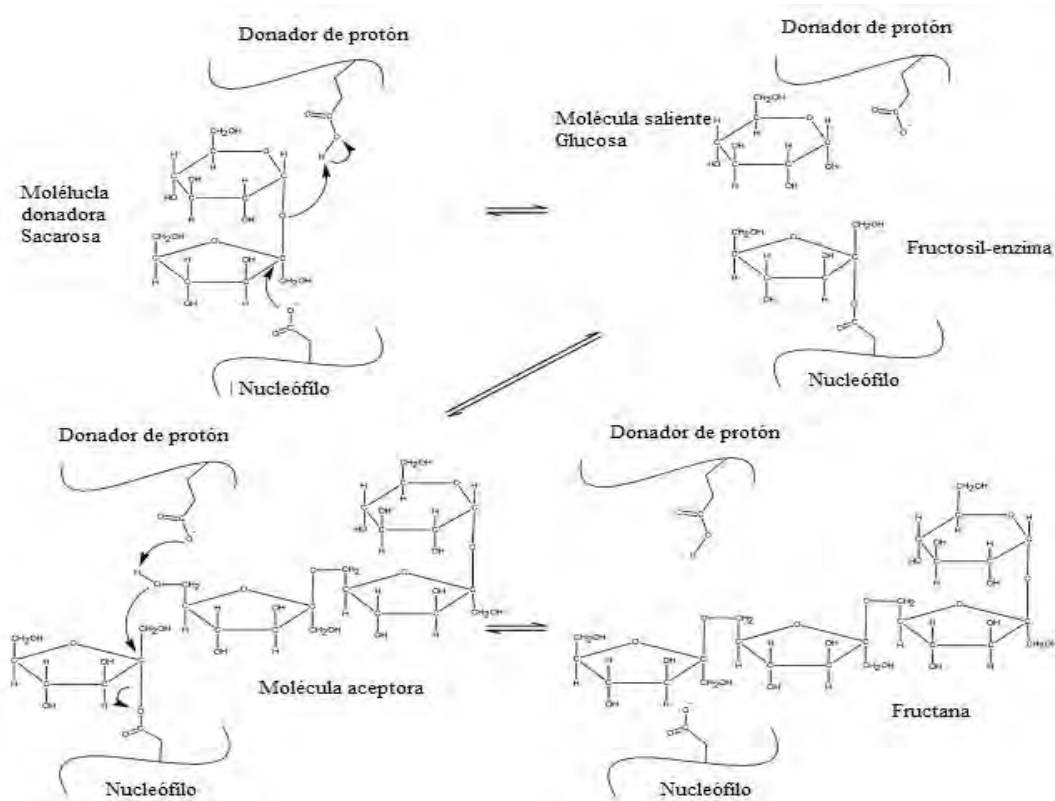


Figura 2. Mecanismo de síntesis enzimática de las levansacarinas.

Alternativamente, las fructosiltransferasas pueden utilizar al agua como molécula aceptora, a esto se le llama reacción de hidrólisis. Utilizando altas concentraciones de sacarosa, la reacción de polimerización desplaza a la de hidrólisis, y se obtienen mayores rendimientos en la síntesis de polímeros (Porras 2012). El mecanismo de la levansacarasa SacB asociado al perfil de productos se discutirá en capítulos posteriores.

## 3. Antecedentes

### 3.1.-Levansacarasa de *B. subtilis*

La levansacarasa de *B. subtilis*, SacB, es una enzima clasificada dentro de la familia del grupo de las glicósido hidrolasas 68 (GH<sub>68</sub>). Estas se conforman, estructuralmente por un sólo dominio en forma de una  $\beta$ -hélice formada por 5 hojas  $\beta$  anti-paralelas (figura 3) (Meng et al. 2003).



Figura 3. Estructura terciaria de la levansacarasa SacB.

Se sabe que, cuando se emplea una concentración de enzima que da lugar a una actividad de 1 U/mL en condiciones de pH y de temperatura óptimas para SacB (pH 6.0 y 37°C), la tasa de velocidades de reacción hidrólisis/ transferencia para una concentración de 292 mM (100 g/L) de sacarosa (condición dentro de la saturación de la enzima con su sustrato), es de 40/60 aproximadamente (Ortiz-Soto et al. 2008). Esta relación hidrólisis/transferencia puede ser modificada al aumentar la concentración de sustrato favoreciendo la transferencia (Tanaka 1979), llegando a valores de hasta 80% de



transferencia a concentraciones de 1.7 M (600 g/L) de sacarosa , como se demostró en los trabajos que dieron lugar a este proyecto (Porrás-Domínguez, 2012).

Esta enzima tiene la peculiaridad de sintetizar un polímero con una distribución bimodal de pesos moleculares: una distribución de moléculas de levana de bajo peso molecular con un promedio de 50 unidades de fructosa (8.3KDa) y otra distribución con levanas conteniendo un promedio de 20,000 unidades de fructosa (3500KDa) (Ortiz-Soto et al. 2008). Recientemente se demostró que la levana de bajo peso molecular se sintetiza mediante un mecanismo no procesivo, mientras que para la síntesis de la levana de alto peso molecular el mecanismo aún no se conoce con certeza (Raga 2013).

En estudios más recientes, también llevados a cabo en nuestro laboratorio, se demostró que la distribución de pesos moleculares de la levana producida por SacB es dependiente de la concentración de la enzima donde se observa un 100% de polímero de bajo peso molecular a concentraciones altas de la enzima y un 100% de polímeros de alto peso molecular a concentraciones muy diluidas de la enzima (Porrás-Domínguez, 2012).

Por otro lado, no se ha logrado obtener un método eficiente de síntesis de FOS  $\beta$  (2-6) ni modificando las condiciones de reacción ni haciendo mutagénesis dirigida en levansacarasa (Ortiz-Soto et al. 2008).

### 3.1.1 Influencia del mecanismo de la reacción en el perfil de productos de la levansacarasa SacB.

La levansacarasa SacB de *B. subtilis* ha sido estudiada ampliamente desde la década de los 70s, incluido tanto el mecanismo de reacción (Chambert 1974) como la distribución de los oligosacáridos y polisacáridos que conforman la levana, el principal producto de la reacción (Tanaka et al. 1980). Se conoce también, la forma en la que la presencia de

solventes, fuerza iónica y concentración de enzima afectan esta distribución (T Tanaka et al. 1980; Toshi Tanaka, 1979 & Porras 2012). La estructura de los productos se describe como cadenas de fructosa unidas por enlaces  $\beta$  (2-6) con extremos no reductores con una molécula de glucosa terminal proveniente de la sacarosa, y por lo mismo unida por enlace ( $\beta$ 2- $\alpha$ 1); es decir, se trata de moléculas de polímero con una secuencia del tipo GF<sub>n</sub>. Sin embargo, el desarrollo de técnicas cromatográficas con mayor resolución y más sensibles para el análisis de carbohidratos, como la cromatografía de alta eficiencia de intercambio aniónico con detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD por sus siglas en inglés), ha permitido un análisis más minucioso no sólo del perfil de productos, sino también del mecanismo de polimerización de la enzima.

En estudios recientes realizados en nuestro grupo de trabajo relacionados con la estructura de las levanas sintetizadas, se encontró que una vez consumida la sacarosa en las reacciones de síntesis se incrementa la concentración de ciertos oligosacáridos (Raga et al. 2013). En un esfuerzo por la caracterización de estos oligosacáridos, se encontró primeramente que tienen el mismo tiempo de elución que los FOS que resultan de una hidrólisis de levana. Por la estructura que tiene la secuencia de los FOS, así como su origen, fue evidente inferir que se trataba de productos de la serie F<sub>n</sub>, es decir, cadenas de fructosas unidas por enlaces  $\beta$  (2-6) con un extremo reductor (hemiacetal) proveniente de la fructosa terminal.

En un trabajo paralelo, se demostró que en las reacciones en las que se incubaba levana en presencia de SacB, se generan simultáneamente fructosa derivada de una actividad hidrolítica del tipo exo-levanasa, y productos de la serie F<sub>n</sub> (Méndez-Lorenzo et al. 2015). Existe un antecedente muy antiguo relacionado con este fenómeno, ya que Chambert R. (1974) reportó un mecanismo cinético para SacB, en el que la levana es utilizada como donador de grupo fructosilo, que puede ser transferido al agua, dando lugar a la hidrólisis de la levana o bien transferirlo a otra molécula de levana para llevar a cabo reacciones de

desproporción. Está reportado desde hace décadas, que al incubar SacB en presencia únicamente de levana, la fructosa se acumula como el principal producto; lo que se constató en este nuevo trabajo, es que la fructosa puede actuar como molécula aceptora de la reacción, dando origen a una serie de FOS con fructosas terminales (oligolevanas o serie Fn) que acompañan a los productos de reacción obtenidos a partir de la sacarosa. De hecho, Yamamoto Satoru, Iizuka Masaru, Tanaka Toshio, (1984) también habían reportado la transferencia de residuos fructosilo de la enzima hacia fructosa empleando sacarosa como aceptor, cuando la reacción se lleva a cabo con una relación 1:10 sacarosa:fructosa en peso, asilando levanobiosa como producto principal. Nosotros planeamos la hipótesis de que a partir de levanobiosa y/o de otro difructósido como la inulobiosa se puede iniciar el crecimiento de cadenas de fructanas. Esto es de gran importancia, en términos de la estructura hasta ahora reportada para las fructanas sintetizadas por las levansacarasas, ya que se planteaba que todos los productos sintetizados por SacB no eran reductores debido a la glucosa terminal. Queda ahora claro que una cierta proporción de los FOS sintetizados y cadenas de levana resultan ser reductores, al contar con una molécula de fructosa terminal con el carbono reductor libre, con estructura de hemiacetal.

### 3.2 Endolevanasa

Las levanasas son enzimas pertenecientes a la familia 32 de las glicosil hidrolasas. A esta misma familia pertenecen enzimas como las invertasas, inulinasas e incluso algunas fructosiltransferasas. Las levanasas poseen una estructura compuesta por 2 dominios: una  $\beta$ -propela, más pequeña que la presente en enzimas de la familia GH<sub>68</sub>, compuesta por 5 hojas  $\beta$  antiparalelas que se localiza en el extremo N-terminal donde se encuentra el sitio catalítico y un  $\beta$ -sándwich en el extremo C-terminal (figura 4).

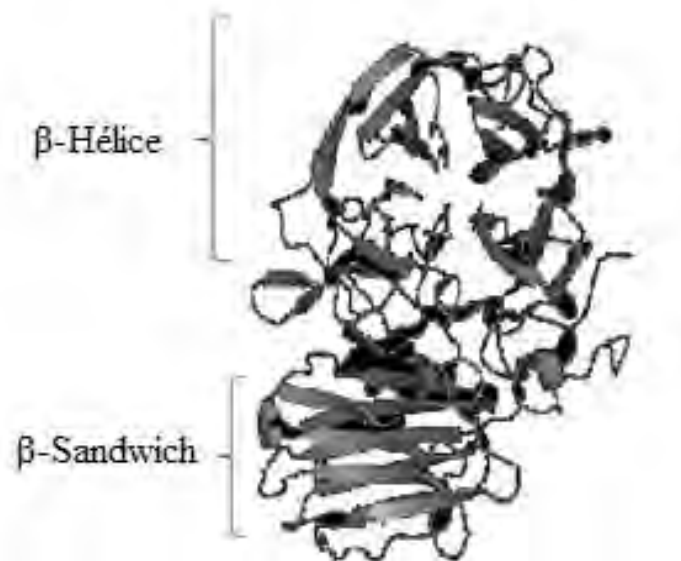


Figura 4. Modelo de la endolevanasa LevB<sub>1</sub>, creado por homología empleando el servidor ITASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), a partir de alineamientos con enzimas de la familia GH32.

Las levanasas son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces del tipo  $\beta$  (2-6) entre dos moléculas de fructosa. En función del sitio en donde actúan, estas enzimas pueden clasificarse en dos grandes grupos correspondientes a exo y endolevanasas, como se describe a continuación.

- A) Exo levanasas/Exo inulinasas: Estas enzimas hidrolizan las fructanas en los extremos, produciendo fructosa o levanobiosa (disacárido compuesto por dos unidades de fructosa unidas por un enlace del tipo  $\beta$ 2-6). Las enzimas que liberan moléculas de fructosa, no son específicas es decir pueden hidrolizar tanto levana, como inulina y sacarosa (Kulminskaya et al. 2003)
- B) Endolevanasas: Este grupo incluye a las enzimas que hidrolizan enlaces internos  $\beta$  (2-6) dando lugar a levano FOS como producto principal. Estas enzimas son específicas siendo capaces de hidrolizar solamente levana, tal como sucede también con las endoinulinasas, que son específicas para los enlaces  $\beta$  (2-1).

Hasta la fecha se han reportado 3 enzimas con actividad de endolevanasa, una de *Bacillus sp* L7 (Miasnikov, 1997) una de *B. subtilis* (Pereira et al. 2001) y una de *B. licheniformis* IBt1, habiendo sido ésta última recientemente aislada y caracterizada en nuestro laboratorio (Porrás-Domínguez, 2012).

### 3.3 Antecedentes de sistemas bi-enzimáticos para la síntesis de oligosacáridos.

Existen diversos reportes en los que se propone el uso de sistemas bi-enzimáticos para llevar a cabo la síntesis de productos de interés industrial, entendiendo por estos, los sistemas en los que se agregan dos enzimas que actúan de manera simultánea. Goulas et al. en el 2004, propusieron un sistema para la síntesis de isomaltooligosacáridos a partir del uso combinado de dos enzimas: una dextransacarasa, enzima que sintetiza polímeros de glucosa con enlaces  $\alpha$  (1-6) a partir de sacarosa mediante un mecanismo similar a la levansacarasa, y una endodextranasa, una enzima que hidroliza enlaces  $\alpha$  (1-6) en polímeros de glucosa. Aunque previamente ya se habían estudiado sistemas de mezclas enzimáticas para la producción de jarabes con alto contenido en isomaltosa, algunos ya

patentados, estos no se habían estudiado en mayor detalle. Goulas et al (2004), encontraron que modificando la relación de concentración entre la dextransacarasa y la endodextranasa es posible controlar, por un lado, el grado de polimerización de los productos finales, y por el otro, modificar el mecanismo cinético de la dextransacarasa debido a la aparición de oligosacáridos, que son producto de la hidrólisis de la endodextranasa y que pueden ser usados como aceptores en la reacción de transferencia. Por analogía, el objetivo de este proyecto es utilizar el sistema bi-enzimático constituido por la levansacarasa de SacB de *B. subtilis* y la endolevanasa LevB<sub>1</sub> de *B. licheniformis* para la síntesis de fructooligosacáridos. Este sistema tiene el propósito de volver el proceso de síntesis de levano FOS más eficiente reduciendo su obtención a una sola etapa, y evitando la acumulación de levana en el medio de reacción, que debido a su baja solubilidad dificulta el poder manejar concentraciones altas cuando se le emplea como sustrato.

En estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, empleando las enzimas SacB y LevB<sub>1</sub> simultáneamente, se obtuvo un perfil diferente de productos al observado previamente en estudios anteriores (Porrás 2012). En efecto, al analizar mediante HPAEC-PAD el perfil de FOS (figura 5), se observó una diferencia en el perfil de productos cuando usamos el sistema simultáneo.

Estos resultados demuestran la ventaja del sistema bi-enzimático y dada la naturaleza de los productos obtenidos, justifican un estudio detallado del mismo incluyendo la especificidad y optimización del sistema. Dicho estudio constituye el objetivo principal del presente proyecto.

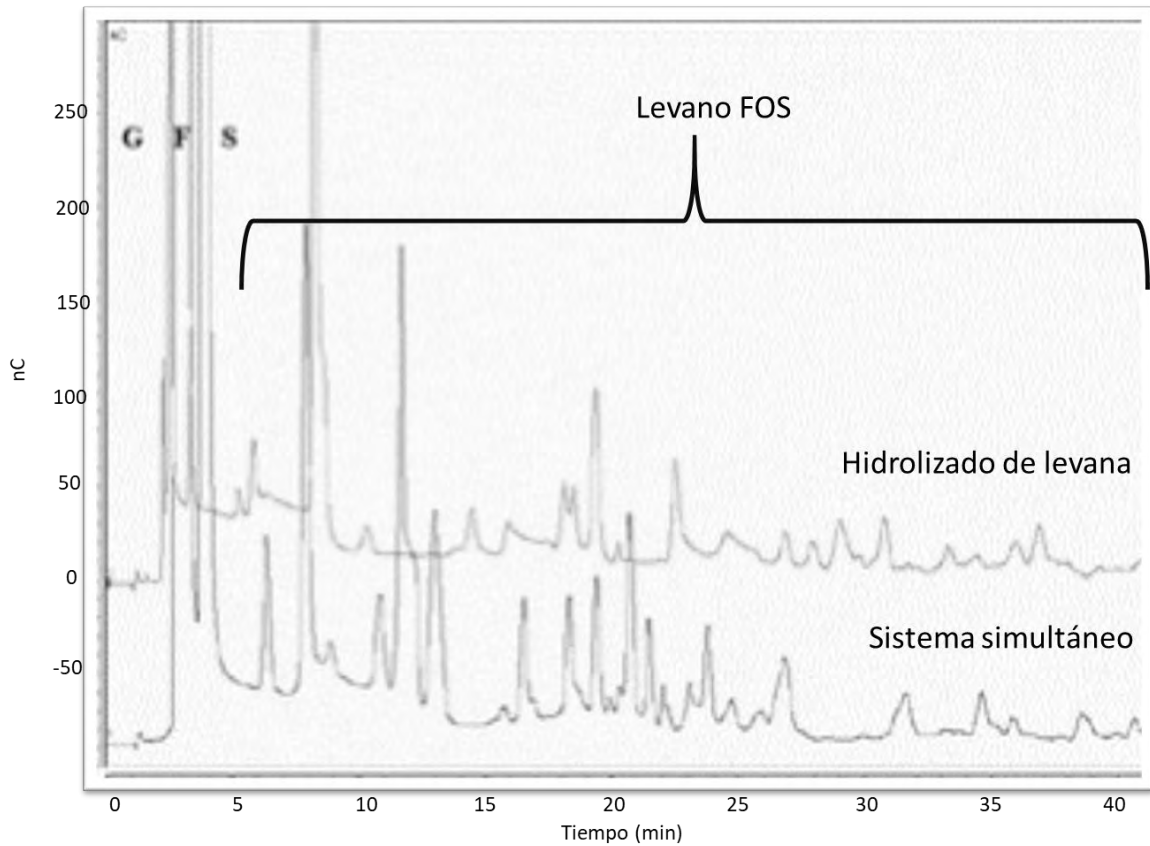


Figura 5. Cromatograma obtenido a través de HPAEC-PAD, en el que se muestra el cambio en el perfil de productos al emplear el sistema simultáneo SacB/LevB1 con respecto al método separado o hidrolizado de levana. G Glucosa, F fructosa y S sacarosa.

### 3.4 Enzimas de fusión

La idea de fusionar enzimas para que actúen conjuntamente no es nueva. Según la base de datos SCOP (Structural Classification of Proteins), los dominios son unidades evolutivas independientes que pueden tener por sí mismas una función o contribuir a la función de una proteína multidominio. El acoplamiento de los dominios es originado durante el proceso de evolución ya sea por la inserción, eliminación o intercambio de genes.

Por lo antes expuesto, la combinación de dominios constituye una estrategia en el campo de la biotecnología mediante la cual, a través de la fusión de proteínas, se crean quimeras que presentan funciones modificadas con respecto a la que tenían las proteínas independientes, dando lugar a cambios que pueden mejorar o crear nuevas funciones.

Hay antecedentes sobre la creación de enzimas de fusión bifuncionales, como es el caso de Wang, Tsai, Lee, & Shaw, (2007) quienes fusionaron la  $\beta$ -amilasa de *Clostridium thermosulfurogenes* con la trehalosa sintetasa de *Thermus thermophilus*. Las proteínas fueron enlazadas por medio de una región de unión de 10 aminoácidos para permitir su plegamiento y función independiente. La proteína recombinante cataliza dos reacciones secuenciales en las que primeramente el almidón es hidrolizado para formar maltosa con el dominio catalítico de la  $\beta$ -amilasa, para posteriormente convertirla en trehalosa con el dominio de la trehalosa sintasa. Mediante este sistema se logró aumentar la estabilidad y eficiencia de la nueva proteína, con respecto a las enzimas individuales, además de lograr minimizar el porcentaje de hidrólisis de maltosa llevado a cabo por una reacción secundaria de la  $\beta$ -amilasa. En resumen, estos autores lograron obtener una enzima capaz de producir trehalosa a partir de almidón.

En un caso más cercano a la actividad de las enzimas a emplear en esta propuesta, Kim, Seo, et al. (2009) crearon una enzima fusionando el extremo N-terminal de la dextranasa de *L. mesenteroides* B-1299CB4 con el extremo C-terminal de la endodextranasa de *Arthrobacter oxydans*, agregando una secuencia de unión de sólo 2 aminoácidos, obteniendo así una proteína bifuncional de 240 KDa. Los autores de este trabajo encontraron un aumento de la actividad de endodextranasa del 150% para la enzima fusionada y una disminución de la actividad dextranasa del 98%, logrando obtener una enzima capaz de sintetizar isomaltooligosacáridos con un grado de polimerización entre 2 y 10.



En nuestra propuesta, paralelo al estudio del sistema de reacción levansacarasa/endolevanasa simultáneo se propone la construcción de una nueva enzima fusionando el dominio  $\beta$ -sándwich de la endolevanasa como liga entre los dos dominios catalíticos de ambas enzimas, es decir fusionando el extremo N-terminal de SacB con el extremo C-terminal de LevB<sub>1</sub>, con el fin de alejar a los dos dominios catalíticos en el caso de presentarse problemas durante el plegamiento de esta nueva proteína

## 4.- Hipótesis

La acción simultánea de las enzimas SacB y LevB<sub>1</sub>, permitirá la síntesis de levano FOS. empleando sacarosa como sustrato.

## 5.- Objetivos

### 5.1.- Objetivo principal

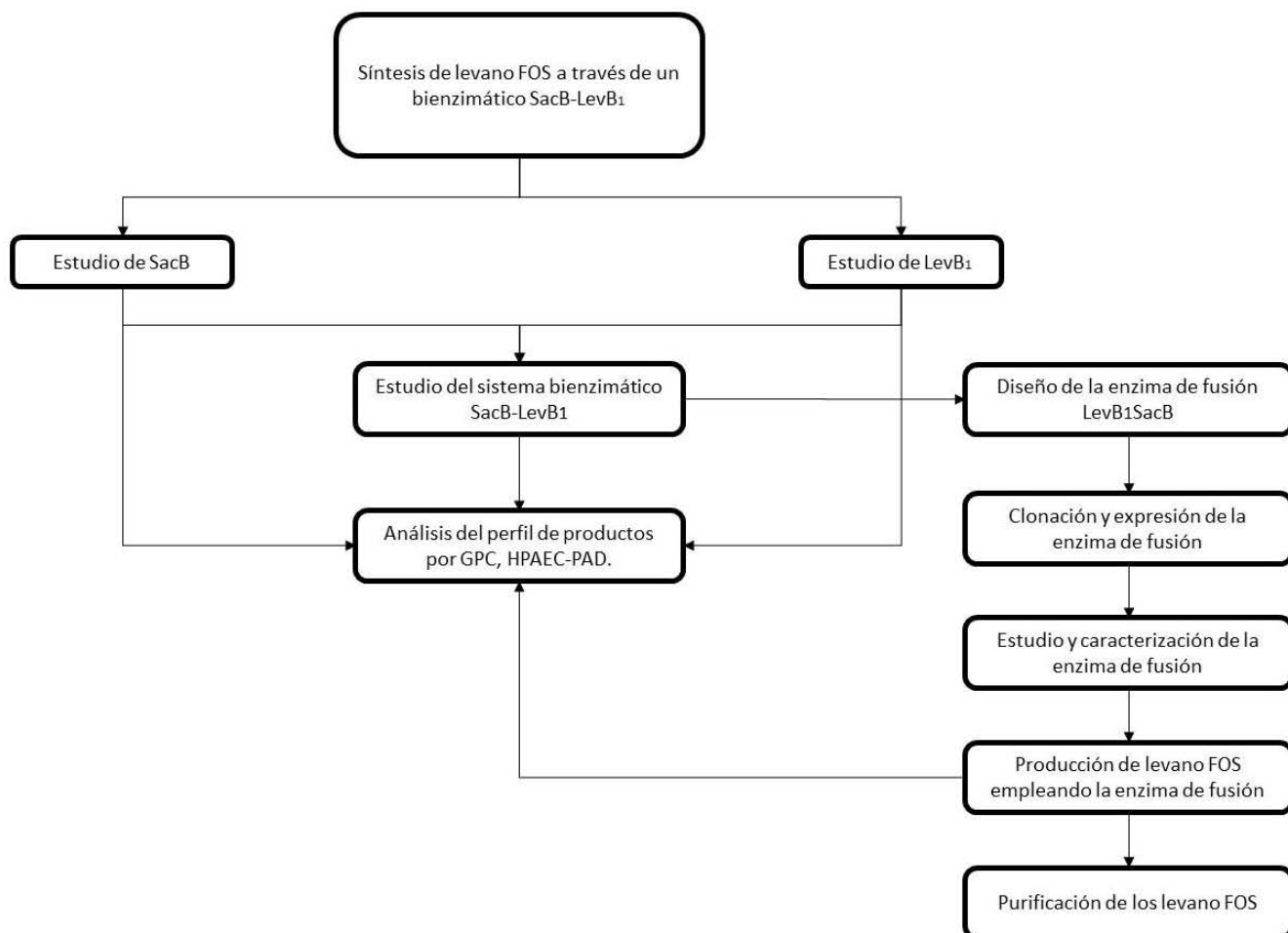
Diseñar un sistema bi-enzimático para la síntesis de fructooligosacáridos a partir de sacarosa empleando la levansacarasa de *B. subtilis* y la endolevanasa de *B. licheniformis*, actuando de forma simultánea, derivado de un estudio del comportamiento cinético de las enzimas en solución y basado en una enzima de fusión.

### 5.2.- Objetivos secundarios

- Estudiar el efecto del cambio del perfil de productos en función de la relación molar entre las enzimas levansacarasa y endolevanasa en un sistema simultáneo para la producción de FOS a partir de sacarosa.
- Definir las condiciones óptimas de reacción del sistema bi-enzimático para la obtención de fructooligosacáridos.

- Diseñar una enzima a partir de la fusión de los genes de SacB y LevB<sub>1</sub> que, a través de una secuencia de transglicosidación e hidrólisis, permita sintetizar FOS a partir de sacarosa.
- Comparar los sistemas bi-enzimáticos en solución con la enzima de fusión en términos de la especificidad y el perfil de productos.
- Desarrollar una metodología para la eliminación de monosacáridos de la mezcla final de FOS.

## 6. Estrategia experimental



## 7. Materiales y Métodos.

7.1 Expresión de LevB<sub>1</sub>. Para producir LevB<sub>1</sub>, 100 µL de células resuspendidas en glicerol de *E. coli Rosetta 2* transformadas con el plásmido pet22b+levb<sub>1</sub> se inocularon en 50 mL de medio LB/Amp200 a 37 °C y 250 rpm durante 18h. Se tomaron 15 mL de este cultivo para inocular 1L de medio YT2X/Amp200 y se incubó a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> =0.5. La inducción se realizó con 0.4 mM de IPTG durante 18 h a 18°C y 90 rpm. Las células fueron colectadas mediante centrifugación a 12 000 rpm durante 15 min y posteriormente se lavaron 2 veces en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0. Las células se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0 y se rompieron mediante sonicación con 3 pulsos de 15 s y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 min.

7.2 Purificación LevB<sub>1</sub>. La enzima LevB<sub>1</sub> fue purificada utilizando las propiedades que le confiere el extremo C-terminal donde cuenta con una cola de histidinas. Esta purificación se realizó por medio de cromatografía de afinidad por níquel, pasando el extracto enzimático 2 veces por una columna cargada con sulfato de níquel y eluyendo a la proteína de interés con un buffer de una concentración de imidazol 0.18M a pH 6.5. Las fracciones enzimáticas fueron dializadas empleando bolsas de diálisis con un tamaño de poro de 10 KDa contra un buffer de fosfatos 50 mM pH 6.0.

7.3 Expresión de SacB. Para producir SacB, 100 µL de células de *E. coli* BL21 DE3 transformada con el plásmido pet22b+SacB y resuspendidas en glicerol, se inocularon en 50 mL de medio LB/Amp200 a 37 °C y 250 rpm y se incubaron durante 18 h. Se tomaron 15 mL de este cultivo para inocular 1 L de medio LB/Amp200 y se incubó a 37 °C y 250 rpm hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> = 0.5. La inducción se realizó con 0.2 mM de IPTG durante 8 h a 18°C y 200 rpm. Las células fueron colectadas mediante centrifugación a 12 000 rpm

durante 15 min y posteriormente se lavaron 2 veces en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 6.0. Las células se resuspendieron en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.0 y se rompieron mediante sonicación con 3 pulsos de 15 s y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 min.

**7.4 Purificación de SacB.** Se hizo pasar el extracto enzimático por una columna de intercambio catiónico de 5 mL (previamente equilibrada con 5 volúmenes de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6.0), durante 30 min. Se lavó la columna con 5 volúmenes de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6.0, se eluyó la proteína empleando un gradiente lineal de amortiguador de fosfatos de 100 mM a 1000 mM a pH de 6.0, recolectando las fracciones de SacB pura que eluyen a una concentración de aproximadamente 500 mM de buffer de fosfatos. Las fracciones se concentraron por ultrafiltración en cartuchos de 10 KDa (para centrifuga). Se lavó la proteína 10 veces con amortiguador de fosfatos 50 mM, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 6.0.

**7.5 Medición de actividades de SacB y LevB<sub>1</sub>.** La actividad de LevB<sub>1</sub> fue determinada a pH 6.0 en amortiguador de fosfatos 50 mM a 37°C, midiendo la velocidad inicial de liberación de poder reductor mediante el método de DNS (ácido di nitrosalicílico) (Miller 1959) a partir de soluciones de levana producida por SacB con un peso molecular promedio de 7.6 KDa al 1 % p/v en un volumen de reacción de 500 µL. Se tomaron muestras cada determinado tiempo, a las que se agregó el reactivo de DNS, calentándose a ebullición durante 5 min. Se enfriaron las muestras incubándolas en hielo y se determinó la absorbancia a 540 nm. Una unidad de actividad endolevanasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para obtener un µmol de azúcar reductor equivalente a fructosa por minuto. La actividad de SacB fue determinada a pH 6.0 en amortiguador de fosfatos 50 mM a 35°C con CaCl<sub>2</sub> 1 mM, midiendo la velocidad inicial de liberación de poder reductor mediante la técnica de DNS a partir de soluciones de sacarosa a 292 mM (100 g/L) en un volumen de reacción de 600 µL. Una unidad de actividad levansacarasa fue definida como

la cantidad de enzima requerida para obtener un  $\mu\text{mol}$  de azúcar reductor equivalente a glucosa/fructosa por minuto. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

**7.6 Cuantificación de fructosa, glucosa y sacarosa por HPLC.** Las concentraciones de fructosa, glucosa y sacarosa en el medio de reacción fueron cuantificadas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC (High Performance Liquid Chromatography) por sus siglas en inglés, empleando un equipo Waters con una columna aminada Prevail, empleando una fase móvil acetonitrilo: agua 75:25 v/v a un flujo de 1.0 mL/min a una temperatura de 30°C empleando un detector de índice de refracción. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. El sorbitol, manitol y glucosa terminal fueron determinados empleando una columna Aminex® HPX-87C empleando agua como fase móvil a 80 °C a un flujo de 0.6 mL/min. Se usaron como estándares sorbitol, glucosa, manitol y fructosa. Las mediciones se hicieron por duplicado.

**7.7 Perfil de productos por cromatografía de intercambio aniónico de alta eficiencia con detector de pulso amperométrico HPAEC-PAD.** Para identificar oligosacáridos las muestras se centrifugaron y se analizaron mediante cromatografía de intercambio aniónico (HPAEC-PAD) en un equipo Dionex equipado con un detector electroquímico (ED50 Dionex) y utilizando una columna CarboPac PA-200 (2 x 250 mm). La columna fue equilibrada a 30°C con 150 mM de NaOH a un flujo de 0.5 mL/min y las fructanas fueron eluidas con un gradiente de acetato de sodio (5 mM de acetato de sodio por 5 min, 5-230 mM de acetato de sodio de 5 a 100 min). Se utilizaron como estándares: glucosa, fructosa, sacarosa, 1-kestosa, 6-kestosa, nistosa y fructosil-nistosa. Todas las mediciones se hicieron por duplicado.

## 7.8 Cromatografía de permeación en gel (GPC)

El peso molecular promedio de las reacciones en donde hubo presencia de polímero fueron determinadas por cromatografía en permeación en gel con un equipo de HPLC (Waters) equipado con un detector de índice de refracción (Shodex). Se emplearon dos columnas conectadas en serie: Ultrahydrogel Linear (7.8 mm × 300 mm) y Ultra hydrogel 500 (7.8 mm × 300 mm) con un tamaño de exclusión molecular de 0.50 a 10,000 KDa, respectivamente, empleando un flujo de 0.8 mL/min manteniendo las columnas a una temperatura de 37 °C con una fase móvil de NaNO<sub>3</sub> 0.1 M. Se emplearon estándares de dextrana de 5.2, 11.6, 23.8 y 48.6 KDa at 1 % (m/V) (Waters. Polymers Std. Service). Se empleo también un estándar de alto peso molecular de 2000 KDa (Sigma Chemical), el cual eluye en el volumen muerto.

7.9 Cromatografía en capa fina. Los productos de reacción fueron analizados mediante cromatografía en capa fina utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel 60 (MERCK) y como fases móviles: una solución de etanol, butanol y agua (15:9:6) v/v y ácido acético, cloroformo, etanol, agua (11:3:11:1). Las placas fueron eluidas dos veces y reveladas con  $\alpha$ -naftol y calor.

7.10 Cromatografía de intercambio catiónico preparativa. Se empleó una resina de poli(estireno-co-divinylbenzeneo) funcionalizada con ácido sulfónico, marca Dowex al 8%. La resina fue tratada con soluciones de 5 eq de NaCl y CaCl<sub>2</sub>. Se cargaron columnas de una altura de 15 cm y un diámetro de 1 cm con la resina. Se lavaron las columnas con agua desionizada hasta obtener un pH neutro. Se emplearon las columnas a un flujo de 0.3 mL/min, con agua desionizada como fase móvil.



7.11 Clonación y expresión de la enzima de fusión LevB<sub>1</sub>SacB. Se diseñó la secuencia nucleotídica de la enzima LevB<sub>1</sub>SacB fusionando el extremo C-terminal de LevB<sub>1</sub> con el N terminal de SacB empleando una región asa de unión que codifica para la secuencia GGSGGS, agregando dos sitios de restricción BamHI en los extremos del asa de unión. Además, se agregaron los sitios de restricción NdeI en el extremo N terminal y Xho en el extremo C-terminal. El gen fue sintetizado por GenScript USA Inc y fue clonado en el plásmido pet22b+ entre los sitios de restricción NdeI y Xho con el que finalmente fueron transformadas células electro competentes de la cepa *E. coli* Rosetta 2. La expresión y la purificación de la enzima de fusión se realizó empleando las condiciones de la enzima LevB<sub>1</sub> de los puntos 7.1 y 7.2. La actividad endolevanasa y levansacarasa de la enzima de fusión fueron determinadas como se indica en el punto 7.5.

## 8. Resultados y discusión.

### 8.1 Caracterización de SacB y sus productos

#### 8.1.1 Identificación de cadenas de levana reductoras en el perfil de productos de SacB.

Retomando el esquema planteado en el apartado 3.1.1 sobre la influencia en el mecanismo en el perfil de productos de la levansacarasa se decidió realizar una serie de experimentos para tener mayor claridad. En un primer ensayo, se llevaron a cabo reacciones empleando una concentración de 200 g/L de sacarosa (584 mM) con diferentes relaciones molares de fructosa como aceptor, empleando 10 U/mL de SacB, y siguiendo la evolución de la reacción durante 2 h. Las reacciones fueron analizadas por HPAEC-PAD (figura 6) y se determinaron los porcentajes de conversión de sacarosa. Es importante señalar que estos experimentos se realizaron empleando una alta concentración de enzima, equivalente a 10 U/mL, ya que a esta concentración se favorece la síntesis de levana de bajo peso molecular.

En el cromatograma de la figura 6 se observa un cambio radical en el perfil de productos al aumentar la concentración de fructosa en el medio de reacción, reduciéndose, por un lado, el grado de polimerización y por el otro incrementándose la intensidad de señal de ciertos oligosacáridos que podrían corresponder a los oligosacáridos con una fructosa en el extremo reductor, resultado de transferencias sucesivas a residuos fructosilo sobre la fructosa reductora inicial. Conviene señalar que, en la reacción sólo en presencia de sacarosa, los productos con fructosas reductoras terminales aparecen en baja concentración, ya que su síntesis se inicia sólo cuando se ha acumulado suficiente fructosa proveniente de la actividad sacarolítica de la propia SacB, suficiente como para competir con la sacarosa residual como aceptor. En las reacciones de la figura 6, al incrementarse la concentración de moléculas de fructosa que pueden actuar como aceptoras el GP disminuye, debido al aumento de los núcleos iniciadores que pueden dar lugar al

crecimiento de las cadenas. En concreto, el aumento en la concentración de fructosa en las reacciones favorece la síntesis de fructanas de menor tamaño, disminuyendo así el peso molecular promedio del producto final. La tabla 1 muestra la reducción del peso molecular promedio determinado por GPC al incrementar la concentración de fructosa en el medio.

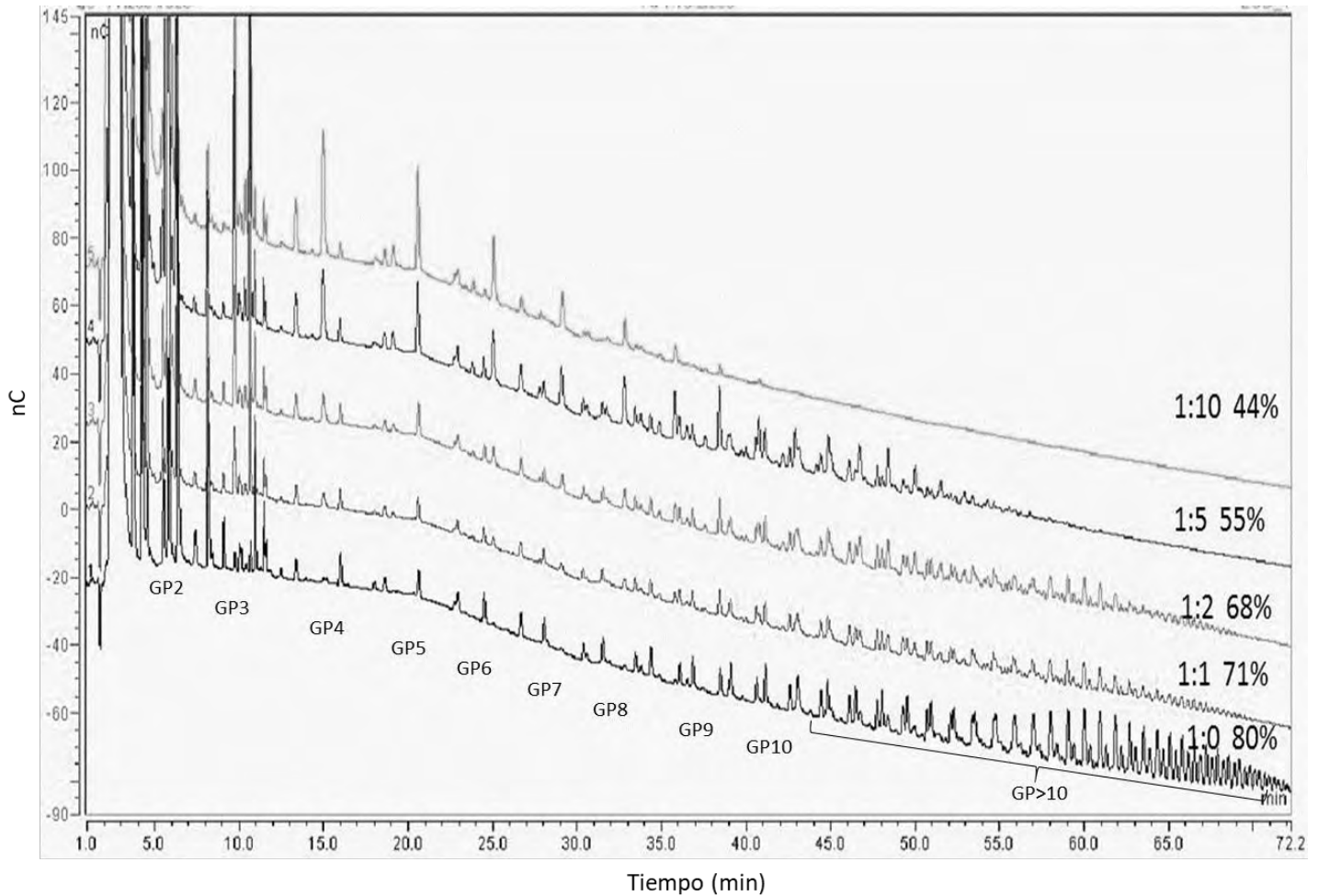


Figura 6. Cromatograma en HPAEC-PAD que muestra el perfil de productos obtenidos con SacB a 10 U/mL después de 2h de reacción, cuando se emplean diferentes relaciones de sacarosa: fructosa. Se indica en cada caso la relación molar sacarosa: fructosa y el porcentaje de conversión alcanzado a las 2h de reacción. También se indica en la parte inferior el grado de polimerización aproximado correspondiente a cada señal.

Tabla 1. Pesos moleculares de levana sintetizada en condiciones de bajo peso molecular, 10 U/mL pH 6.0, buffer de acetatos 50 mM con 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, determinados por GPC al término de la reacción.

| <b>Sacarosa mM</b> | <b>Fructosa mM</b> | <b>S/F</b> | <b>pm KDa</b> |
|--------------------|--------------------|------------|---------------|
| <b>292</b>         | 292                | 1 / 1      | 7.36          |
| <b>292</b>         | 876                | 1 / 3      | 4.84          |
| <b>292</b>         | 1460               | 1 / 5      | <<3           |

Por otro lado, se estudió el mismo efecto a condiciones de síntesis del perfil bimodal, cuando se ha demostrado que se favorece la síntesis de levana de alto peso molecular. Como se ha explicado ya, es probable que el mecanismo de síntesis cambie a una forma procesiva lo que explica que la levana alcance un alto peso molecular. Para estos experimentos se empleó una concentración de enzima equivalente a 1 U/mL, condición a la que se ha demostrado se obtiene una distribución bimodal que contiene tanto a la levana de alto como la de bajo peso molecular. Se encontró que, aunque no se puede determinar con exactitud el peso molecular promedio de la distribución de levana de alto peso molecular, la presencia de fructosa también la afecta, ya que conforme aumenta la concentración de fructosa, disminuye la síntesis de levana de alto peso molecular (figura 7).

En el 2012, Mena, midiendo la actividad de SacB sobre sacarosa en presencia de fructosa (empleando una concentración 0.05 µM de enzima), llegó a la conclusión de que ésta no actúa como inhibidor. Sin embargo, en los experimentos anteriores se puede observar como al aumentar la concentración de fructosa el rendimiento de producto alcanzado a un tiempo determinado disminuye. Para analizar con mayor detalle este efecto, se realizó un estudio cinético empleando la relación más alta de fructosa/sacarosa y se comparó con una reacción control en la que se usó únicamente sacarosa como sustrato

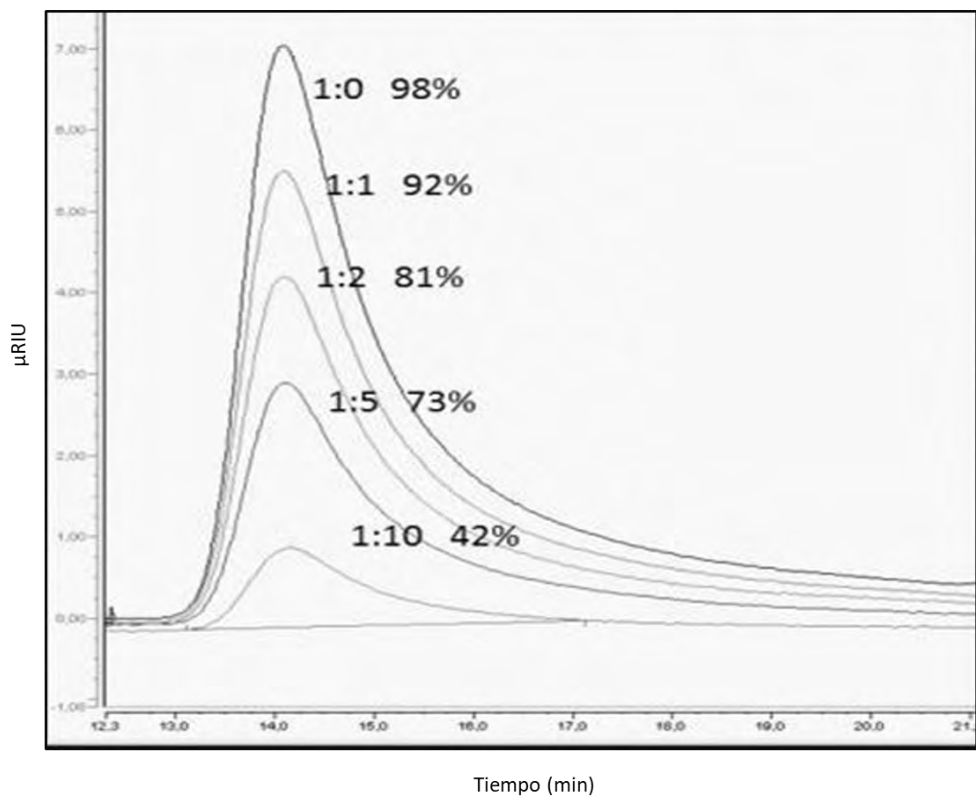


Figura 7. Cromatograma obtenido por GPC que muestra el perfil de la distribución de levana de alto peso molecular obtenido en presencia de diferentes concentraciones de fructosa cuando se emplea una concentración de SacB equivalente a 1 U/mL, después de 24h de reacción. Se indica en cada experimento los respectivos porcentajes de conversión y de relación sacarosa: fructosa.

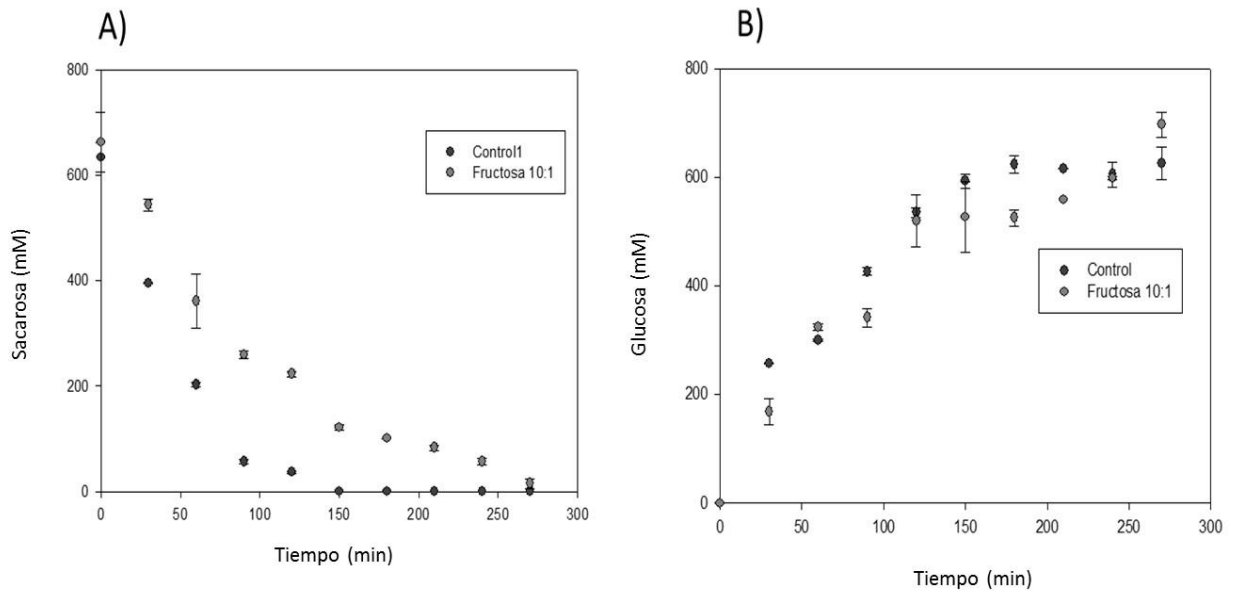


Figura 8. Estudio cinético de una reacción de SacB (1 $\mu$ M) a 200 g/L de sacarosa, empleando una relación molar sacarosa: fructosa de 1:10, comparado con una reacción control sin fructosa A) Evolución del consumo de sacarosa y B) Evolución de la liberación de glucosa.

En el estudio cinético descrito en la figura 8, se puede observar que la velocidad de consumo de sacarosa en presencia de fructosa con respecto al control es menor, dando la impresión de un posible efecto inhibitor de la fructosa sobre la actividad de SacB. Sin embargo, al agregar al análisis la comparación de las velocidades de liberación de glucosa de la reacción con fructosa y la reacción control, se concluye que la velocidad global se mantiene sin diferencias significativas. En la reacción control (sin fructosa agregada al inicio), la sacarosa es utilizada tanto como molécula donadora como aceptora, por lo que la liberación de glucosa es un indicativo de la transferencia de grupos fructosilo de acuerdo con el mecanismo de reacción antes descrito (ver figura 2). La presencia de altas concentraciones de fructosa desde el inicio de la reacción da lugar a una competencia entre la sacarosa y la fructosa por aceptar el grupo fructosilo, lo que trae como consecuencia un menor consumo de sacarosa como aceptor con respecto al control, aunque la velocidad de liberación de glucosa se mantenga sin cambios significativos. Por otro lado, si analizamos la evolución de la concentración de fructosa (figura 9) observamos un comportamiento variable, con una ligera disminución durante en los primeros tiempos de reacción seguida de un ligero aumento y con un consumo global al término de la reacción habiendo sido de 274 mM de fructosa. Esto es debido primero al exceso inicial de fructosa, seguido por una combinación de reacciones que incluyen el consumo de fructosa como aceptor, y su producción derivada de la hidrólisis de sacarosa y eventualmente de la hidrólisis de los productos de la reacción.

Analizando la evolución de los productos de la reacción en presencia de un exceso de fructosa, descrita en las figuras 8 y 9 mediante HPAEC-PAD (figura 10), se observa que inicialmente se sintetizan FOS con un GP de 2, y que conforme la reacción avanza se producen FOS con mayor grado de polimerización siguiendo un mecanismo aparentemente no procesivo.

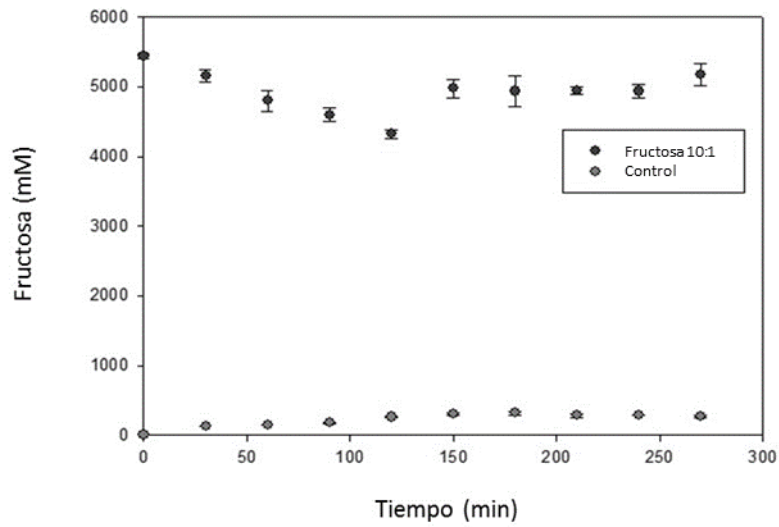


Figura 9. Estudio cinético de una reacción de SacB empleando 10 U/mL, 200 g/L de sacarosa pH 6.0 a 37°C, empleando una relación molar sacarosa:fructosa de 1:10, comparado con una reacción control sin fructosa. Evolución de la fructosa en el medio de reacción.

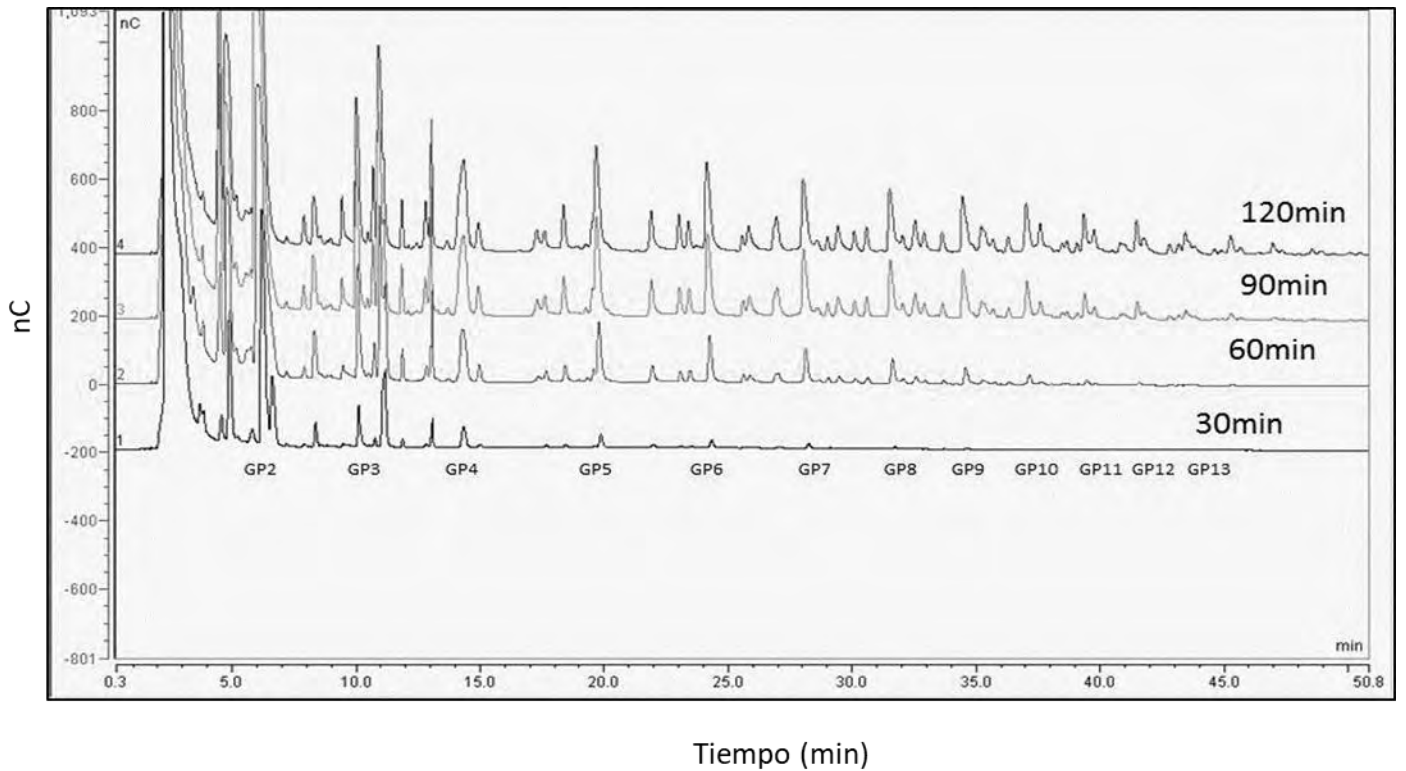


Figura 10. Evolución de la reacción de síntesis de FOS empleando la enzima SacB a pH 6.0 37°C 200 g/L de sacarosa 10 U/mL con una relación de fructosa de 10:1.

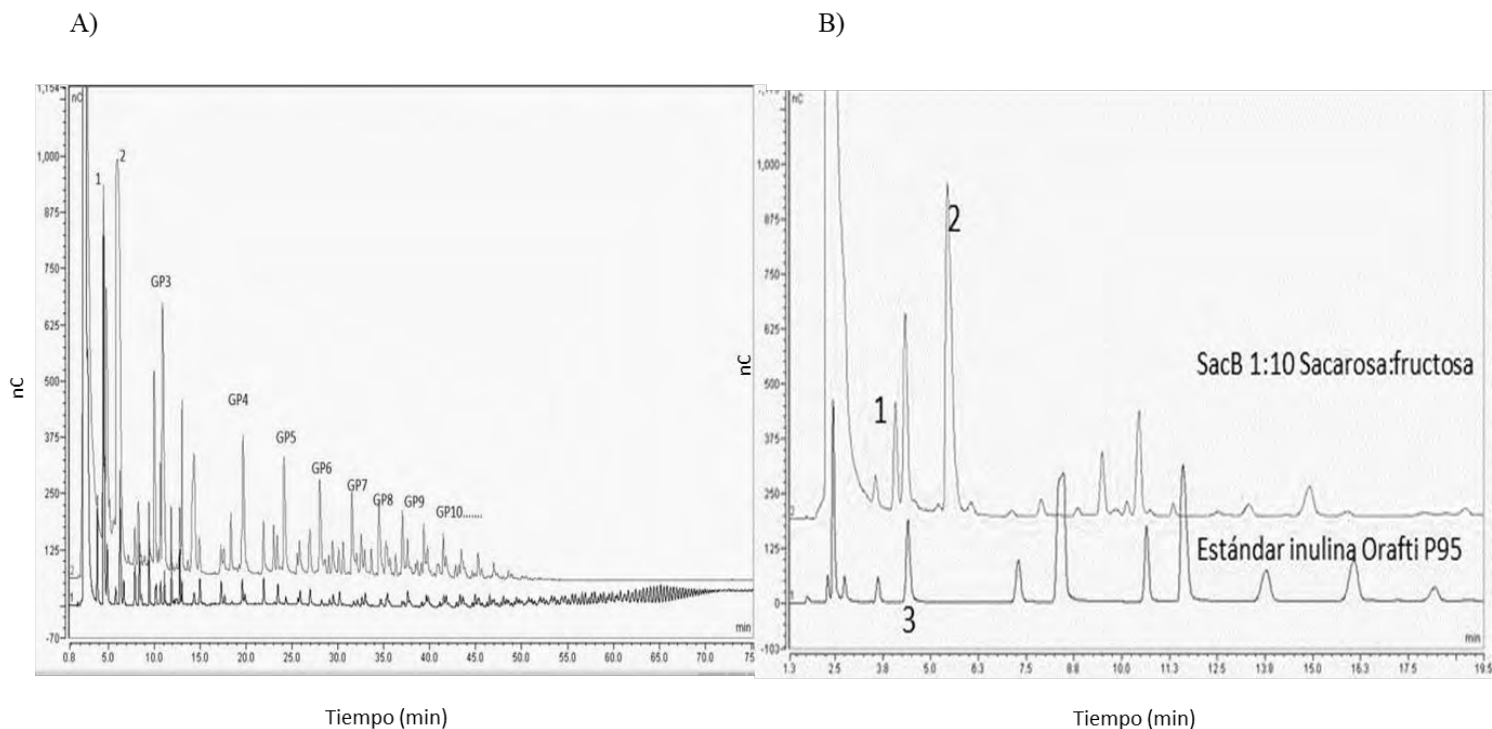


Figura 11. A) Cromatograma en HPAEC-PAD que muestra el perfil de productos empleando una relación sacarosa: fructosa 1:10 y el control con sacarosa. 1) blastosa 2) levanobiosa. B) Comparación con el estándar de inulina. 3) inulobiosa

Al comparar el perfil de productos al final de la reacción en presencia y en ausencia de fructosa, (figura 11) no sólo se demuestra el incremento en la intensidad de FOS (probablemente pertenecientes a la serie  $F_n \beta$  (2-6) con fructosa reductora terminal), sino también se observa la aparición de productos que no se sintetizan en condiciones normales, como es el caso de la inulobiosa, disacárido compuesto por dos fructosas unidas por un enlace  $\beta$  (2-1).

En conclusión, se presenta un cambio en el perfil de productos debido a la presencia de fructosa, que a mayor concentración compite mejor con la sacarosa como aceptor, dando lugar a la presencia en el medio de reacción de fructooligosacáridos con glucosa terminal (serie  $GFn$ ) derivados de la sacarosa, y en mayor proporción de fructooligosacáridos con fructosa reductora terminal (serie  $F_n$ ), inhibiendo la elongación de las cadenas hasta polímero. Este cambio de perfil ocurre durante una reacción convencional de síntesis de levana, conforme la sacarosa va disminuyendo, la fructosa generada por la reacción de hidrólisis comienza a jugar un papel importante como molécula aceptor, por lo que la



presencia de cadenas con extremos reductores (Fn) se incrementa teniendo al final una mezcla de productos con glucosa terminal y fructosa terminal.

#### 8.1.2 Cuantificación de extremos reductores en las cadenas de levana.

Como se observó en los resultados anteriores, los oligosacáridos que aumentan su proporción en presencia de altas concentraciones de fructosa (figura 11 a), están presentes en menor proporción en la reacción control. En un experimento en el que se midió el poder reductor de una solución de levana purificada de bajo peso molecular al 10% p/v, que dado el peso molecular promedio de la levana (7.6 KDa), encontramos que alrededor del 50% de las cadenas de levana poseen un extremo reductor. Esta misma solución de levana al ser tratada con NaBH<sub>4</sub> siguiendo el protocolo descrito por Abdel-Akher & Smith (1951), da lugar a una levana sin extremos reductores que no reacciona con el DNS, el reactivo empleado en el método del DNS para cuantificar azúcares reductores. En efecto, el NaBH<sub>4</sub> reacciona únicamente con los carbonos anoméricos libres reduciéndolos a manitol o sorbitol. En la figura 12 se muestra un cromatograma del perfil de productos antes y después de tratar con NaBH<sub>4</sub>, en el que se observa la disminución de una señal y la aparición de otra después de dicho tratamiento. Al hidrolizar en su totalidad a la levana modificada con NaBH<sub>4</sub>, y midiendo las concentraciones de sorbitol, manitol, fructosa y glucosa, es posible obtener evidencias más cercanas a la estructura de la levana (tabla 2).

Los resultados de la tabla 2 demuestran que la fracción de levana de bajo peso molecular posee cadenas con fructosas terminales. La relación entre glucosa y fructosa terminales es de casi 4, es decir, hay aproximadamente un 80% de cadenas con glucosa terminal en la fracción analizada.

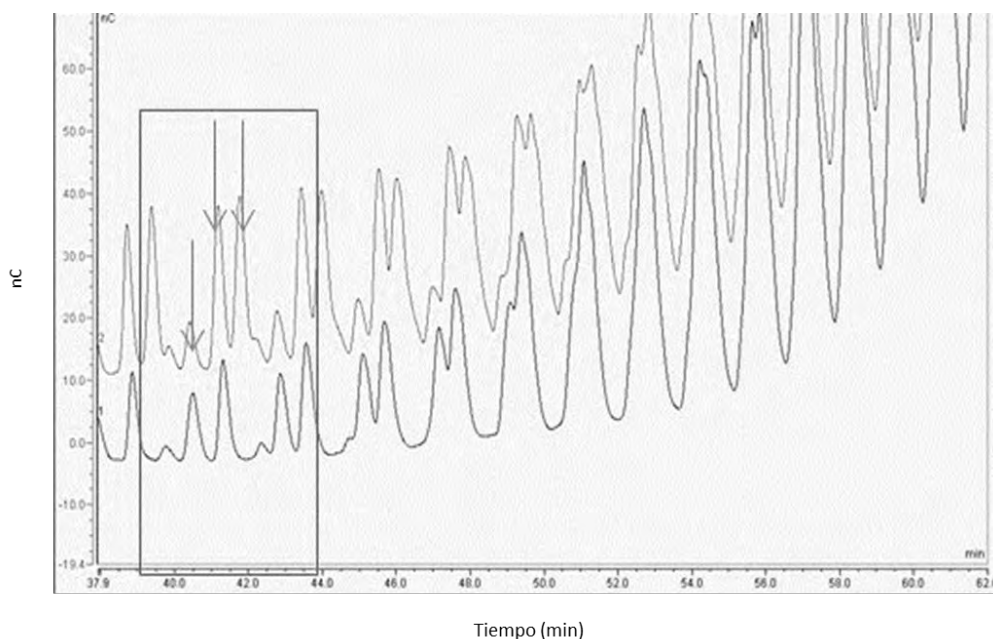


Figura 12. Cromatograma en HPAEC-PAD que muestra el perfil de productos de levana de bajo peso molecular antes (negro) y después (gris) de tratar la levana con  $\text{NaBH}_4$ .

Tabla 2. Determinación de Glucosas, Fructosas totales y fructosas terminales.

|                             | Concentración (mM) |               | Relación      |  |
|-----------------------------|--------------------|---------------|---------------|--|
| <b>Fructosa</b>             | <b>763 ± 53</b>    | <b>F/G</b>    | <b>52.181</b> |  |
| <b>Glucosa</b>              | <b>14.6 ± 0.93</b> | <b>F/Fter</b> | <b>196.64</b> |  |
| <b>Fructosas terminales</b> | <b>3.88 ± 0.45</b> | <b>G/Fter</b> | <b>3.76</b>   |  |

Moulis et al.(2006) al estudiar el mecanismo de reacción de la dextranasa, enzima que de manera análoga a la levansaccharasa sintetiza un polímero de glucosa a partir de sacarosa, reportaron que al inicio de la reacción predomina la hidrólisis de la sacarosa sobre la transferencia de glucosa para hacer polímero, generando fructosa y glucosas libres. Estos autores demuestran también que glucosa y fructosa son utilizados posteriormente como moléculas aceptoras, encontrando extremos reductores con glucosas terminales y extremos no reductores con moléculas de sacarosa terminales dentro de las cadenas de dextrana (oligosacáridos de glucosa). En el caso de la levansaccharasa de SacB, en los tiempos

iniciales de reacción, la relación hidrólisis / trasfructosilación depende principalmente de la concentración de sacarosa y de la actividad enzimática.

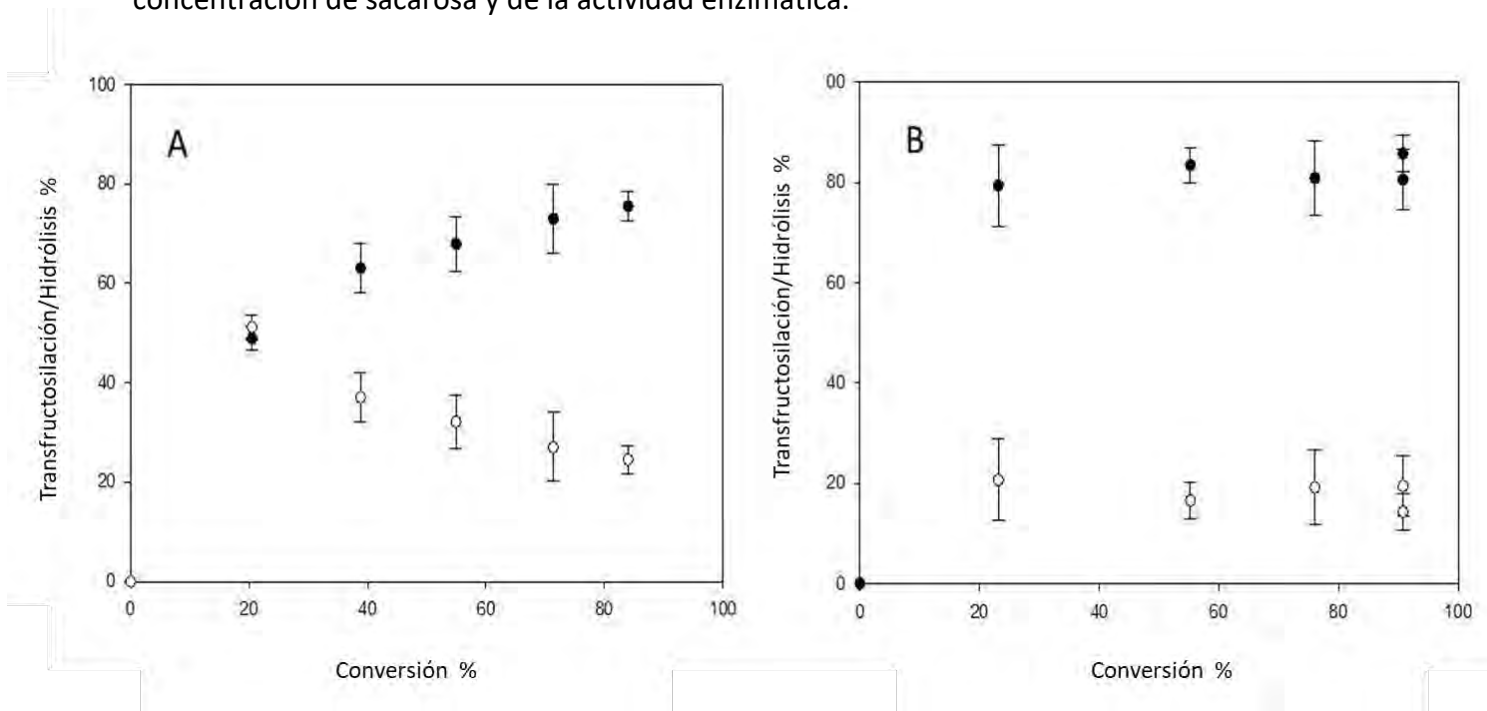


Figura 13. Comportamiento cinético de la hidrólisis (círculos abiertos) y transferencia (círculos cerrados) en función de la conversión de sacarosa. a 37°C y pH 6.0. A) Condiciones de síntesis de levana de bajo peso molecular 600 g/L y 10 U/mL de SacB. B) 200 g/L y 0.1 U/mL

En la figura 13 se observa que en condiciones de síntesis de levana de bajo peso molecular, la reacción de hidrólisis predomina sobre la de transferencia al inicio de la reacción, y va en aumento conforme la reacción continua. Por otro lado, en condiciones de síntesis de levana de alto peso molecular predomina la transferencia, la relación hidrólisis/transferencia manteniéndose en alrededor de un 20 % / 80 % desde comienzos de la reacción. Raga et al. 2013, encontraron que en la síntesis de polímero de bajo peso molecular las moléculas de polímero u oligofruktanans con fructosas terminales se encuentran en mayor proporción que en las condiciones de síntesis de levana de alto peso molecular. Como demostramos aquí, lo anterior está relacionado con la tasa de hidrólisis que hay al inicio de la reacción en las condiciones de síntesis de levana de bajo peso molecular. Una concentración baja de enzima actúa lentamente y encuentra suficientes moléculas de sacarosa en el proceso para

recibir el residuo fructosilo, mientras que una rápida transferencia –alta enzima- encuentra mayores posibilidades de transferir el residuo fructosilo al agua y eventualmente a la sacarosa. Estos últimos resultados dieron origen a una reciente publicación en el grupo de trabajo (Porrás-Domínguez et al. 2015).

### 8.1.3. Ausencia de fructosa en las síntesis de levana con SacB.

Otra estrategia diseñada para observar el efecto que tiene la fructosa en las condiciones de síntesis de levana, consiste en eliminar del todo la presencia de fructosa en la reacción. Para ello se realizó un experimento agregando ácido bórico, con el fin de secuestrar a la fructosa conforme es liberada en el transcurso de la reacción. El ácido bórico forma un complejo con los grupos OH 4 y 5 de la fructosa en forma pirano que es como predomina dentro del equilibrio que distintas configuraciones mantienen en solución (figura 14). La hipótesis detrás de este experimento es que por impedimento estérico la fructosa complejada no pueda ser utilizada como molécula aceptora.

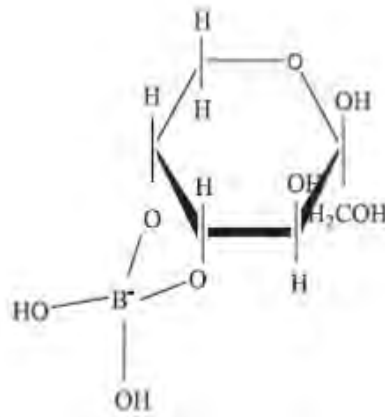


Figura 14. Estructura del complejo fructosa-ácido bórico. Kim N. et al. (2008).

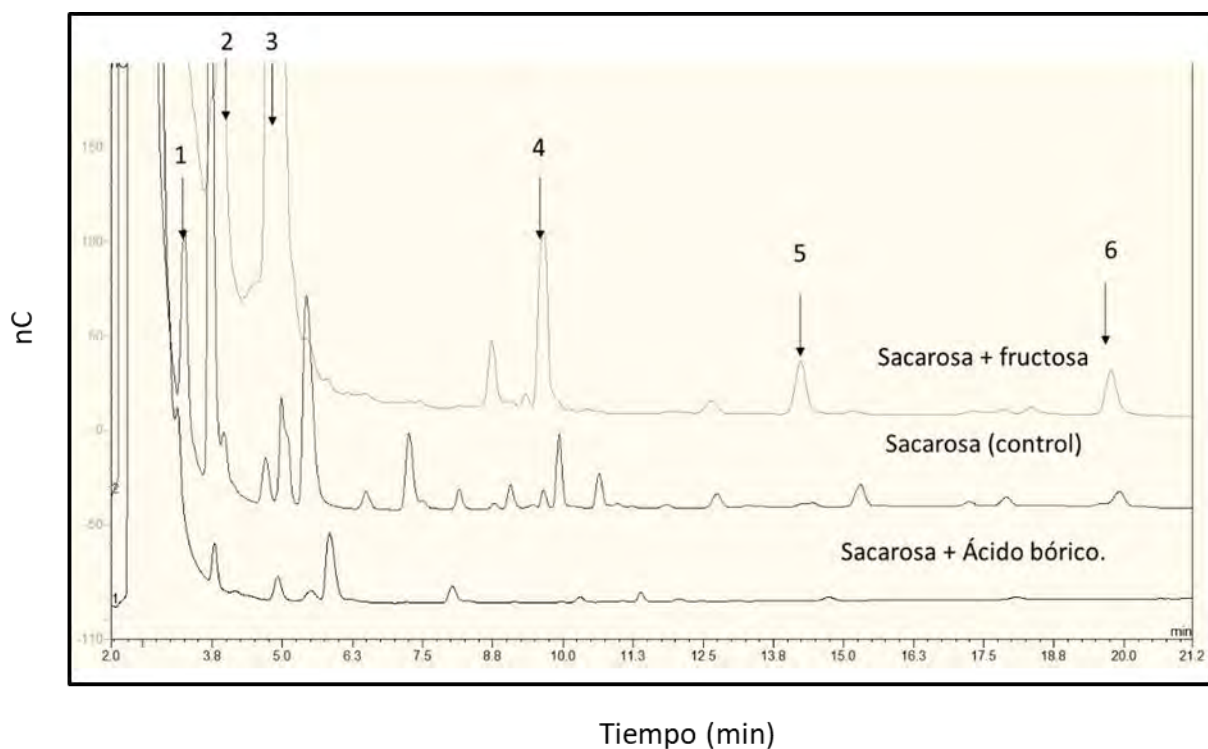


Figura 15. Análisis del perfil de productos obtenidos mediante reacciones con diferentes condiciones relativas a la fructosa presente en la reacción. a) Reacción control sacarosa 100 g/L, 10U/mL de SacB, Reacción en presencia de boratos: sacarosa 100 g/L, 10 U/mL de SacB con una relación molar de sacarosa: ácido bórico de 1:3. Reacción en presencia de fructosa: Sacarosa 100 g/L, 10 U/mL de SacB con una relación 1:3 de sacarosa: fructosa. Los productos se identifican por flechas: 1 inulobiosa, 2 blastosa, 3 levánobiosa, 4 levánotriosa, 5 levánotetraosa y 6 levánopentosa..

En la figura 15 se observa que, al agregar ácido bórico al medio de reacción, se inhibe la síntesis de cadenas de levana con fructosas terminales. Este efecto se observa claramente cuando se comparan las señales de los productos de la serie Fn, señalados con una flecha en la figura 15, productos que se incrementan considerablemente en presencia de fructosa (reacción con sacarosa: fructosa 1:3). Sin embargo, esta inhibición de la síntesis de cadenas a partir de fructosa con ácido bórico sólo se observa claramente hasta un GP de 5. Con el fin de demostrar si existe un efecto más allá de este grado de polimerización se purificó el polímero por precipitación en etanol y se cuantificaron los extremos reductores mediante el tratamiento con  $\text{NaBH}_4$  descrito en la sección anterior. De esta forma, se encontró que la levana tiene un valor de 0.78 mM de fructosas terminales medidas como sorbitol y manitol. Si comparamos este resultado con la medición de fructosas realizada en condiciones control (sin su secuestro con ácido bórico) encontramos que las fructosas reductoras terminales disminuyeron casi 5 veces. De esta manera se logró bloquear la transferencia a fructosa en

una reacción convencional, demostrando que la fructosa liberada en la hidrólisis afecta el perfil de productos obtenidos, dando lugar a una mezcla de polímeros y oligosacáridos de las series GF<sub>n</sub> y F<sub>n</sub> en la que predominan los primeros

#### 8.1.4 Equilibrio de las estructuras conformacionales de la fructosa en solución.

Como hemos demostrado, la fructosa en calidad de molécula aceptora es clave en la diversidad de estructuras obtenidas en la síntesis de FOS y de levana, ya que da lugar a una serie de oligosacáridos y polisacáridos con extremos reductores. Hemos demostrado diversas estrategias mediante las cuales la relación entre productos de la serie F<sub>n</sub>/GF<sub>n</sub> puede modificarse, en un extremo mediante un exceso de fructosa con respecto a la sacarosa, y en el otro, mediante un secuestro de la fructosa libre en el medio de reacción. Dado su carácter de aceptor relativamente débil, se requiere de concentraciones altas de fructosa para poder observar un cambio radical en el perfil de los productos. La reactividad de la fructosa está estrechamente ligada al equilibrio químico en el que se encuentran los 4 conformeros que la molécula adquiere en solución, como se muestra en la figura 16.

El conformero predominante (65%) es la forma  $\beta$ -piranosa, estructura en la que la fructosa tiene comprometido el grupo hidroxilo del carbono 6 enlazado con el carbono anomérico, lo que le imposibilita actuar como molécula aceptora en la reacción con la levansacarasa. Esto se debe a que es el grupo hidroxilo del carbono 6 el que lleva el ataque nucleofílico sobre el carbonilo, una vez formado el intermediario fructosil-enzima para la formación del enlace glicosídico. El conformero más adecuado para actuar como molécula aceptora, para la formación del enlace  $\beta$  (2-6), es la  $\beta$ -furanosa, con el hidroxilo del C<sub>6</sub> libre, tal como se encuentra dentro de la molécula de sacarosa y de las cadenas de levana en elongación. Dado que en solución acuosa sólo un 25% de la fructosa se encuentra como  $\beta$ -furanosa, se requiere de altas concentraciones de éste para un buen rendimiento de productos con fructosas reductoras terminales.

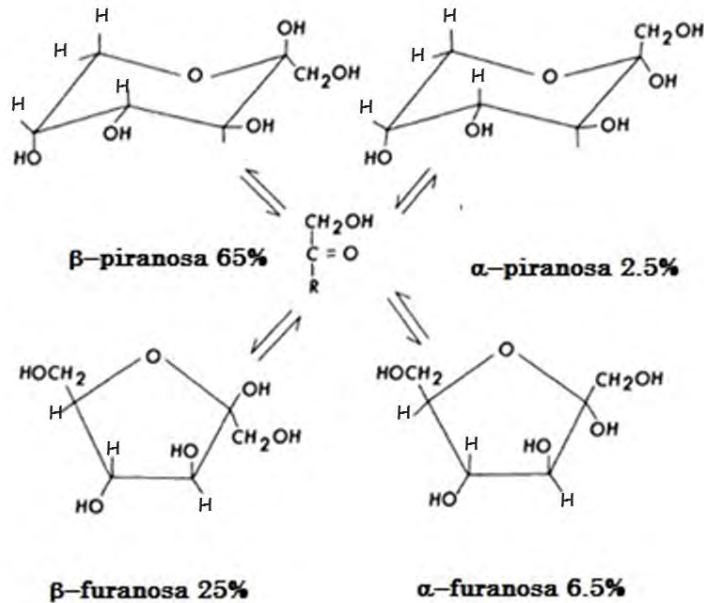


Figura 16. Equilibrio de los confórmers de la fructosa a 35° C.

### 8.1.5. Productos finales de la síntesis de levana

Ahora que sabemos que la fructosa puede actuar como molécula aceptora en una reacción de SacB con sacarosa y que la molécula de levana puede ser una molécula donadora de grupos fructosilo, es interesante preguntarse sobre las condiciones a las cuales la reacción alcanza el equilibrio. Es decir, cuál es la distribución de productos al final de una reacción de síntesis en la que los productos de hidrólisis (glucosa y fructosa) pueden ser aceptores de la transferencia de fructosa (eventualmente regenerando sacarosa) y el producto levana, aunque 150 veces más lento, puede también ser sustrato donador de grupos fructosilo (Méndez-Lorenzo et al. 2015). Para contestar esta pregunta se realizó el siguiente experimento: A una reacción de síntesis de levana con 292 mM de sacarosa y empleando 10 U/mL, una vez consumida la sacarosa (tras 60 min de reacción) se agregó nuevamente

levansacarasa hasta alcanzar una actividad total de 50 U/mL. La reacción fue monitoreada durante 300 min, con los resultados que se muestran en la figura 17.

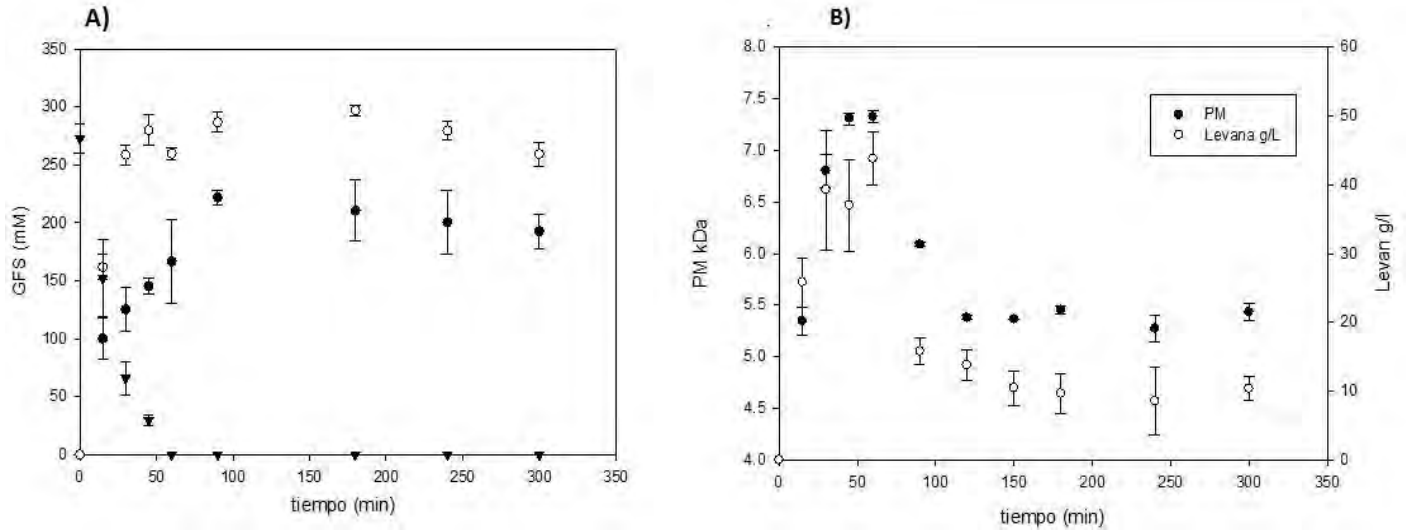


Figura 17. Evolución de la reacción de la síntesis de levana de bajo peso molecular a tiempos largos de reacción. círculos claros glucosa, círculos negros fructosa y triángulos sacarosa. B) Evolución del peso molecular y la concentración de levana

En esta reacción se observó que alrededor de los 60 min de reacción, una vez consumida la sacarosa, la levana alcanza un peso molecular promedio de 7.5 KDa determinado por GPC. Después de hacer la segunda adición de levansacarasa, la concentración de fructosa aumenta, disminuyendo tanto el peso molecular del polímero (hasta 5.2 kDa) como su concentración (hasta un 25% del valor inicial). Estos valores se mantienen después de los 120 min de reacción. El porcentaje de levana residual concuerda con lo reportado por Mendez-Lorenzo et al (2015) en reacciones en las que incubó levana de bajo peso molecular con levansacarasa. Esta fracción residual de levana de alrededor de 5.2 kDa, tiene una estructura que pareciera ser inaccesible para la enzima lo que detiene a la reacción. Esta característica fue reportada previamente por Dedonder R et al. (1963), quienes demostraron que se requiere de un tratamiento con una enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa para modificar la levana y hacerla accesible a la levansacarasa SacB. El final de la reacción estaría determinado por la estructura de la levana que impide que esta sea tomada como molécula



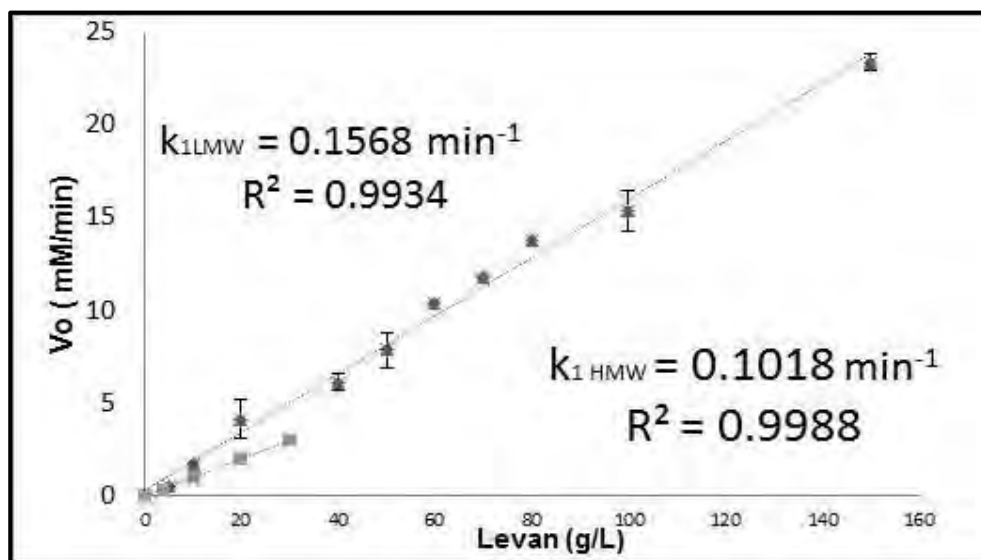
donadora. Para comprobar esta hipótesis, se podrían llevar a cabo estudios para determinar el contenido de ramificaciones y el grado de cristalinidad de la levana residual, que no es capaz de ser hidrolizada por la levansacarasa.

## 8.2 Estudio de LevB1

### 8.2.1. Especificidad de la endolevanasa LevB1.

La endolevanasa LevB<sub>1</sub> es una enzima recientemente caracterizada en nuestro grupo de trabajo (Porrás et al 2012), es una glicosil hidrolasa perteneciente a la familia 32, que actúa de forma endo, es decir, hidroliza enlaces internos de una cadena de levana. En ese estudio se determinaron las condiciones óptimas de la enzima a pH 6.0 y 37°C, así como que posee un comportamiento cinético de primer orden al hidrolizar la levana producida por SacB. También se observó que el perfil de productos generados por la hidrólisis de levanas de distintos orígenes da como resultado el mismo patrón de señales analizados por HPAEC-PAD, independientemente del peso molecular de la levana.

Para continuar con la caracterización de esta endolevanasa, con la finalidad de emplearla en un sistema simultáneo, se estudió la diferencia que existe en cuanto a la velocidad de hidrólisis de las dos distribuciones de levana, la de 7.6 KDa y una levana de alto peso molecular mayor a 2000 KDa, que puede producir la levansacarasa SacB.



Figura

Figura 18. Estudio cinético de la endolevanasa LevB<sub>1</sub> empleando como sustrato levana de bajo peso molecular (LMW) y levana de alto peso molecular (HMW) ambas producidas por la levansacarasa de SacB. 37 °C pH 6.0.

En este estudio se observó nuevamente un comportamiento lineal para ambas distribuciones, encontrándose que a bajas concentraciones del sustrato las velocidades son muy parecidas (menores a 10 g/L de levana), sin embargo, la constante de primer orden obtenida con la levana de bajo peso molecular es 1.5 veces mayor que la que se observa al utilizar una levana con una distribución de alto peso molecular (figura 18). Esta característica debe ser tomada en cuenta para el estudio del sistema simultáneo, ya que como ya se mencionó previamente, el perfil de la distribución de pesos moleculares varía con la concentración de levansacarasa.

Por otro lado, se evaluó la especificidad de la endolevanasa con sustratos más pequeños como la sacarosa, encontrándose que no es capaz de hidrolizarla entre otras moléculas que son acumuladas por la levansacarasa durante la reacción de síntesis de levana como la 1-kestosa y 6-kestosa. (figura 19). Se incubó una solución de sacarosa a 100 g/L empleando una concentración de endolevanasa de 1  $\mu$ M a las condiciones óptimas de la enzima durante 24 h, al final del tiempo se determinó el poder reductor sin observar cambios, indicando que la endolevanasa no es capaz de hidrolizar la sacarosa. En un segundo experimento, se incubó durante 24 h una mezcla de 1-kestosa y 6-kestosa en presencia de 1.0  $\mu$ M de endolevanasa. A las 24 h de reacción se observó mediante HPAEC-PAD que estos compuestos no fueron hidrolizados, (figura 19). Al emplear la endolevanasa en un sistema simultáneo, estos productos se acumularían permitiendo enriquecer el perfil de productos obtenido en ese sistema, sumando a esto el hecho de que la endolevanasa no es capaz de utilizar a la sacarosa como sustrato, ya que este es un sustrato exclusivo de la levansacarasa, se favorecerían la producción de levano FOS en un sistema simultáneo.

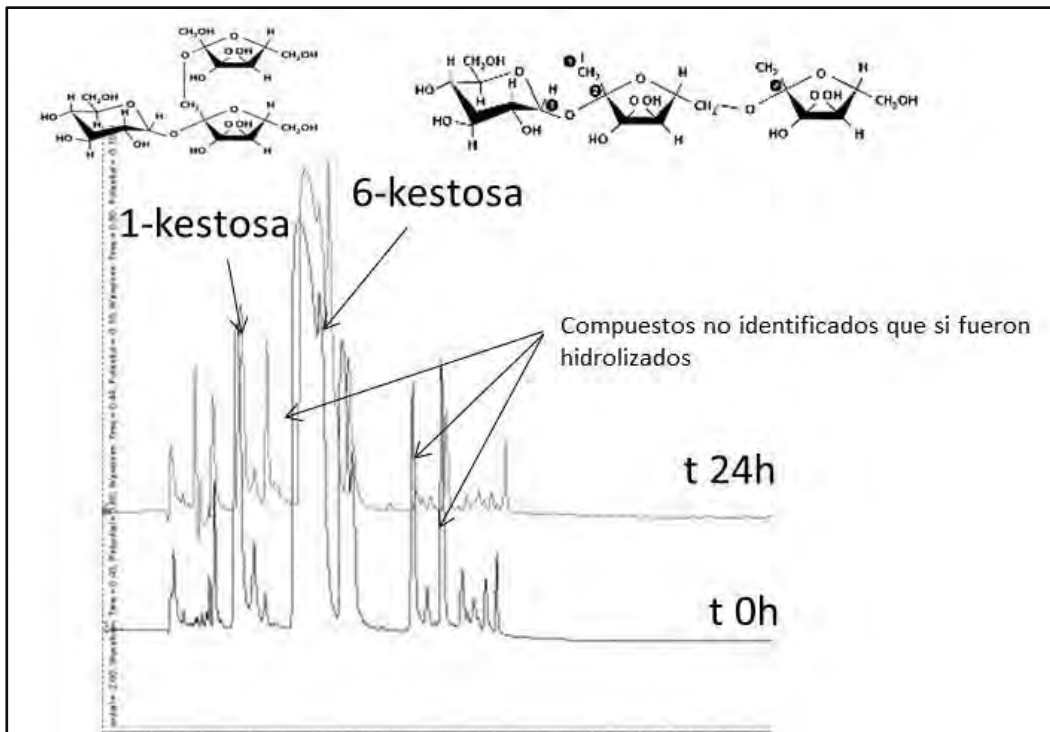


Figura 19. Acción de la endolevanasa sobre GF2: 1-kestosa y 6-kestosa, después de 24 horas de reacción empleando  $1\mu\text{M}$  de Lev $B_1$  a  $37^\circ\text{C}$  pH 6.0 empleando un buffer de acetatos 50mM y 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

En los estudios reportados de la endolevanasa Lev $B_1$  (Porrás et al 2012), se observó en una reacción de hidrólisis de levana, que una vez consumido el sustrato, la concentración de fructosa sigue aumentando, es decir los FOS pueden seguir siendo hidrolizados, por lo que es importante detener la reacción una vez consumida la levana, ya que un exceso de fructosa repercute en los rendimientos en la obtención de FOS. Esta liberación de fructosa se debe a una actividad tipo exohidrolítica, de la endolevanasa al actuar sobre sustratos más pequeños. Para estudiar este fenómeno se llevó a cabo un experimento, en donde se incubaron fructooligosacáridos obtenidos a partir de la hidrólisis de levana empleando a la misma enzima. Esta mezcla de reacción, consistente en FOS con una baja concentración de fructosa libre, se le adicionó  $0.1\mu\text{M}$  de endolevanasa y se monitoreó la liberación de fructosa durante 30 h. Se encontró que Lev $B_1$  posee una actividad muy baja de tipo exohidrolítica con sustratos de un GP entre 2-8 que se refleja por un comportamiento lineal de liberación de fructosa durante las primeras 20 h de reacción (figura 20).

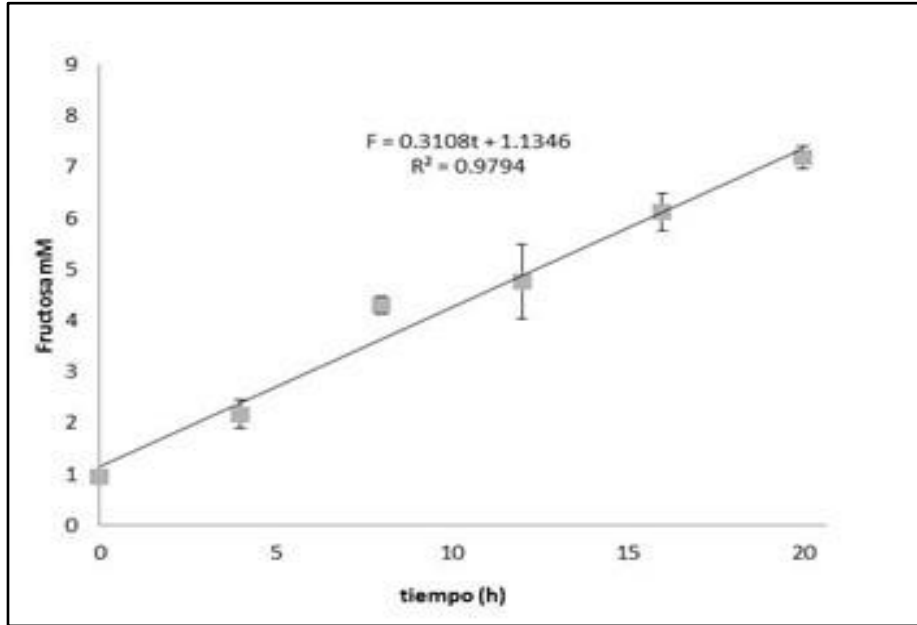


Figura 20. Liberación de fructosa resultado de la actividad tipo exo de la endolevanasa LevB1 utilizando como sustratos fructooligosacáridos, obtenidos por la hidrólisis de levana de bajo peso molecular empleando 100 g/L de levana y 0.1  $\mu$ M de LevB1 con buffer de acetatos 50 mM pH 6.0 a 37°C.

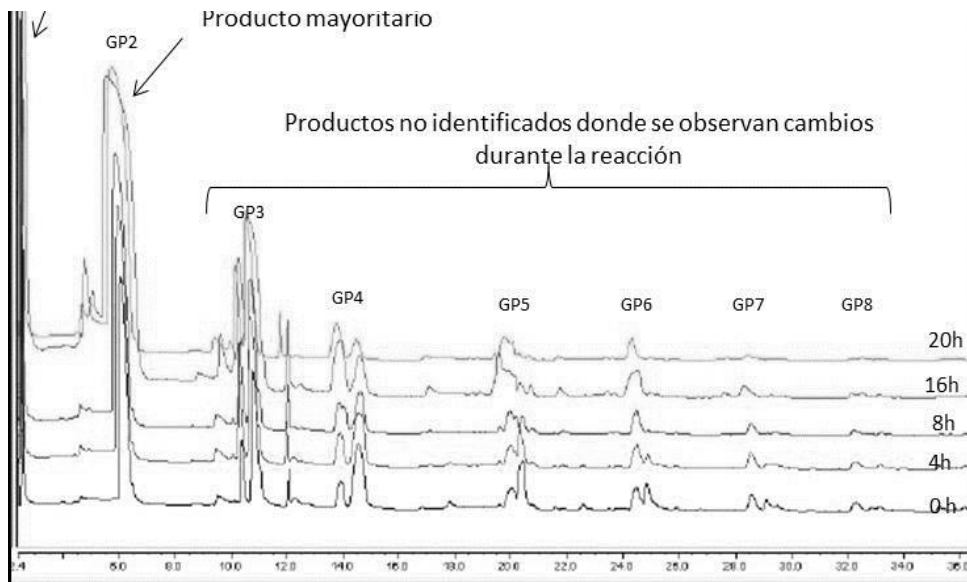


Figura 21. Evolución del perfil de FOS al ser hidrolizados por la endolevanasa LevB1 monitoreados por HPAEC-PAD

En el experimento antes descrito, se analizaron también los cambios de estructura de los FOS a lo largo del tiempo, con el fin de identificar claramente el origen de la fructosa. En la figura 21 se observa el cambio de perfil de FOS a través del tiempo durante la incubación con LevB<sub>1</sub>. Estos resultados demuestran que los productos con un GP $\geq$ 4 son degradados selectivamente por la enzima, ya que, de las señales, que vienen en pares, y que corresponden probablemente a dos productos del mismo GP pero con diferentes estructuras, sólo se observa la disminución de una, al tiempo que se incrementa la intensidad de las señales de fructosa, levanobiosa y del producto con un GP3. Posiblemente los productos que no son degradados posean estructuras ramificadas que impidan el acceso de la molécula al sitio activo de la enzima.

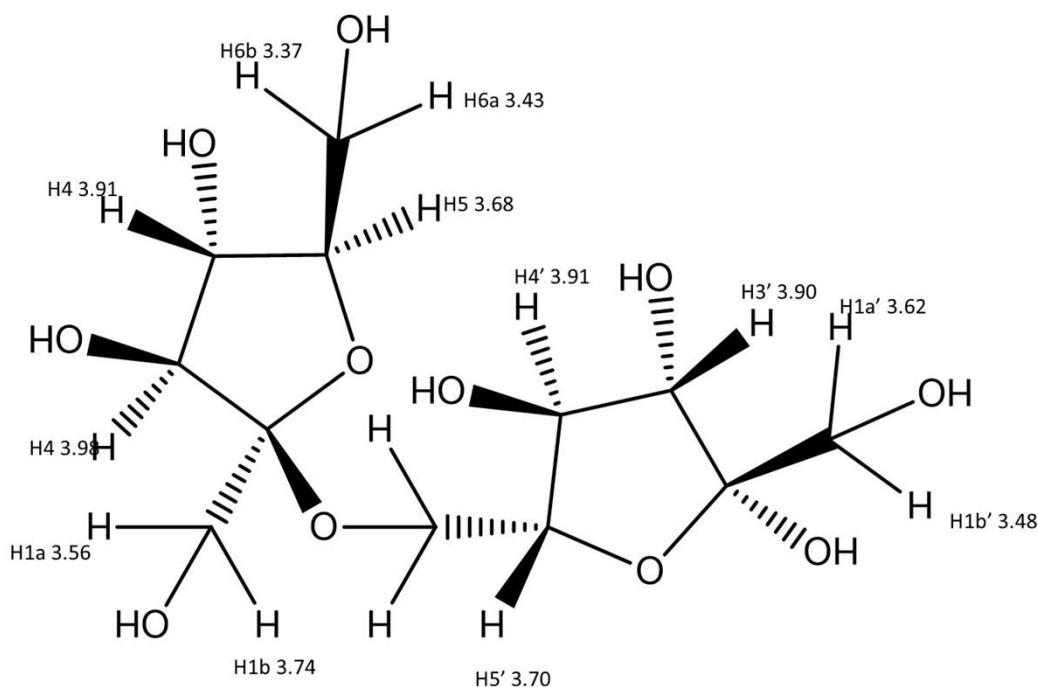
Con este experimento confirmamos que la endolevanasa es capaz de actuar sobre sustratos pequeños de una manera menos específica que con la levana, produciendo principalmente fructosa y levanobiosa.

#### 8.2.2. Identificación y caracterización del producto principal de la endolevanasa LevB<sub>1</sub>.

Pereira et al. (2001), reportaron que el producto mayoritario de la endolevanasa de *B. subtilis* es la levanobiosa, mientras que Miasnikoy (1997) reportó que el producto principal de la endolevanasa de *Bacillus* sp. L7 es la levanotriosa. En una primera instancia, se supuso que el producto de esta endolevanasa podría corresponder tanto a la levanobiosa, como a la levanotriosa, ya que en la HPAEC-PAD, ésta eluye después de la 1-kestosa. Con el fin de dejar claramente demostrada la identidad del producto mayoritario producido por la hidrólisis de levanas empleando LevB<sub>1</sub>, el producto obtenido en la fracción identificada con este azúcar fue purificado a partir de un hidrolizado de 100 g/L de levana de 7.7 KDa previamente purificada. Para la hidrólisis, la levana se sometió a la acción de 0.1  $\mu$ M de

LevB<sub>1</sub> por 3 horas. El producto fue separado por cromatografía preparativa empleando una columna C-18 como fase estacionaria y agua como fase móvil. El producto fue caracterizado por RMN de C<sup>13</sup> y H<sup>1</sup>. Los espectros de RMN fueron adquiridos empleando el equipo Varian Unity NMR espectrómetro a 400 MHz para H<sup>1</sup> y 100 MHz para C<sup>13</sup>. Los desplazamientos químicos fueron reportados en partes por millón referenciados al H<sub>2</sub>O (figura 22).

RMN H1



RMN C13

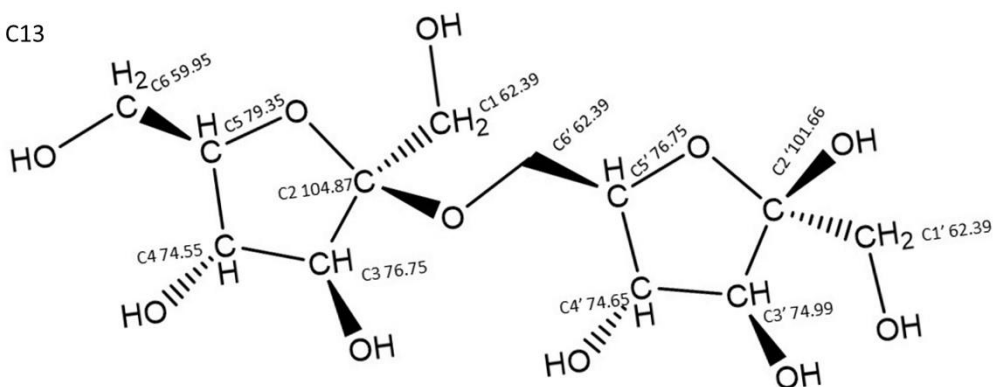


Figura 22. Estructura de la levoglucosa, con las respectivas señales de los desplazamientos (dadas en ppm) químicos en los espectros de H<sup>1</sup> y C<sup>13</sup>.

Los desplazamientos químicos de las señales obtenidas a partir del espectro de  $C^{13}$ , nos indica la presencia de dos carbonos cuaternarios correspondientes a los carbonos anoméricos de las dos moléculas de fructosa, esto es un indicativo que se trata de un dímero, sumando la presencia de 6 carbonos terciarios. Por otro lado, la señal de uno de estos carbonos anoméricos C2 se encuentra más desplazado con un valor de 104.87 ppm, nos podría indicar que se encuentra unido a un grupo electro atractor, en este caso al oxígeno del enlace glicosídico. Las señales obtenidas del espectro de  $H^1$  fueron las siguientes 3.98 (1H, d(doblete),  $J = 8.4$  Hz, H-3); 3.91 (2H, m (multiplete), H-4, H-4'); 3.90 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3'); 3.74 (1H, m, H-1'a); 3.70 (1H, ddd (doble de doble de dobles),  $J = 2.8$  Hz,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 7.3$  Hz, H-5'); 3.68 (1H, ddd,  $J = 2.8$  Hz,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 7.3$  Hz, H-5); 3.65 (1H, dd (doble de dobles),  $J = 2.8$  Hz,  $J = 18.0$  Hz, H-6a); 3.62 (1H, dd,  $J = 2.8$  Hz,  $J = 12.4$  Hz, H-1a); 3.56 (1H, m, H-1'b); 3.48 (1H, dd,  $J = 7.8$  Hz,  $J = 12.2$  Hz, H-1b); 3.45 (1H, dd,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 16.4$  Hz, H-6b); 3.43 (1H, m, H-6'a), 3.37 (1H, m, H-6'b).

Cabe mencionar que mediante este análisis sólo podemos concluir que se trata de un disacárido de moléculas de fructosas, se deduce que se trata de levanobiosa porque proviene de la reacción de la hidrólisis de la levana donde predominan los enlaces  $\beta$  (2-6). Para decir con certeza que se trata de esta molécula deberían incluirse análisis de cromatografía de gases acoplada a masas y cristalografía de rayos X.



### 8.2.3. Síntesis de levano FOS por un sistema secuencial.

Como una primera aproximación al estudio del sistema simultáneo, se llevó a cabo un estudio de síntesis de levano FOS por un sistema secuencial, es decir, en una primera reacción se sintetiza levana a partir de sacarosa empleando la levansacarasa a las condiciones óptimas de síntesis (600 g/L de sacarosa pH 6.0 37°C) y una vez alcanzada una conversión de sacarosa del 90% (6 horas) es adicionada la endolevanasa LevB<sub>1</sub>.

Para este estudio se emplearon 2 variables, la primera consistió en inactivar o no la levansacarasa después de haber llevado a cabo la síntesis de levana y la segunda variable fue modificar la concentración de endolevanasa, con el fin de observar el efecto en el perfil de productos bajo estas condiciones. Por un lado, ya quedó establecido que un posible aumento en la actividad de endolevanasa conlleva a un exceso de actividad hidrolítica que a tiempos largos implicaría un exceso en la liberación de fructosa por la hidrólisis de productos más pequeños. Por otro lado, Pereira et al. (2001) reportaron un posible efecto sinérgico en la hidrólisis de la levana hasta fructosa en un sistema empleando la levansacarasa y la endolevanasa de *B. subtilis*. Estudios recientes en nuestro laboratorio permitieron identificar actividad hidrolasa de SacB sobre levana, aunque con una velocidad 150 veces menor en comparación con su actividad de transferasa sobre sacarosa. Tomando estos antecedentes en cuenta, se planteó la duda de una posible degradación de los productos de la reacción (FOS) por la actividad hidrolítica de la levansacarasa una vez agotada la sacarosa en el medio de reacción.

Los resultados de este estudio se muestran en la figura 23, en la que no se observan diferencias entre las dos reacciones, con levansacarasa activa e inactiva, en términos de la concentración de fructosa libre a lo largo del tiempo. Este resultado permite concluir que la actividad hidrolasa de la levansacarasa sobre los FOS en estas condiciones es despreciable y no influye en la estabilidad de los productos de reacción. En cuanto al aumento en la

velocidad de liberación de fructosa, como ya se ha mencionado, esta se debe a que la endolevanasa posee una actividad exo hidrolítica que se intensifica al aumentar la concentración de enzima.

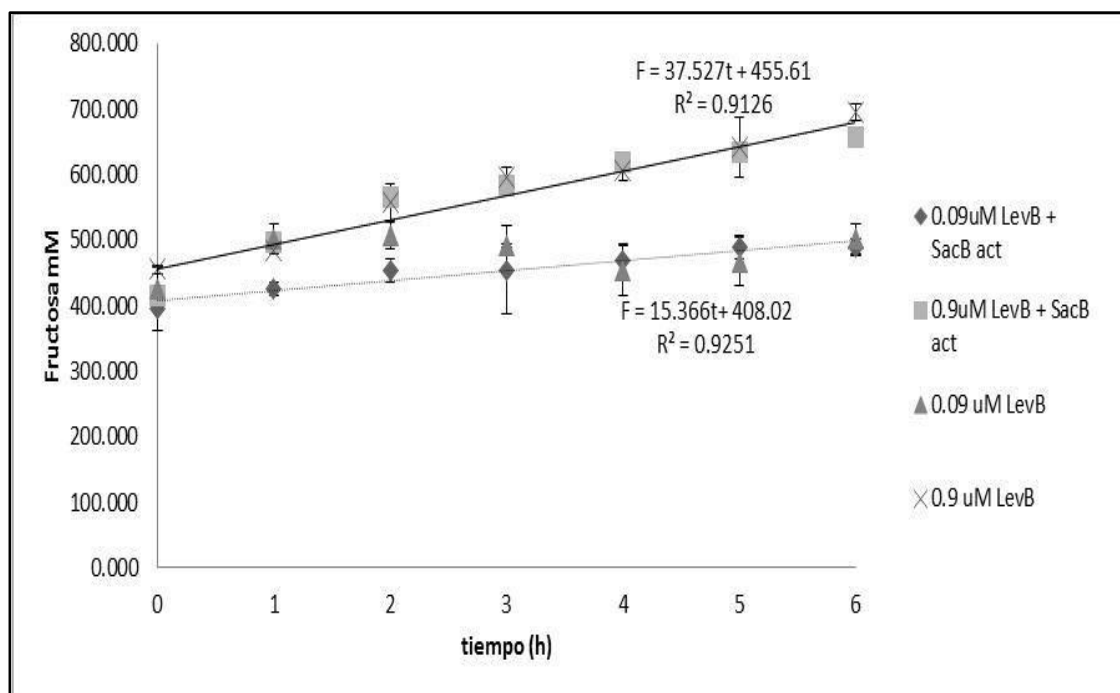


Figura 23. Liberación de Fructosa a diferentes relaciones molares de SacB/LevB1 en un sistema secuencial con levansacarasa (SacB) activa e inactiva.

Finalmente, el perfil de productos obtenido mediante este sistema fue analizado por HPAEC-PAD y comparado con el previamente reportado en (Porrás et al 2012). El perfil previamente reportado es lo que llamamos “hidrolizado de levana” que se obtiene a partir de una levana purificada previamente por precipitación en etanol, es decir se elimina toda una gama de FOS que no precipitan. Estos FOS si se encuentran presentes en este sistema secuencial, ya que provienen directamente de la síntesis de levana a partir de la sacarosa por la enzima levansacarasa durante la primera reacción (figura 24).

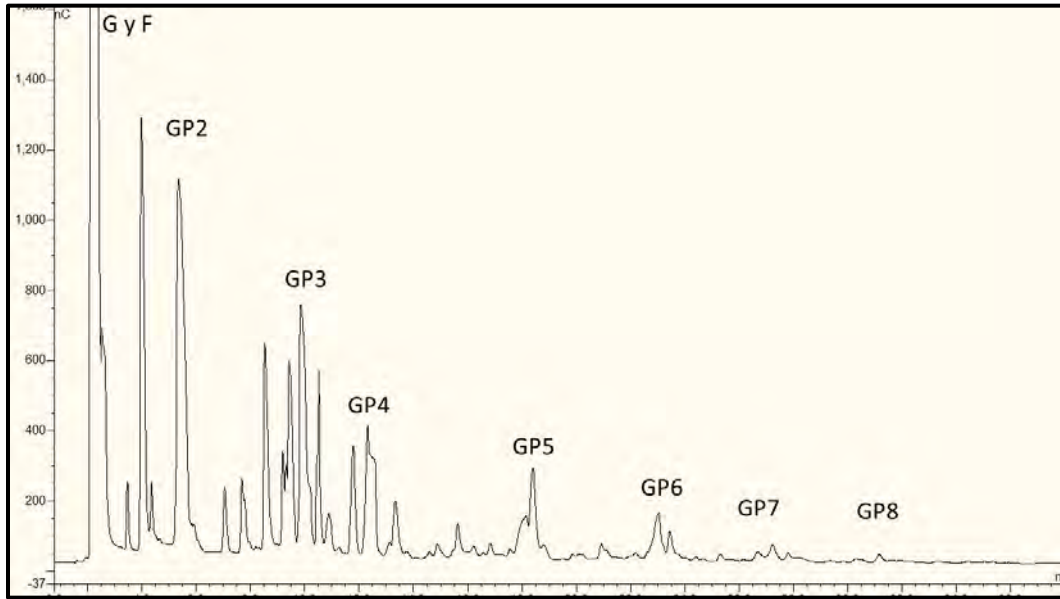


Figura 24. Perfil de Productos obtenidos del sistema secuencial empleando  $1.0 \mu\text{M}$  de LevB<sub>1</sub> (3h de reacción, después de la síntesis de levana llevada a cabo empleando  $1.0 \mu\text{M}$  de SacB, 600 g/L de sacarosa, pH 6.0 37°C. G y F indican las señales correspondientes a la glucosa y fructosa. GP# indica el probable grado de polimerización de cada señal o grupo de señales.

### 8.3 Estudio del sistema simultáneo SacB/LevB<sub>1</sub> para la síntesis de levano-FOS

#### 8.3.1 Influencia de la relación levansacarasa/endolevanasa en Un sistema simultáneo para la producción de levano FOS.

Con el fin de caracterizar el comportamiento del sistema bi-enzimático, a partir de antecedentes experimentales en los que se definieron las características individuales de las dos enzimas, se evaluó el comportamiento cinético del sistema en reacciones a diferentes relaciones molares de SacB/LevB<sub>1</sub>. En una primera serie de experimentos se llevaron a cabo reacciones en las que se cuantificó la concentración de fructosa, glucosa y sacarosa durante la evolución de la reacción, en condiciones en las que se mantuvo fija la actividad levansacarasa a una concentración de 1.0  $\mu\text{M}$  y 0.1  $\mu\text{M}$  equivalentes a una actividad de 10 U/mL y 1 U/mL respectivamente, mientras se variaba la concentración de LevB<sub>1</sub> en un amplio rango (0 a 20 mM) para cada una de las dos concentraciones de SacB. Para caracterizar estos experimentos en términos de la concentración y relación de cada una de las enzimas, se reporta la relación molar (SacB/LevB<sub>1</sub>) y la relación de actividades empleadas en cada reacción, tal como se describe en la tabla 3. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 25.

Tabla 3. Relación de concentraciones y actividades entre la levansacarasa (SacB) y la endolevanasa (LevB<sub>1</sub>) empleadas en la caracterización de la reacción bienzimática simultánea.

| Relaciones molares |                    | Relaciones actividades |           |           |           |
|--------------------|--------------------|------------------------|-----------|-----------|-----------|
| SacB LevB          | SacB $\mu\text{M}$ | LevB $\mu\text{M}$     | SacB U/mL | LevB U/mL | SacB/LevB |
| 1 a 0              | 1                  | 0                      | 10        | 0         |           |
| 1 a 1              | 1                  | 1                      | 10        | 0.1       | 100       |
| 1 a 10             | 1                  | 10                     | 10        | 1         | 10        |
| 1 a 20             | 1                  | 20                     | 10        | 2         | 5         |
| 1 a 0              | 0.1                | 0                      | 1         | 0         |           |
| 1 a 1              | 0.1                | 0.1                    | 1         | 0.001     | 1000      |
| 1 a 10             | 0.1                | 1                      | 1         | 0.1       | 10        |
| 1 a 100            | 0.1                | 10                     | 1         | 1         | 1         |

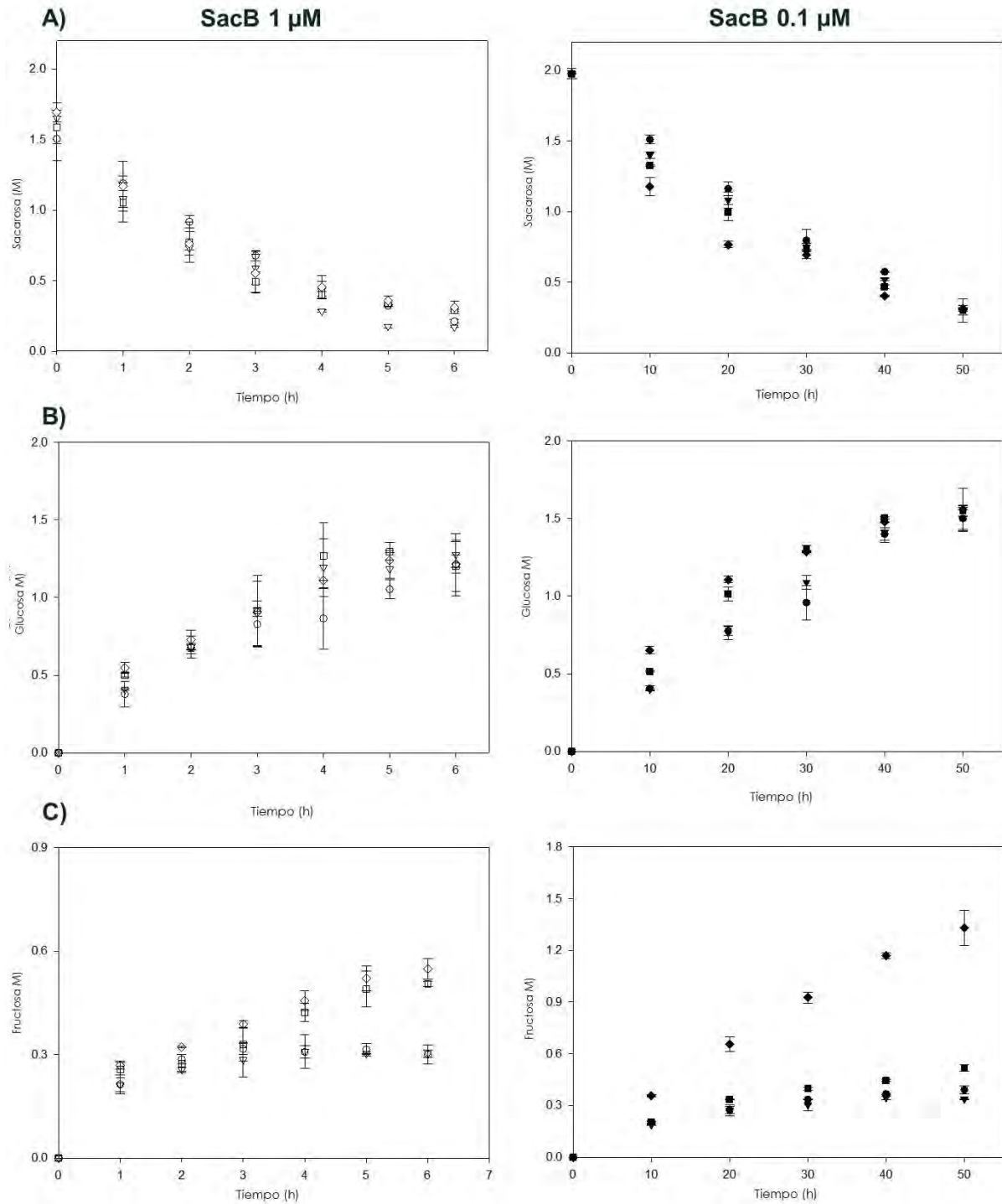


Figura 25. Evolución del A) consumo de sacarosa, B) liberación de glucosa y C) liberación de fructosa a diferentes relaciones de SacB/LevB<sub>1</sub> empleando 600 g/L de sacarosa a 37°C, pH 6.0 50mM de buffer de acetatos con 1mM de CaCl<sub>2</sub>. Las figuras claras representan reacciones a 1  $\mu$ M de SacB a diferentes relaciones molares SacB/ LevB<sub>1</sub> r 1 a 0 (círculo), 1 a 1 (triángulo), 1 a 10 (cuadrado) and 1 a 20 (rombo). Las figuras oscuras representan reacciones a 0.1  $\mu$ M of SacB a diferentes relaciones molares SacB/ LevB<sub>1</sub> 1 a 0 (círculo), 1 a 1 LevB<sub>1</sub> (triángulo), 1 a 10(cuadrado) and 1 a 100 (rombo).

En la figura 25 A se observa el mismo comportamiento en la conversión de sacarosa empleando diferente relación molar de las enzimas, ya que no hay un efecto de la presencia de la endolevanasa ni de sus productos en la velocidad de reacción de la levansacarasa, por lo que se obtienen conversiones de alrededor del 80% en todos los casos.

De igual forma, en la figura 25 B se puede constatar que la evolución de la liberación de glucosa en la reacción presenta un comportamiento similar para cada una de las reacciones llevadas a cabo a diferente relación molar de las dos enzimas, lo que sugiere nuevamente que la actividad global de la levansacarasa no se ve afectada por la presencia de la endolevanasa ni de sus productos. Adicionalmente, se comprueba nuevamente que la endolevanasa no tiene actividad sobre la sacarosa.

Finalmente, es en la liberación de fructosa en el medio donde se constata el efecto de la relación SacB/LevB<sub>1</sub>, ya que ésta aumenta considerablemente conforme se incrementa la concentración de endolevanasa (figura 25 C), por lo que se concluye que la hidrólisis global en la reacción aumenta notablemente cuando existe una mayor actividad endolevanasa, mayoritaria con respecto a la levansacarasa, como se observa claramente en la figura 25 C para las relaciones 1:10 y 1:20 para 1.0 μM de levansacarasa y de 1:100 para 0.1 μM de levansacarasa. Por la misma causa, la liberación de fructosa no se ve afectada cuando se emplea una relación de enzimas menor, incluido el experimento control, que sólo contiene SacB, y, por ende, únicamente se sintetiza levana. Así, podemos concluir que reacciones con un exceso de LevB<sub>1</sub>, es decir de actividad endolevanasa, favorecen la liberación de fructosa en detrimento de los rendimientos de producción de FOS (fructosa transferida), que disminuyen drásticamente, como se ilustra en la figura 25C. Estos resultados concuerdan con los reportados por Goulas et al. (2004) con el sistema bienzimático simultáneo equivalente dextranasa/endodextranasa, en el que constatan un aumento en la hidrólisis al aumentar la concentración de la endodextranasa, con una acumulación rápida de glucosa además de isomaltooligosacáridos con GP de 2 y 3. Esto se explica por el hecho de que la endolevanasa, a pesar de ser una enzima con actividad de tipo endohidrolítica,

posee también una actividad tipo exohidrolítica, difícil de detectar cuando se trabaja a concentraciones bajas de la enzima.

Por otro lado, suponemos que mientras más alta sea la actividad de SacB con respecto a la actividad endolevanasa, las cadenas de levana lograrán elongarse más, y los productos de hidrólisis tenderán a ser cadenas con solamente unidades de fructosa. Sólo el extremo de la cadena contendrá la glucosa de la molécula de sacarosa que dio inicio a la síntesis.

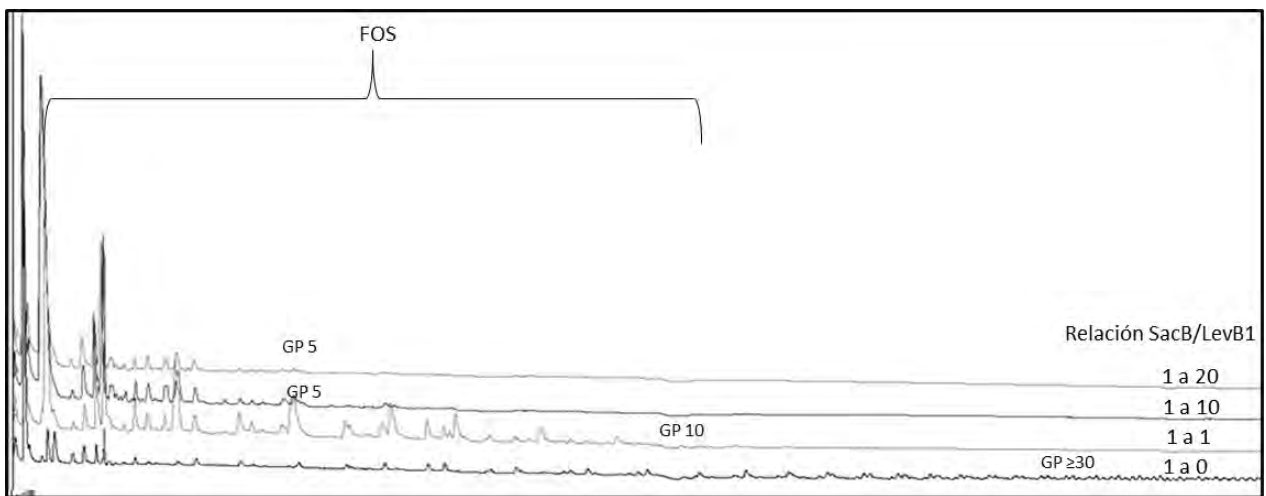


Figura 26. Comparación del perfil de productos al final de la reacción analizando los productos de bajo peso molecular (90% de consumo de sacarosa) por HPAEC-PAD para diversas relaciones molares SacB/LevB1 a 1.0  $\mu$ M de SacB. Las reacciones se llevaron a cabo a pH 6.0 37°C 1.7 M de sacarosa. Se indica el GP máximo alcanzado.

Al analizar el perfil de productos por HPAEC-PAD de muestras tomadas a lo largo de la reacción se observa que al incrementar la proporción de endolevanasa en las reacciones, disminuye el grado de polimerización de los productos. Sin embargo, contrariamente a lo que se esperaba, este comportamiento es resultado de la cinética de la reacción e independiente de la concentración de endolevanasa (figura 26). La diferencia entre estos sistemas simultáneo y el perfil del hidrolizado de levana, radica entonces en el grado de polimerización que se obtiene una vez consumida la sacarosa. Dado que nuestro objetivo es la síntesis de FOS, cuyo grado de polimerización abarca de 2 a 10 unidades de fructosas podemos concluir que la relación de enzimas en la que se obtiene este perfil es de: 1:1 para 1.0  $\mu\text{M}$  de levansacarasa y 1:10 para 0.1  $\mu\text{M}$  de levansacarasa. Un punto importante que mencionar es que en ambos casos la concentración de endolevanasa es la misma (1.0  $\mu\text{M}$ ). Este resultado nos indica que trabajando con relaciones equimolares de las enzimas en la reacción (por ejemplo, a una concentración de a 1.0  $\mu\text{M}$  de ambas enzimas en solución), es posible obtener el perfil deseado de productos. Este resultado es importante como criterio en el diseño de una enzima de fusión. En la tabla 4 se resumen los resultados obtenidos.



Tabla 4. Rendimientos de los diferentes perfiles de productos obtenidos a diferentes relaciones SacB/LevB1.

| SacB<br>( $\mu$ M) | LevB1<br>( $\mu$ M) | Proporción<br>SacB/LevB1 | Levana de<br>alto peso<br>molecular<br>(>2,200 KDa)<br>(g/L) | Rendimiento<br>de productos<br>de alto peso<br>molecular<br>(m/m) % | Productos de<br>bajo peso<br>molecular g/l | Rendimiento<br>de bajo peso<br>molecular<br>(m/m) % | Grado de<br>polimerización<br>de productos de<br>bajo peso<br>molecular |
|--------------------|---------------------|--------------------------|--|---|--|---|---|
| 0.1                | 0                   | NA                       | 82.1 $\pm$ 2.3   | 14.4  | 125 $\pm$ 2.7                              | 22.4  | 30  |
| 0.1                | 0.1                 | 1:1                      | 64.3 $\pm$ 4.1   | 11.2  | 148 $\pm$ 4.6                              | 26.8  | 30  |
| 0.1                | 1                   | 1:10                     | 32.2 $\pm$ 1.2   | 5.6   | 156 $\pm$ 3.7                              | 26.9  | 10  |
| 0.1                | 10                  | 1:100                    | 2 $\pm$ 0.8  | 0.4   | 52 $\pm$ 2.5                               | 9.1   | 10  |
| 1                  | 0                   | NA                       | 0  | 0   | 161 $\pm$ 8.8                              | 36.2  | 30  |
| 1                  | 1                   | 1:1                      | 0  | 0   | 191 $\pm$ 5.4                              | 37.5  | 10  |
| 1                  | 10                  | 1:10                     | 0  | 0   | 128 $\pm$ 2.9                              | 29.1  | 5   |
| 1                  | 20                  | 1:20                     | 0  | 0   | 135 $\pm$ 6.2                              | 28.6  | 5   |

NA: No Aplica

### 8.3.2 Efecto de la concentración de SacB en el sistema bi-enzimático

Como se ha descrito en apartados anteriores, la concentración de levansacarasa es una variable que define el perfil de pesos moleculares en la síntesis de levana. En los estudios cinéticos de la síntesis de FOS con el sistema simultáneo se emplearon 2 concentraciones de SacB: 1  $\mu\text{M}$  (condiciones de síntesis de levana de bajo peso molecular) y 0.1  $\mu\text{M}$  (síntesis de un perfil bimodal). Al analizar el perfil de productos por GPC, en las reacciones simultáneas llevadas a cabo con una concentración de SacB de 1.0  $\mu\text{M}$ , sólo se encontraron polímeros de bajo peso molecular, independientemente de la concentración de endolevanasa, mismos que desaparecen conforme la relación levansacarasa/endolevanasa aumenta. Por otro lado, en las reacciones simultáneas con 0.1  $\mu\text{M}$  de SacB, como es de esperarse, se observa el perfil bimodal de levana en la distribución de pesos moleculares. Al incrementar la concentración de endolevanasa, la fracción de bajo peso molecular disminuye por hidrólisis, mientras que la señal correspondiente a la fracción de alto peso molecular se acumula. De hecho, sólo se observa que la fracción de alto peso molecular comienza a disminuir cuando se emplean concentraciones elevadas de endolevanasa en la reacción, aunque aún en estos casos (1:100), trazas de levana de alto peso molecular son detectadas (figura 27).

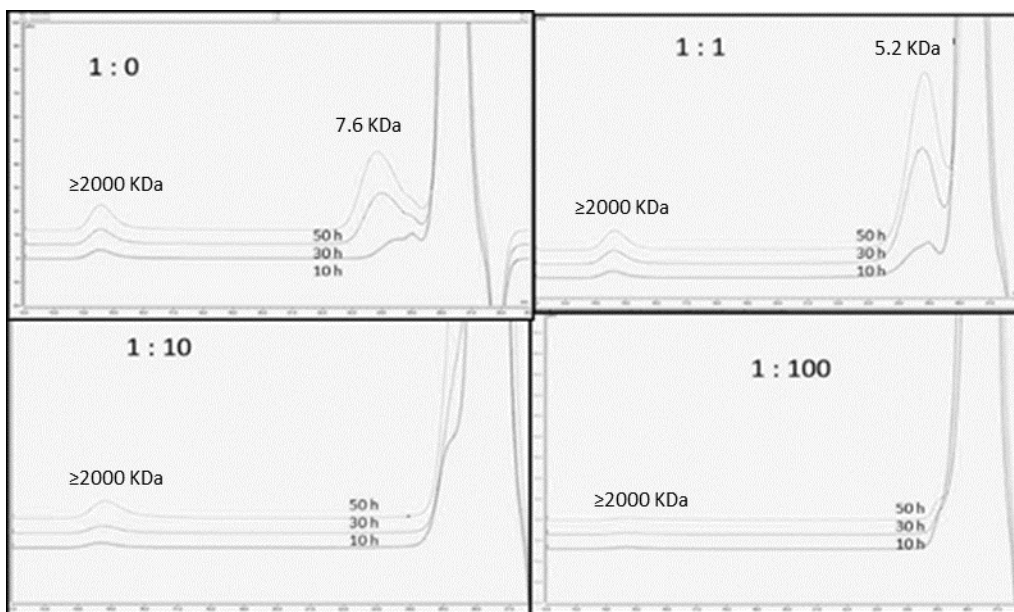


Figura 27. Comparación del perfil de productos por GPC a diferentes tiempos de reacción en reacciones con diferente relación SacB/LevB1 empleando una concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  de levansacarasa a 600 g/L de sacarosa 37°C y pH 6.0.

Una explicación a este fenómeno es que la endolevanasa tiene una mayor afinidad por la levana de bajo peso molecular que por la levana de alto peso molecular, por lo que ésta no desaparece totalmente conforme aumenta la relación de enzimas, como ya se había demostrado en un apartado anterior, en donde se observa que la velocidad de hidrólisis de la levana de bajo peso molecular es 1.5 veces mayor que la de alto peso molecular

### 8.3.3 Comparación de los sistemas secuencial y simultáneo de síntesis de FOS.

En cuanto a la diferencia en el perfil de productos observada entre el sistema simultáneo y el hidrolizado de levana, queda claro que ésta se debe en buena medida a que los productos del proceso simultáneo incluyen a los FOS que se producen durante la síntesis de levana, mismos que en su mayoría contienen glucosas terminales, mientras que el hidrolizado de levana en el proceso secuencial, proviene de una levana previamente purificada por precipitación con etanol en donde fueron eliminados los FOS producto de la síntesis (figura 28).

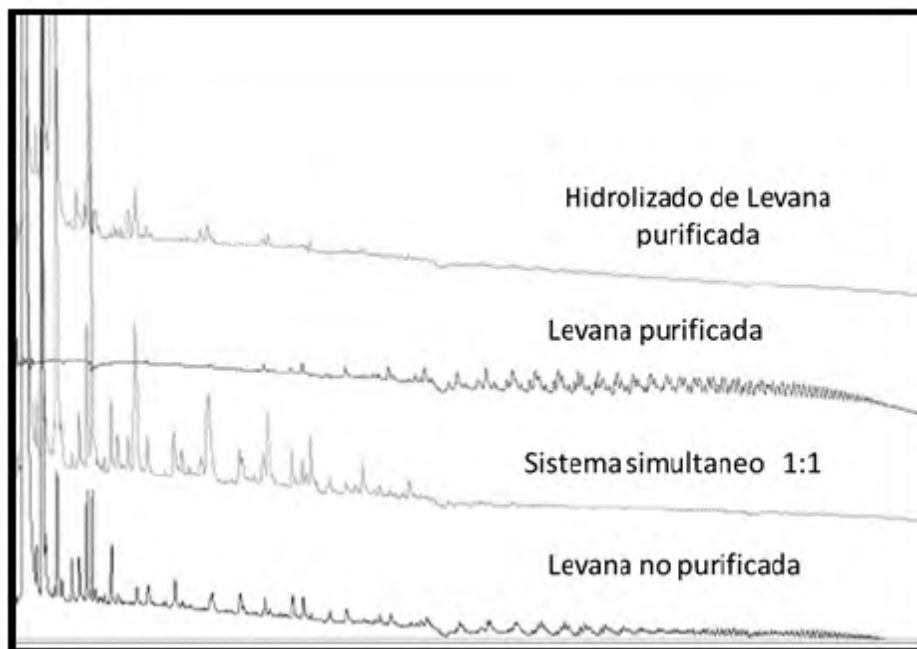


Figura 28. Comparación del perfil de productos de los FOS obtenidos a partir de un hidrolizado de levana purificada con el perfil de la levana purificada. Se incluye también el perfil de FOS obtenido mediante el sistema simultáneo (1:1) y el de la levana sin purificar.

Para estudiar las diferencias en el perfil de productos que se obtienen cuando actúan las dos enzimas de manera simultánea, con respecto al que se obtiene en la reacción secuencial, se llevaron a cabo experimentos empleando levana de bajo peso molecular sintetizada con 1.0  $\mu$ M de levansacarasa y 1.0  $\mu$ M de endolevanasa.

Al comparar los perfiles, no se observó diferencia entre los productos obtenidos en los sistemas secuencial y simultáneo (figura 29). Se puede concluir nuevamente que los productos de la reacción (secuencial y simultánea) consisten en los productos de bajo GP de la reacción de transferencia de SacB, que incluyen de manera preponderante a la 1-kestosa con algunas trazas de 6-kestosa, así como los productos generados por la hidrólisis de la levana mediante la acción de LevB<sub>1</sub>, cuyo producto principal es la levanobiosa.

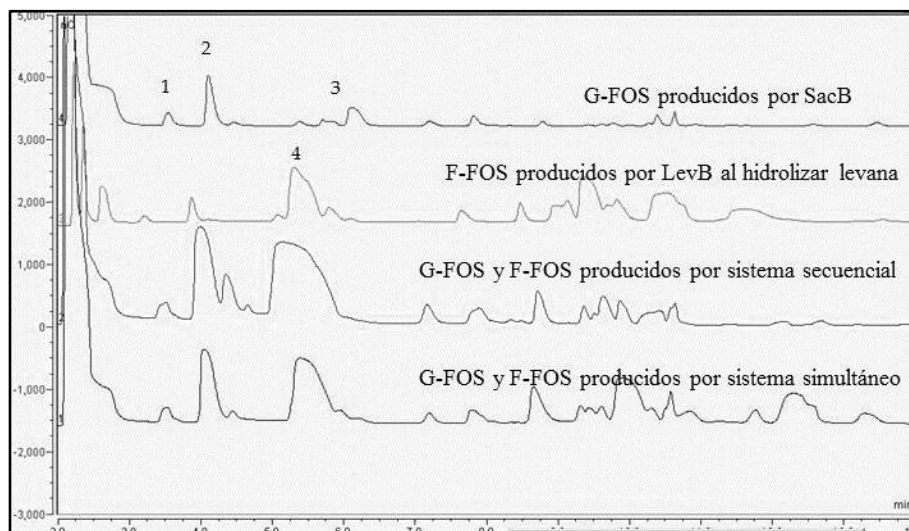


Figura 29. Comparación del perfil de productos de los FOS obtenidos a partir de un hidrolizado de levana purificada, FOS presentes en levana purificada, síntesis de FOS por sistema bienzimático simultáneo y secuencial. Empleando las condiciones óptimas del sistema simultáneo previamente reportado. Dentro de los FOS se identifica a: 1) 1-kestosa 2) blastosa, 3) 6-kestosa, 4) levánobiosa

Otro producto obtenido en la reacción simultánea que es importante mencionar es un análogo de la sacarosa, previamente reportado en la reacción de la levansacarasa de *B. megaterium* (Homann et al 2007). Se trata de una fructosa unida a una molécula de glucosa mediante un enlace  $\beta$  (1-6) denominado blastosa, que puede ser originado por la transferencia del grupo fructosilo hacia la glucosa. Otro origen de este azúcar puede ser la

hidrólisis de la neokestosa, ambas reacciones llevadas a cabo por la misma levansacarasa. En nuestro caso, el producto eluye después de la sacarosa y antes de la 1-kestosa. Finalmente se comprobó que se trataba de blastosa, al compararlo con un estándar sintetizado según lo reportado por (Miranda-Molina et al. 2017).

## 8.4 Diseño de una proteína de fusión LevB<sub>1</sub>SacB

Tomando en cuenta que los mejores rendimientos encontrados en el sistema simultáneo fueron a condiciones equimolares y con el perfil de levano FOS adecuado, se prosiguió con la siguiente estrategia del diseño de una proteína de fusión LevB<sub>1</sub>SacB. Haciendo un sistema más eficiente en la producción de levano FOS, no sólo por el hecho de obtenerlos en un sólo paso de reacción a partir de sacarosa, sino también por el hecho de producir una sola enzima.

La primera etapa del diseño consistió en integrar las secuencias nucleotídicas que codifican para las dos proteínas LevB<sub>1</sub> y SacB, en una sola secuencia LevB<sub>1</sub>SacB agregando un conector de 6 aminoácidos GGSGGS, que en teoría debería facilitar el plegamiento de los dominios. Esta secuencia aminoacídica ha sido empleada previamente para conectar dominios de diferentes proteínas con plegamiento de estructura secundaria de  $\alpha$  hélices y de naturaleza flexible (Arai et al. 2001). Otro aspecto que considerar en el diseño es el hecho de que al arreglarlo en la secuencia propuesta LevB<sub>1</sub>SacB, el dominio no catalítico de LevB<sub>1</sub>, un  $\beta$ -sandwich, queda interpuesto entre los dos dominios catalíticos. En caso de existir problemas de plegamiento entre las dos proteínas, los dominios catalíticos no se verían muy afectados. En los extremos de la región del conector se agregaron dos sitios de restricción BamH1 con el objetivo de poder insertar en esta región diferentes tipos de conectores para escoger el más adecuado para una mejor expresión, plegamiento y actividad enzimática. El gen diseñado fue clonado en el vector pet22b+ y expresado en cepas de *E. coli* Rosseta 2 como se indica en el apartado de metodología. LevB<sub>1</sub>SacB fue purificada siguiendo el mismo protocolo de purificación diseñado para SacB. En la figura 30 se muestra un gel desnaturante de las fracciones recolectadas de la enzima pura LevB<sub>1</sub>SacB con un peso de 107 KDa, de las que se obtuvo un total de 27.23 mg de proteína por litro de fermentación.

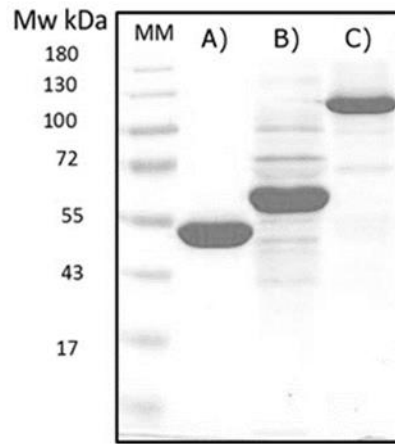


Figura 30. Gel desnaturizante de la fracción pura de proteína de fusión LevB<sub>1</sub>SacB obtenida de la purificación por cromatografía de afinidad a níquel. Carril 1 SacB purificada, carril 2 LevB<sub>1</sub> purificada y carril LevB<sub>1</sub>SacB purificada.

#### 8.4.1 Caracterización bioquímica de LevB<sub>1</sub>SacB.

La caracterización cinética de la enzima de fusión LevB<sub>1</sub>SacB se realizó considerando de manera independiente su actividad levansacarasa y su actividad endolevanasa. En el caso de la primera, usamos sacarosa como sustrato. Se puede suponer que, durante los primeros min de la reacción, no hay aún suficiente producto para la intervención de LevB<sub>1</sub>. Por el contrario, para caracterizar LevB<sub>1</sub>, al usar levana de bajo peso molecular como sustrato, la actividad hidrolítica de la levansacarasa es despreciable, como se señaló en la sección 8.2.3. Ambas actividades se determinaron midiendo la liberación de poder reductor empleando la técnica de DNS.

La figura 31 muestra el comportamiento cinético del componente levansacarasa de la enzima de fusión, mismo que, al igual que la enzima libre, se ajustó a un modelo Michaeliano. Las constantes cinéticas fueron determinadas por un ajuste no lineal empleando Origin 8.0, La tabla 5 muestra las constantes cinéticas de la actividad de levansacarasa obtenidas para la enzima LevB<sub>1</sub>SacB comparadas con las obtenidas para la enzima SacB previamente reportadas por Ortiz-Soto et al. (2008).

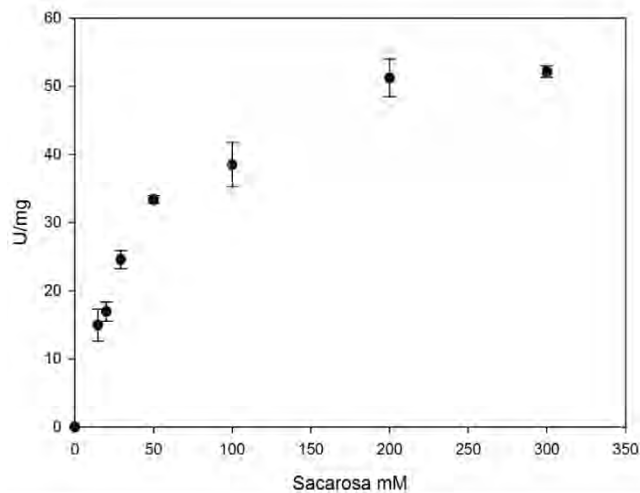


Figura 31. Comportamiento cinético de la actividad levansacarasa de LevB<sub>1</sub>SacB en función de la concentración de sustrato. 37 °C pH 6.0. empleando 0.05 μM de enzima.

Tabla 5. Comparación de las constantes cinéticas de la actividad levansacarasa de SacB y LevB<sub>1</sub>SacB. (pH 6.0, 37°C, buffer de acetatos 50mM con 1 mM de CaCl<sub>2</sub>).

|                             | Km (mM)  | kcat (s <sup>-1</sup> ) | kcat/Km (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------|----------|-------------------------|---|
| <b>SacB</b>                 | 8        | 164.6                   | 20.6  |
| <b>LevB<sub>1</sub>SacB</b> | 46.0±4.9 | 108.7±3.9               | 2.3   |

Como puede observarse en la tabla 5, la fusión hizo perder a SacB tan sólo un 34% de su capacidad de recambio (kcat), manteniéndose en el mismo orden de magnitud, aunque la Km aumentó 5.74 veces como consecuencia de un problema de afinidad hacia la sacarosa en esta nueva estructura. Es probable que la presencia de otro dominio proteico, es decir LevB<sub>1</sub>, desfavorezca por impedimento estérico la difusión de la sacarosa hasta el sitio activo de SacB. Es difícil pensar que la afinidad de la sacarosa por el sitio activo de SacB se



modificara, pero también podría explicar el aumento en la  $K_m$ . En conjunto, ambas pérdidas ocasionaron que la eficiencia catalítica disminuyera 10 veces.

Del mismo modo, en la figura 32 se muestra el comportamiento cinético de la actividad endolevanasa de LevB<sub>1</sub>SacB, comparándolo con el obtenido para la enzima LevB<sub>1</sub>, normalizado a concentraciones molares. Este estudio fue llevado a cabo empleando 2 tipos de levana: una con distribución promedio de peso molecular de 7.7 KDa, sobre la cual ya se había reportado el comportamiento de la enzima endolevanasa y una segunda levana con un peso molecular inferior (3.3 KDa) producida con una mutante de SacB (H243L). La razón de emplear un levana de tan bajo peso molecular deriva de la posibilidad de alcanzar la saturación de la enzima LevB<sub>1</sub>, como se ha observado en algunos reportes para sistemas análogos como el de las inulinasas cuando se utiliza un sustrato de bajo peso molecular (Muñoz-Gutiérrez et al. 2009). Sin embargo, como se observa en la figura 32, la enzima mantiene un comportamiento lineal.

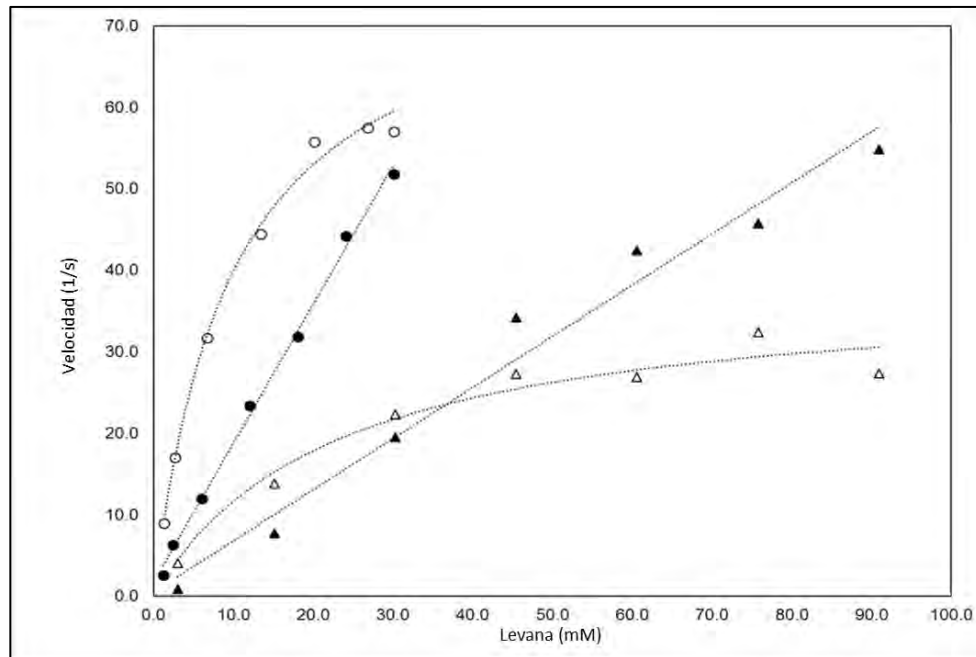


Figura 32. Comportamiento cinético de la actividad endolevanasa de LevB<sub>1</sub>SacB (claros) y LevB<sub>1</sub> (oscuros) en función de la concentración de levana de 7.6 KDa (círculos) y 3.3 KDa (triángulos)

Como ya se había reportado previamente, el comportamiento cinético de LevB<sub>1</sub> se ajusta a un modelo de primer orden, sin que se alcance la saturación de la enzima, obteniéndose una constante de velocidad de reacción de 1.85 s<sup>-1</sup> empleando la levana de 7.6 KDa como sustrato. Por otro lado, el comportamiento cinético de LevB<sub>1</sub> en el contexto de la enzima de fusión se modifica para el mismo sustrato, y de observar un comportamiento tipo Michaelis Menten que logra alcanzar la saturación de la enzima. Así, el comportamiento de LevB<sub>1</sub> dentro de la enzima de fusión con la levana como sustrato se ajustó a un modelo Michaeliano empleando Origin 8.0. Los parámetros cinéticos se reportan en la tabla 6. En la zona de primer orden, la k de primer orden de la LevB<sub>1</sub> de la enzima de fusión es 2.2 veces mayor que la obtenida con la enzima libre, ambos valores empleando la levana de 7.6 KDa. Sin embargo, al usar una levana de peso molecular menor (3.3 KDa), no hay diferencia en las velocidades obtenidas a concentraciones bajas de sustrato (figura 33). En un sistema de reacción simultáneo no se alcanzan los pesos moleculares ni concentraciones de saturación por lo que el comportamiento cinético esperado durante la síntesis del FOS correspondería al observado a bajas concentraciones de levana del más bajo peso molecular (3.3 KDa).

Tabla 6. Constantes cinéticas de modelos de MM que describen la reacción de la endolevanasa dentro de la proteína LevB<sub>1</sub>SacB. La velocidad se midió a pH 6.0 37°C.

|                       | Km (M)      | Kcat (s <sup>-1</sup> ) | Kcat/Km s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> |
|-----------------------|-------------|-------------------------|---|
| <b>Levana 3.3 KDa</b> | 22.91 ± 7.3 | 38.25 ± 3.9             | 1.66                                    |
| <b>Levana 7.6 KDa</b> | 9.74 ± 1.14 | 78.10 ± 3.32            | 8.04                                    |

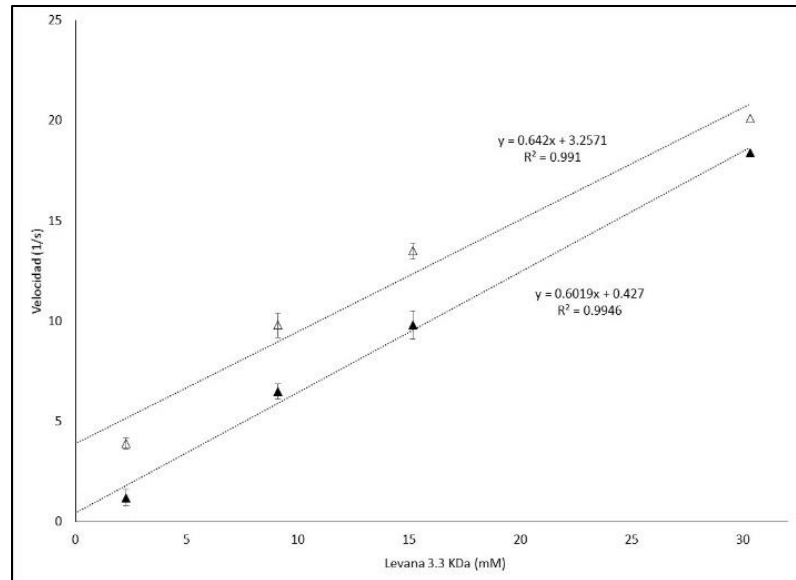


Figura 33. Comportamiento cinético de la actividad endolevanasa de LevB1SacB (triángulos claros) y LevB1 (triángulos oscuros) en función de la concentración de levana de 3.3 KDa a bajas concentraciones de sustrato.

Para comprobar que el aumento de actividad y cambio de comportamiento cinético de LevB<sub>1</sub> incluida en la proteína de fusión fuera exclusivamente resultado de una mayor actividad endolevanasa y no efecto de la actividad exo-levanasa de SacB reportada previamente, se analizaron por HPAEC-PAD los productos obtenidos durante los tiempos iniciales de reacción a la concentración más alta de levana (figura 34). No se observó liberación de fructosa, producto que se obtendría en el caso de tener una actividad exohidrolítica proveniente de SacB, sino únicamente el aumento de otros productos de hidrólisis provenientes de la actividad endolevanasa.

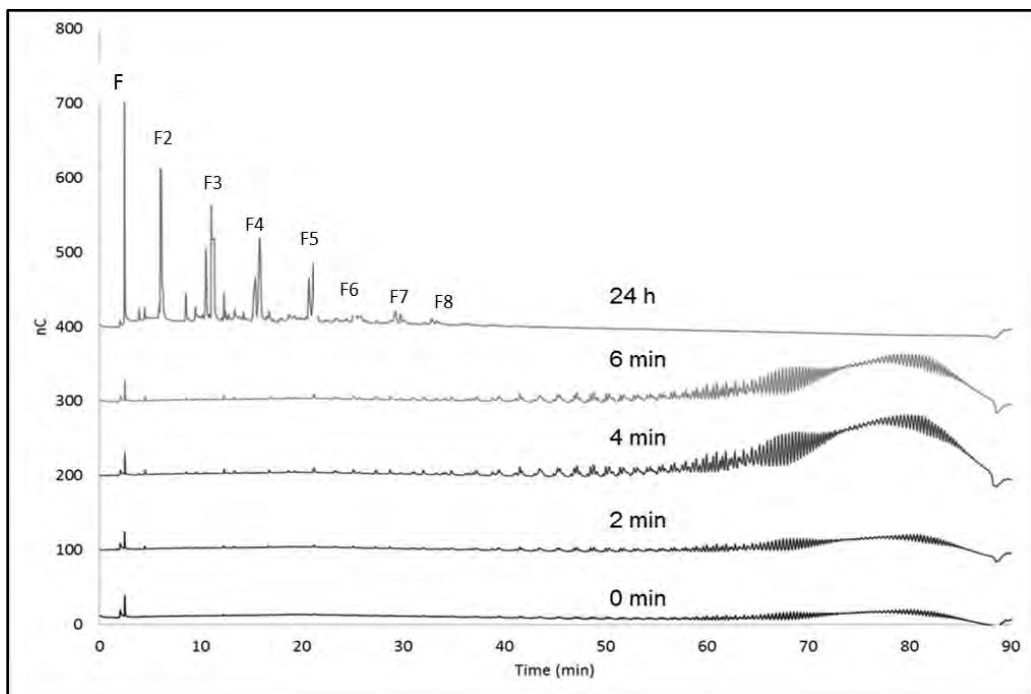


Figura 34. Perfil de productos por HPAEC-PAD a diversos tiempos de reacción, a pH 6.0 y 37°C empleando 30 mM de levana 7.7 KDa. El tiempo de 24h muestra el perfil de productos final indicando el número de moléculas de fructosa que compone cada uno de ellos.

La figura 34 también muestra el perfil de los productos finales obtenidos por la acción hidrolítica de la enzima de fusión: como puede observarse, no hay producción de FOS durante los tiempos iniciales y sólo se observa un cambio de perfil en las señales disminuyendo con respecto al tiempo inicial. Por otro lado, a las 24 h de reacción se observa un perfil similar al obtenido con la enzima LevB<sub>1</sub> previamente reportado por Porras (2012), dentro del cual predomina la levanobiosa.

El cambio de comportamiento cinético de la enzima endolevanasa, nos permite plantear que en unión con SacB se comporta como una enzima diferente, al existir en una región cercana un dominio adicional proveniente de la fusión, es decir, el dominio de levansacarasa. Podría especularse que este dominio contribuye a la reacción con sitios de unión a levana, aumentado así la concentración local de levana, hecho que cinéticamente

se traduce en una mayor afinidad de la endolevanasa por el sustrato, lo que se traduce en una hidrólisis más eficiente de levana. A pesar de que no era este el objetivo al realizar la fusión LevB<sub>1</sub>SacB, da lugar a un fenómeno como el reportado por Cuskin et al. (2012), quienes fusionaron un dominio de unión a carbohidrato de SacC a una exolevanasa de *Bacteroides thetaiotaomicron*, aumentando la afinidad por la levana. Por otro lado, Kim et al. (2009) al fusionar una dextransacarasa y una dextranasa encontraron un aumento de actividad de esta última del 150% en comparación con la enzima libre.

#### 8.4.2 Estabilidad térmica de LevB<sub>1</sub>SacB

Se determinó la estabilidad térmica de la proteína de fusión incubándola a 37°C, pH 6.0 a diferentes tiempos, y determinando la evolución de ambas actividades (figura 35). Se encontró que el componente levansacarasa de la enzima de fusión es más estable que el componente endolevanasa, observándose una ligera desactivación de esta última tras haber transcurrido 48 h. Al término del experimento, la enzima de fusión pierde un 25% de su actividad endolevanasa inicial en comparación con la enzima libre que mantiene el 100% de actividad en estas condiciones, según datos previamente reportados (Porras, 2012).

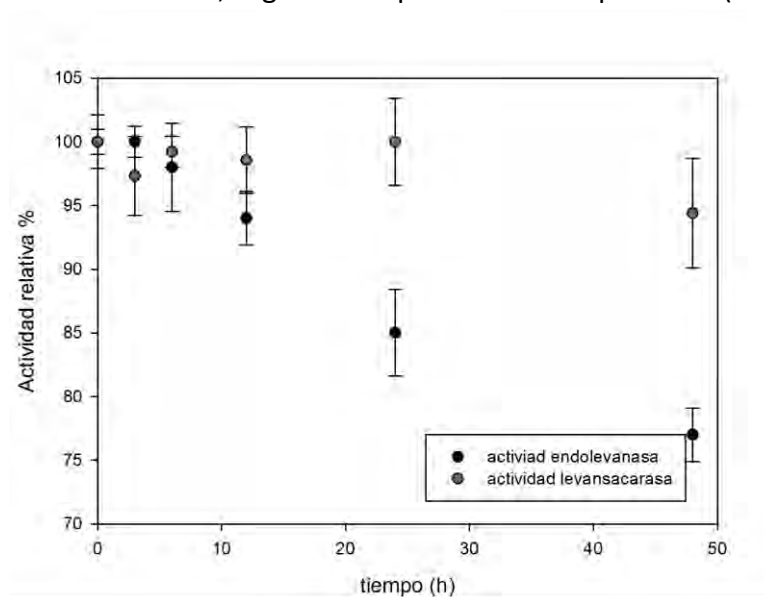


Figura 35. Estabilidad de LevB<sub>1</sub>SacB a 37°C pH 6.0 empleando 0.1 μM de enzima

La desactivación de la endolevanasa de LevB<sub>1</sub>SacB se ajusta a un modelo de primer orden obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.9799, con una constante de desactivación de primer orden equivalente a un tiempo de vida media de 121.6 h a 37°C. A pesar de ser menos estable a la temperatura de trabajo que la enzima LevB<sub>1</sub> libre, su tiempo de vida media puede seguir considerándose como alto.

Es importante señalar que en el caso de la proteína de fusión que cataliza dos reacciones que se llevan a cabo secuencialmente, resulta más conveniente analizar el efecto de la estabilidad en el perfil final de productos, ya que, de *facto*, este sería el producto de la reacción de la nueva enzima. Así, a partir del hecho de que el componente endolevanasa de LevB<sub>1</sub>SacB es menos estable que el componente levansacarasa, se realizó un ensayo, incubando la enzima a 50°C a diferentes tiempos, y posteriormente analizando el perfil de productos (figura 36). Se observó que la endolevanasa de la enzima de fusión empieza a perder actividad desde los 10 min de incubación a 50° C, tiempo después del cual, el perfil de productos se modifica de forma tal que se puede concluir que la levansacarasa actúa más rápidamente que la endolevanasa. A los 30 min de incubación, la endolevanasa ha perdido actividad de manera significativa ya que, en la reacción con la enzima parcialmente desactivada, disminuyen las señales correspondientes a los FOS. Sin embargo, es conveniente señalar que esta pérdida de actividad endolevanasa sigue siendo parcial, ya que no se alcanza el grado de polimerización correspondiente a la levana que se habría acumulado de no haber actividad hidrolítica.

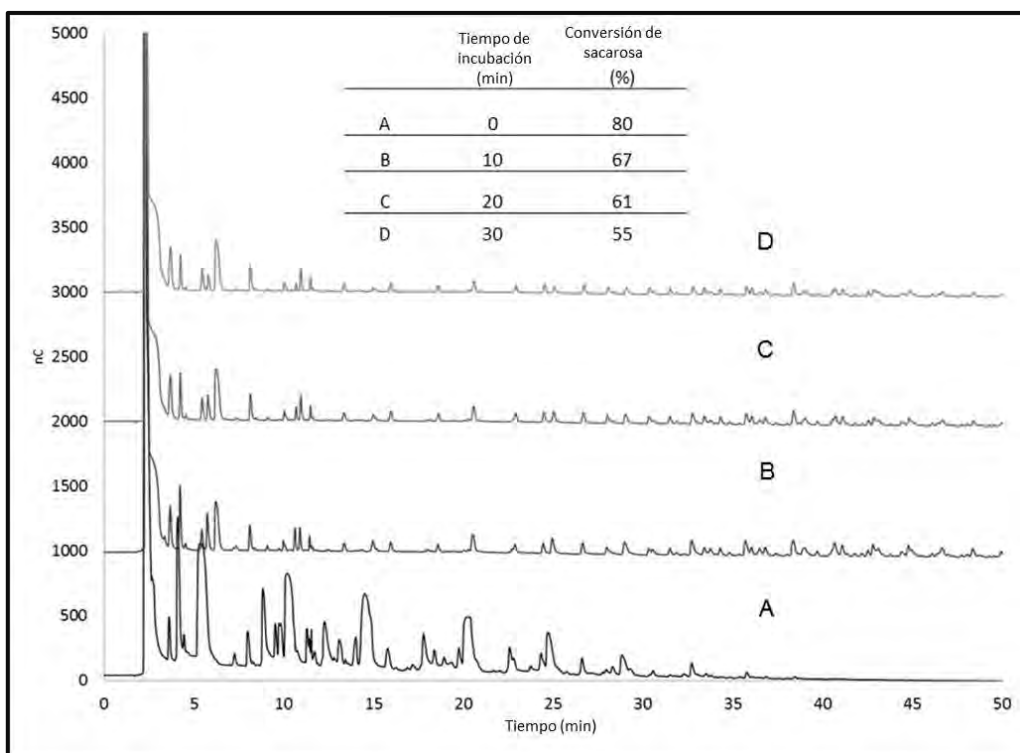


Figura 36. Perfil de FOS por HPAEC-PAD a 2h de reacción obtenido con LevB<sub>1</sub>SacB a 50°C después de haber sido incubada a esa misma temperatura a diferentes tiempos que se señalan en la figura, junto con la respectiva tasa de conversión de sacarosa alcanzada a las 2 horas.

La diferencia en estabildades es un factor que se debe de tomar en cuenta considerando que las propiedades del producto dependerán de un perfil de FOS determinado, y que la pérdida de actividad de la endolevanasa modificará dicho perfil incrementando paulatinamente la concentración de FOS de mayor peso molecular, también los tiempos de reacción, y eventualmente llegando a producir sólo levana.

#### 8.4.3 Síntesis de FOS empleando LevB<sub>1</sub>SacB.

Se realizó un estudio cinético de síntesis de FOS empleando las condiciones utilizadas en el ensayo con las dos enzimas en solución, es decir, 600 g/L de sacarosa pH 6.0, 37 °C y la enzima LevB<sub>1</sub>SacB. La reacción fue monitoreada durante 6 h, empleando una actividad equivalente a 10 U/mL de levansacarasa. Los resultados se muestran en las figuras 37, 38 y 39, en las que se describe la evolución del perfil de productos de síntesis a lo largo de las 6 h de reacción, el consumo de sacarosa asociado con la aparición de glucosa y fructosa libres en el medio de reacción (en este caso comparado con el sistema simultáneo con las enzimas libres), y finalmente, un comparativo del perfil de productos entre los dos sistemas de reacción, respectivamente.

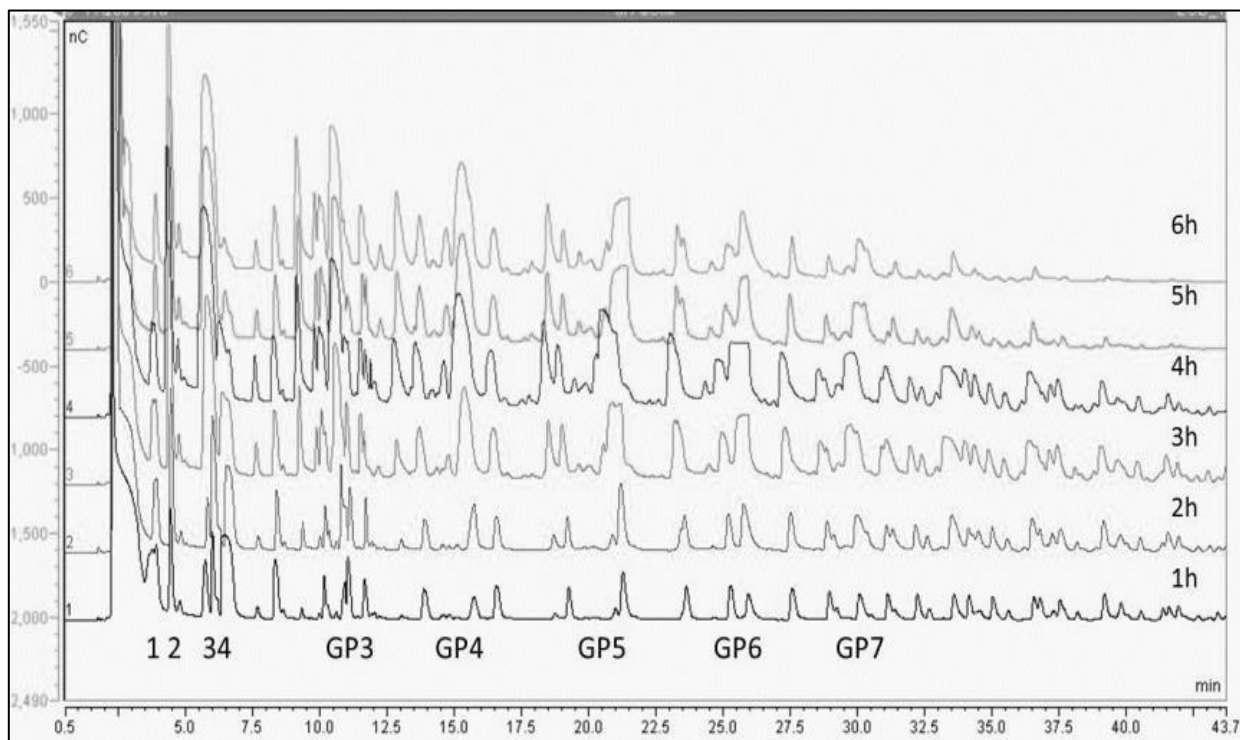


Figura 37. Evolución de la reacción de síntesis de FOS empleando la enzima LevB<sub>1</sub>SacB a pH 6.0 37°C. 1-1kestosa, 2-blastosa, 3 6-kestosa, 4 levanobiosa.



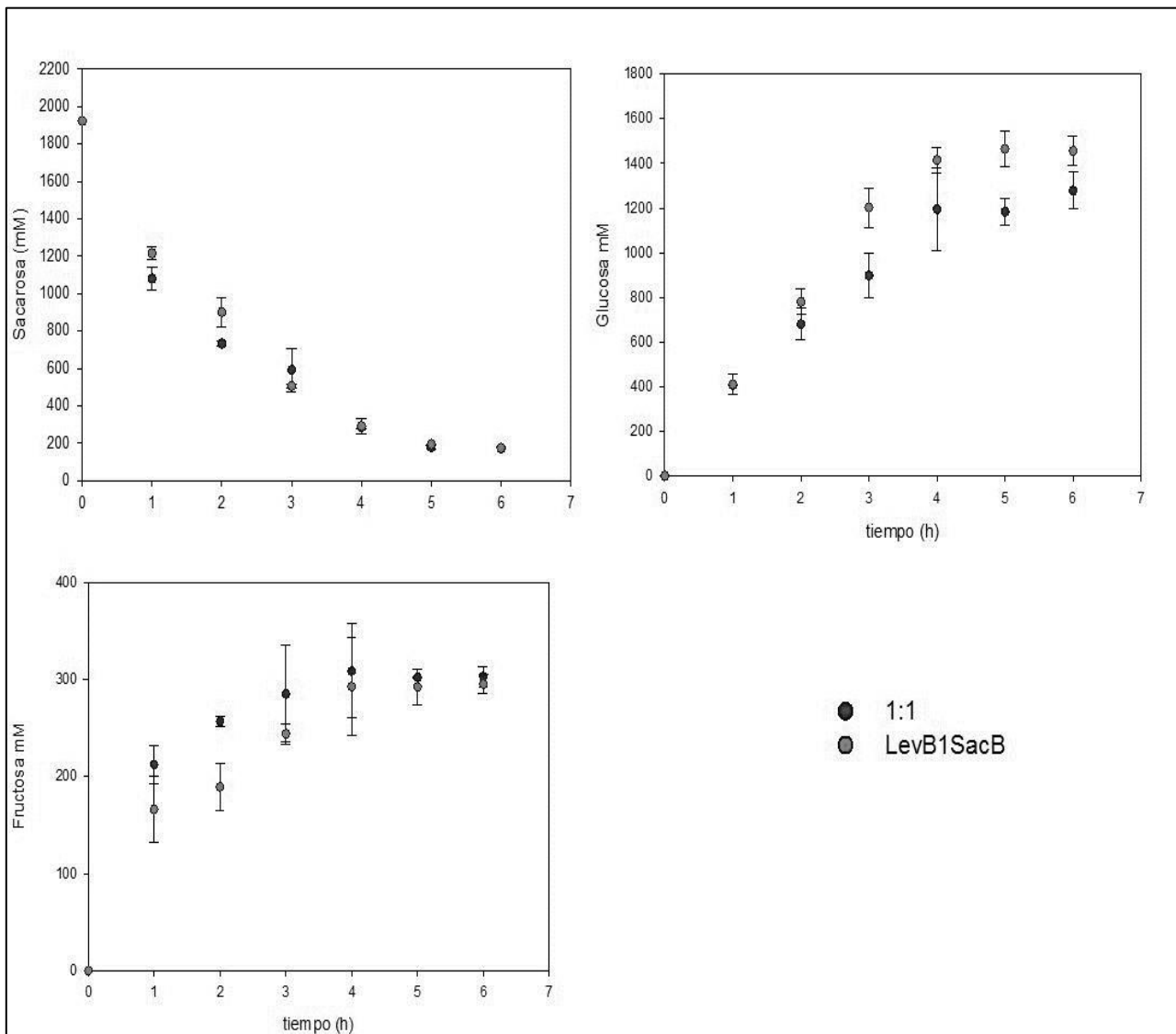


Figura 38. Comparación del perfil cinético del sistema simultáneo a relación molar 1:1 SacB/Lev<sub>1</sub> a 10 U/mL de SacB y la enzima de fusión LevB<sub>1</sub>SacB con una actividad equivalente a 10 U/mL de levansacarasa. A una concentración de sacarosa de 600 g/L 37°C pH 6.0 en buffer de acetatos pH 6.0.

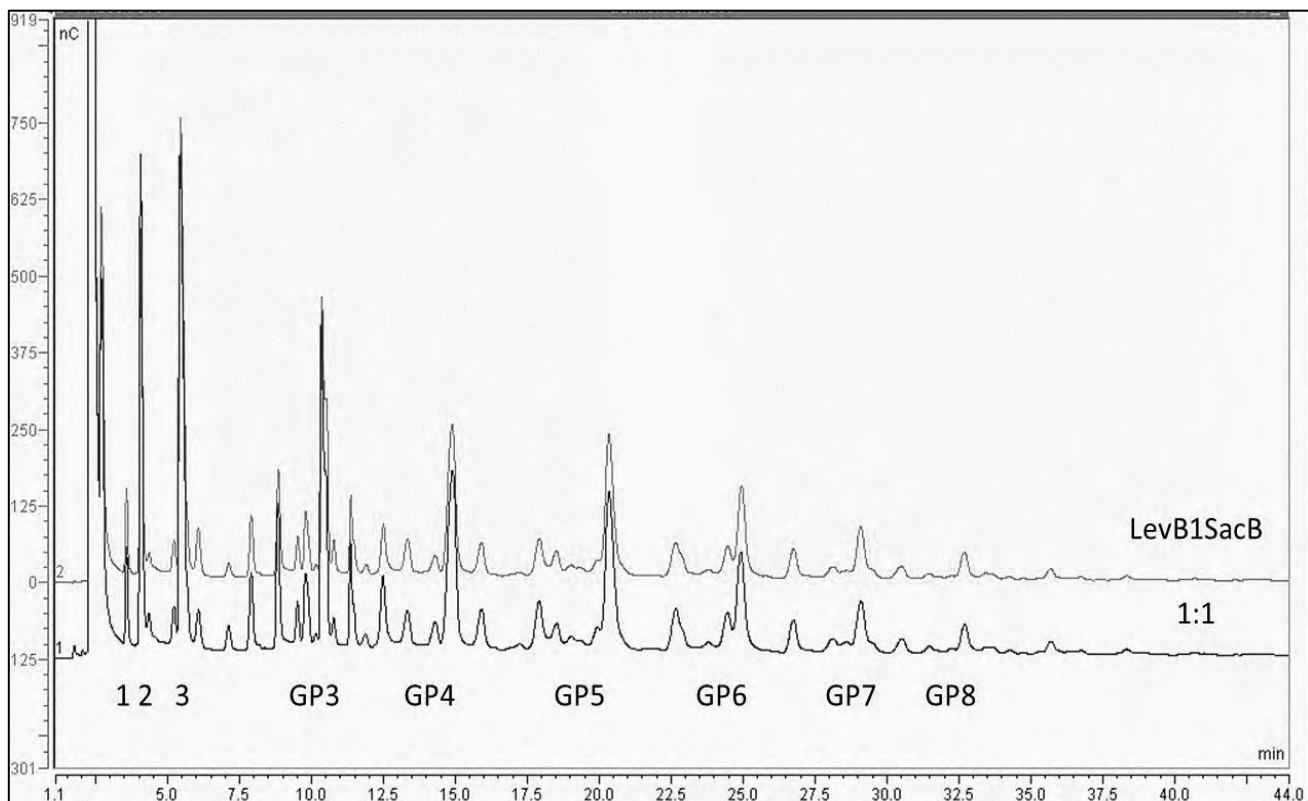


Figura 39. Comparación del perfil de FOS por HPAEC-PAD al final de la reacción de las enzimas SacB y LevB<sub>1</sub> en relación 1:1 reaccionando en forma simultánea y la enzima de fusión. 1) 1-kestosa, 2) blastosa, 3) levanobiosa.

La figura 37 muestra la evolución de los productos en las síntesis de FOS empleando la enzima de fusión. La acción de síntesis de SacB da lugar a una amplia gama de productos que se van acumulando durante la síntesis aumentando paulatinamente de tamaño (peso molecular). Sin duda, la actividad de síntesis de SacB es de inicio más importante que la actividad hidrolítica de LevB<sub>1</sub>, aspecto igualmente relacionado con la especificidad de esta última. A las 3 y 4 horas de reacción, cuando aún la sacarosa no se ha agotado, la acción de LevB<sub>1</sub> se vuelve más importante, empezando a consumir los productos acumulados hasta esa hora. Como se señaló anteriormente, el tiempo final de reacción se define en 6 h dado el perfil y tamaño de los FOS adecuados para una función prebiótica.

Al comparar el funcionamiento de las enzimas libres o en un sólo péptido, no se observan diferencias en cuanto a la velocidad de consumo de sacarosa, y de liberación de glucosa y

fructosa (figura 38). Esto se debe a que se emplearon las mismas unidades medidas de levansacarasa en las dos reacciones y que el hecho de que se encuentren ligadas químicamente, no afecta su funcionamiento con respecto a su forma también simultánea, pero no asociada. Finalmente, al comparar el perfil final de productos de los dos sistemas de reacción por HPAEC-PAD (enzimas libres y LevB<sub>1</sub>SacB) se observa un perfil idéntico al final de la reacción en el que predominan la levanobiosa y la blastosa, con FOS que alcanzan un GP máximo de 10, lo que confirma, como ya se señaló, que tanto la actividad levansacarasa como la actividad endolevanasa, se comportan de la misma forma tanto fusionadas en un sólo péptido, como en una mezcla de reacción con las dos enzimas disueltas (figura 39).

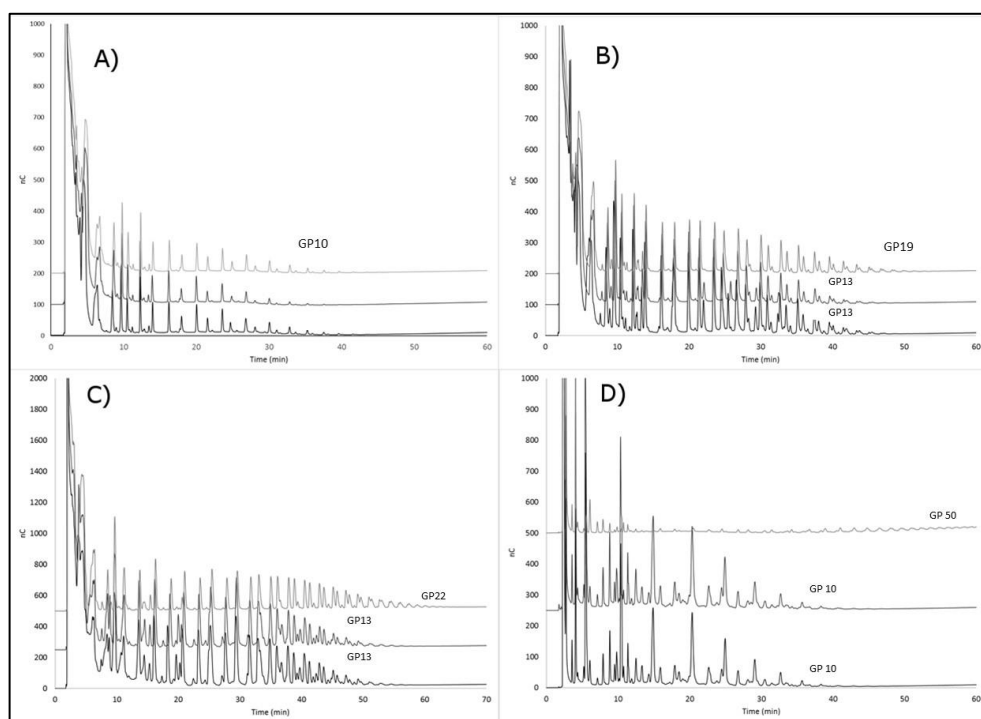


Figura 40. Comparación del perfil de FOS por HPAEC-PAD y TLC de los sistemas simultáneo, LevB<sub>1</sub>SacB y SacB a 37°C, pH 6.0. A) 10min, B) 30 min C) 50 min D) 6 h.

De igual forma, analizamos la evolución de los productos de la reacción con más detalle por HPAEC-PAD durante la primera hora y al final de la reacción, de tal forma que se pueda

analizar primeramente el efecto de tener las enzimas libres o en un sólo péptido, así como con el perfil que resulta de la actividad de SacB sin la presencia de la actividad hidrolítica de LevB<sub>1</sub>, como se observan en la figura 40. En esta figura observamos que durante los primeros minutos en los 3 sistemas se tiene el mismo comportamiento, es decir en la primera etapa sólo hay actividad de síntesis por SacB, y no es sino hasta el minuto 30 cuando se manifiesta la actividad endolevanasa, en ambos casos limitando el crecimiento de las cadenas que sólo alcanzan un GP de 13 (figura 40 B). Podría especularse el que a partir de este tamaño de cadena de levana la endolevanasa puede hidrolizar eficientemente. Por otro lado, tal como ya se había concluido derivado de los experimentos reportados en las figuras 38 y 39, no se observaron diferencias entre la enzima de fusión y el sistema con las enzimas libres, a pesar de que la actividad endolevanasa medida en la enzima de fusión es mayor. Es necesario mencionar que, bajo las condiciones de reacción empleadas no se alcanza la síntesis de concentraciones elevadas de levana, y el hecho de tener diferencias en el nivel de la actividad endolevanasa, como se demostró anteriormente, no afecta el perfil de productos obtenidos. Del análisis de ambas figuras podría concluirse que una vez que los productos de síntesis de SacB alcanzan un tamaño adecuado para la especificidad que LevB<sub>1</sub> requiere, se establece un equilibrio en la síntesis/hidrólisis en el que la velocidad de producción está limitada por la actividad de SacB, esto hasta que, como consecuencia de la disminución de sacarosa, la velocidad de hidrólisis se hace más importante (ver hora 3-4 en la figura 37).

El empleo de LevB<sub>1</sub> y SacB para la síntesis de FOS, ya sea de forma secuencial o simultánea, representa una nueva forma de llevar a cabo la reacción de síntesis de FOS tipo levana a partir de sacarosa que da lugar a una amplia diversidad de estructuras hasta ahora no disponibles por una vía de síntesis o transglicosilación directa. En este contexto, y desde la perspectiva de la biocatálisis, el sistema LevB<sub>1</sub>SacB, en el que no se requiere ni la preparación ni la dosificación de las dos enzimas por separado, permite primeramente la producción de un sólo catalizador que lleva a cabo la síntesis eficiente de los mismos FOS

tipo levana, que se obtienen con el sistema simultáneo, esto con rendimientos alrededor del 40%.

## 8.5 Análisis del perfil de productos de síntesis de LevB1SacB y su comparación.

El producto mayoritario de los fructooligosacáridos en las reacciones de síntesis de levana por SacB también fue purificado, empleando en una primera etapa una columna C-18 como fase estacionaria y agua como fase móvil y posteriormente empleando una columna amino y una fase de acetonitrilo/agua 75:25. Como se mencionó en apartados anteriores, la señal que aparece a los 4 min podría corresponder a un análogo de la sacarosa conocido como blastosa como han reportado por Homann et al. (2007). Para confirmar que efectivamente se trata de este compuesto, se determinó primeramente que se trataba de un azúcar reductor mediante reacción con el reactivo de DNS. También se observó que el azúcar es hidrolizado por una  $\beta$ -fructofuranosidasa comercial, dando lugar a glucosa y fructosa en una relación 1:1. Finalmente se comparó el tiempo de elusión con el obtenido para un estándar de blastosa recientemente sintetizado en nuestro grupo de trabajo (Miranda-Molina et al. 2017). En la figura 41 se muestra el cromatograma obtenido por HPAEC-PAD de la señal correspondiente al compuesto puro antes y después de ser hidrolizado.

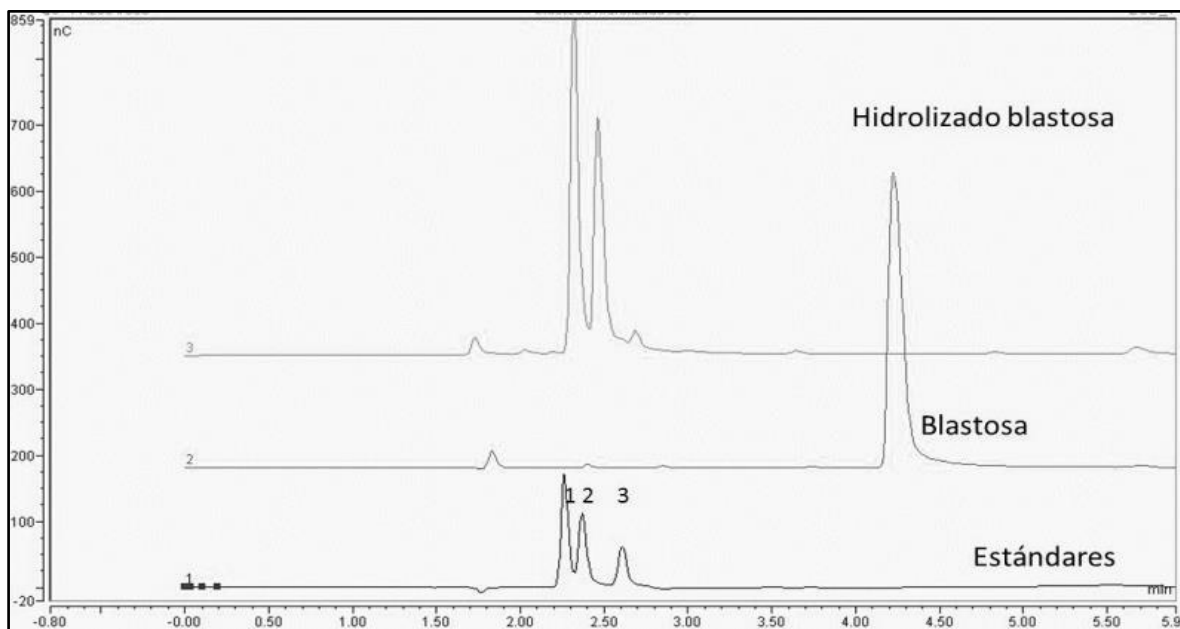


Figura 41. Cromatograma en HPAEC-PAD del producto mayoritario purificado antes y después de ser hidrolizado. 1) Glucosa, 2) fructosa 3) sacarosa.

Con base en las evidencias antes descritas, podemos deducir que, tratándose de un disacárido reductor compuesto por glucosa y fructosa, y sabiendo también que en la transferencia del grupo fructosilo por SacB, el carbonilo de la fructosa siempre está comprometido en el enlace, entonces el anomérico libre es el de la glucosa, y el disacárido corresponde a la blastosa (figura 42).

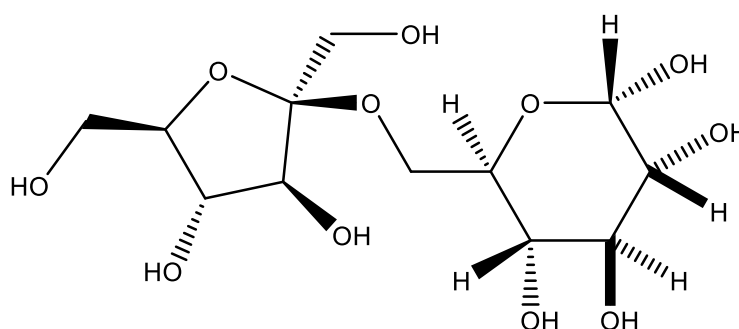


Figura 42. Estructura de la blastosa.

Con los dos productos puros, la levanobiosa y la blastosa, se llevó a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de ambos, tratando igualmente de definir en todos los casos la identidad de los FOS dentro del perfil de productos obtenido al final de la reacción en cada uno de los sistemas desarrollados. Estos resultados se muestran en la figura 43 y en la tabla 7.

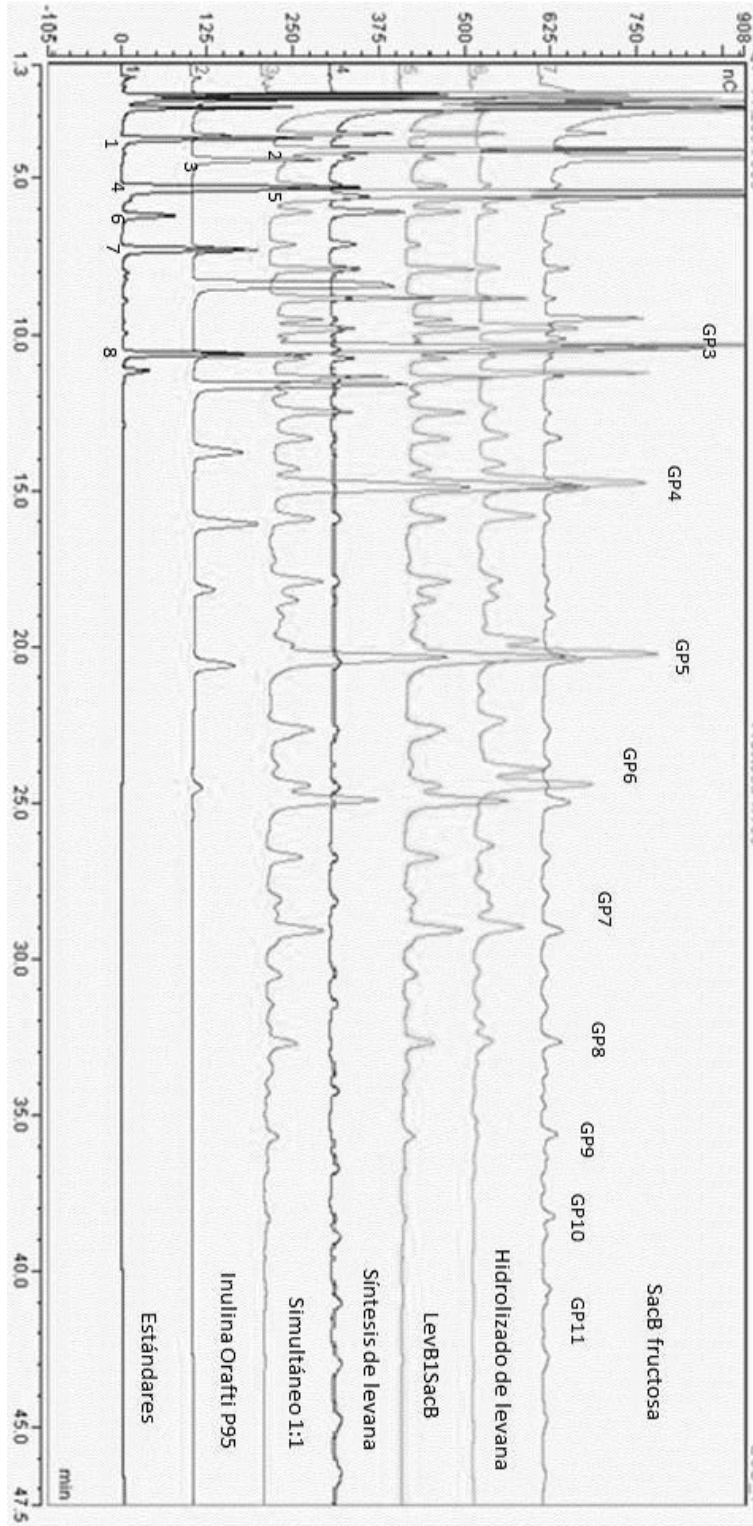


Figura 43. Cromatograma en HPAEC-PAD perfil de productos final de varios sistemas de síntesis de FOS. Estándares: 1) 1-kestosa 2) blastosa 3) inulobiosa 4) 6-kestosa 5) levnobiosa 6) neo-kestosa. 7) nistosa 8) f-nistosa.



Tabla 7. Rendimientos de los sistemas de producción de FOS.

| Sistema               | Sustrato g/L | Conversión | Rendimiento | Producto g/L | Blastosa g/L | Levanobiosa g/L | GP aprox max obtenido |
|-----------------------|--------------|------------|-------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------------|
| Síntesis Levana       | 579          | 90         | 77          | 200          | 10.03±2.3    | 0.00            | 50                    |
| Hidrolizado de levana | 100          | 100        | 97          | 97.0         | ND           | 28.8±2.3        | 10                    |
| Simultáneo            | 657          | 90         | 80          | 235          | 16.39 ± 4.3  | 57.01 ± 4.8     | 10                    |
| LevB1SacB             | 657          | 90         | 83          | 246          | 11.04±2.7    | 48.90 ± 5.2     | 10                    |
| SacB+Fructosa         | 226          | 100        | 100         | 113          | 3.04 ± 1.23  | 27.33 ± 6.23    | 13                    |

Como se concluyó en el apartado anterior, los sistemas simultáneos y el obtenido por la enzima de fusión dan lugar a productos similares, con los mismos rendimientos en FOS totales, y alcanzando concentraciones equivalentes de levanobiosa y blastosa. La diferencia que encontramos entre los productos del sistema simultáneo de síntesis y los de la hidrólisis de levana pura con endolevanasa en reacción secuencial, es la ausencia de blastosa. Observamos también la ausencia de otros productos no cuantificados, pero plenamente identificados como 1-kestosa y neo-kestosa. Finalmente, en la reacción secuencial tampoco se observa otra gama de productos que eluyen entre los 6 y 15 min. Es claro que la presencia de blastosa y 1-kestosa se debe a la actividad de la levansacarasa, y que se eliminan –junto con el resto de los mono y disacáridos- si se precipita y lava la levana para la reacción de hidrólisis. Finalmente, el perfil de productos obtenido mediante reacción de la levansacarasa en presencia de fructosa presenta una menor complejidad que el resto de los perfiles, tratándose muy probablemente de FOS tipo levana compuestos únicamente de unidades de fructosa, y alcanzando un GP máximo de 13.

Los sistemas de síntesis empleando LevB<sub>1</sub>SacB y simultáneo resultan los más prometedores, ya que hay una mayor gama de FOS sintetizados en ambos sistemas de reacción. La ventaja de LevB<sub>1</sub>SacB no se establece entonces por el perfil de productos, sino

por, en el contexto de la biocatálisis, la facilidad de producción/purificación de una sola proteína, misma que podría ser inmovilizada sin tener que hacer una dosificación dependiendo del rendimiento de inmovilización en caso de tenerlas separadas.

## 8.6 Purificación de FOS

Tratándose de productos para la alimentación, pero particularmente destinados a favorecer la selectividad de la microbiota intestinal, se requiere como condición *sine qua non* para su evaluación y eventual comercialización de la eliminación de los azúcares simples: glucosa, fructosa y sacarosa residual. La primera estrategia para la eliminación de fructosa y glucosa fue el empleo de resinas de intercambio catiónico. Este tipo de resinas, en especial las cargadas con  $\text{Ca}^{2+}$  son utilizadas para la eliminación de la glucosa de la mezcla de reacción en los procesos de elaboración de jarabes con alto contenido de fructosa. (Water and Process solutions. Ion Exchange -Separation and Purification for the Food Precessing Industry). Por otro lado, Sanz Valero en el 2009 empleó resinas de intercambio catiónico para separar residuos de glucosa y galactosa de una mezcla de galacto-oligosacáridos, logrando separar eficientemente la galactosa y reduciendo la concentración de glucosa en la mezcla final de galacto-oligosacáridos.

El principio de la separación mediante esta técnica se basa en la formación de complejos de los azúcares con los grupos hidroxilos posicionados en una estructura determinada, como se observa en la figura 44.

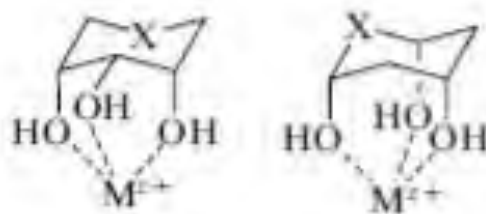


Figura 44. Complejos de carbohidratos con iones metálicos. Yu E Alekseev et al. (1998).

En una primera evaluación, se emplearon mezclas de FOS sintetizados por el método simultáneo a una concentración del 25% p/v cargando 25  $\mu\text{L}$  en columnas de 15cm de longitud con un diámetro de 1 cm, conteniendo resinas de  $\text{Ca}^{2+}$  o de  $\text{Na}^+$  y empleando un

flujo de 0.3 mL/min. La elución fue monitoreada por cromatografía en capa fina como se muestra en la figura 45, en la que se observa una ligera eliminación de los monosacáridos.

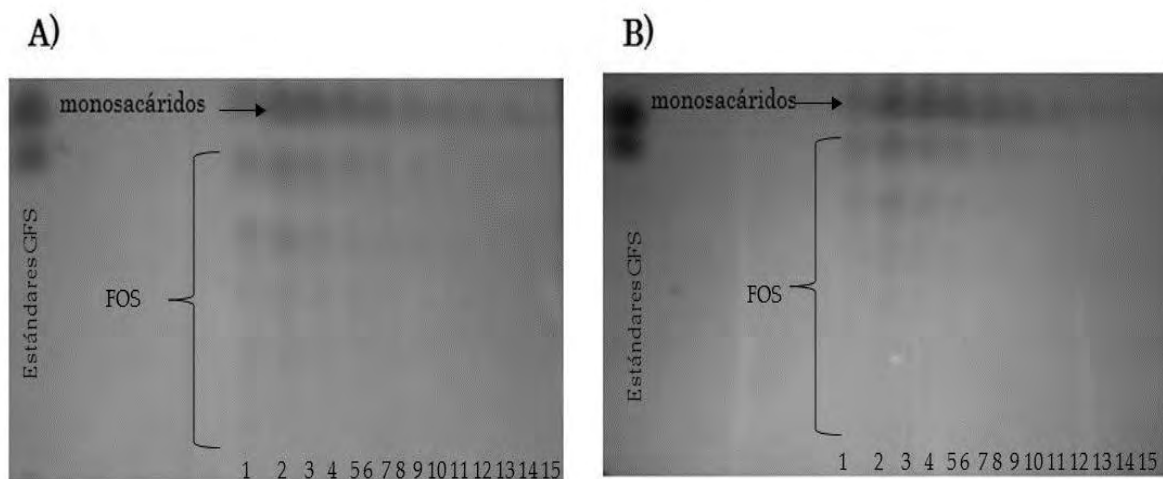


Figura 45. TLC de las fracciones recolectadas de la purificación por columnas de intercambio catiónico con columnas cargadas con A) Na<sup>+</sup> y B) Ca<sup>2+</sup>

Las muestras recolectadas durante los primeros tiempos de elución muestran una mezcla de FOS y monosacáridos, mientras que en las últimas se observa únicamente la presencia de monosacáridos. Aunque la eliminación de los monosacáridos no es eficiente como se puede constatar del análisis de las fracciones 1 a 4 para ambos casos, podemos constatar que se logra enriquecer en FOS dichas fracciones. Esto puede deberse a que ni la fructosa ni la glucosa poseen una configuración en la que 3 grupos hidroxilo estén en orientación *cis* ya sea en posición axial-ecuatorial-axial ó axial-axial -axial como reporta Angyal, (1973) para la formación de complejos más estables que permitan una mejor separación. El uso de columnas más grandes y la reducción de flujo podría ayudar a enriquecer más las mezclas de FOS.

La segunda estrategia empleada para la eliminación de monosacáridos está sustentada en los resultados descritos en el apartado 8.1. En efecto, en esa sección describimos específicamente experimentos realizados con ácido bórico con el fin de lograr la

complejación de fructosa en su forma  $\beta$ -piranosa con el ácido. Para la formación de dicho complejo se requiere que dos grupos hidroxilo continuos se encuentren en posición *cis* (Yu E Alekseev et al. 1998). Requerimientos que cumplen tanto la molécula de glucosa en posición alfa-piranosa con los hidroxilos de los carbonos 1 y 2, como la molécula de fructosa libre en forma  $\beta$ -piranosa (su forma predominante en solución acuosa) con los hidroxilos de los carbonos 4 y 5. Este no es el caso para las moléculas en forma  $\beta$ -furanosa de la fructosa que se encuentran formando los FOS (figura 46), lo que es muy afortunado para esta propuesta. La estrategia consistió entonces en formar un complejo entre los monosacáridos presentes en la mezcla de reacción y el ácido fenil borónico, empleado con el fin no sólo de complejar los azúcares, sino también de cambiar su polaridad, para poder así extraerlos con un solvente hidrofóbico.

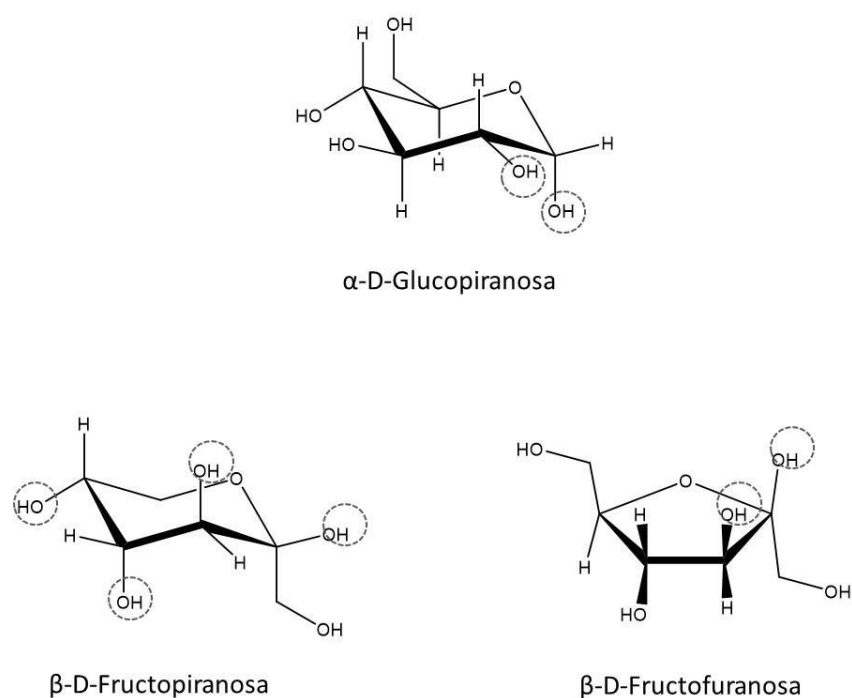
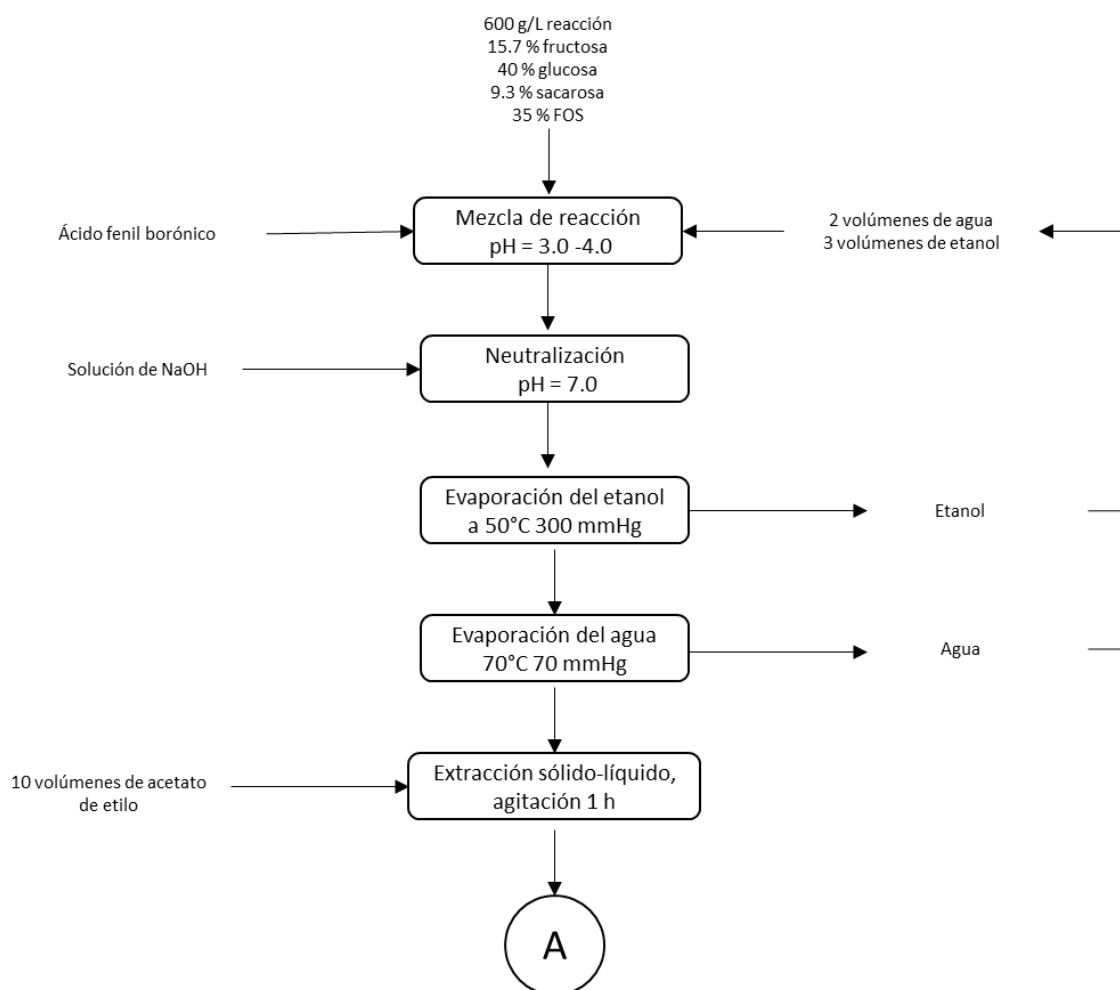


Figura 46. Conformaciones de la glucosa y fructosa, capaces de formar complejos con el ácido fenil borónico.

La figura 47 muestra la estrategia seguida para la obtención de FOS libres de monosacáridos. La estrategia incluye la selección de etanol y el acetato de etilo como solventes, ya que presentan ventajas con respecto a otros solventes, como son la polaridad ( $\epsilon_{\text{acetatoetilo}} = 6.02$  y  $\epsilon_{\text{etanol}} = 24.5$ ), la toxicidad y peligrosidad tanto en su manejo como con el medio ambiente (Capello et al. 2007), así como el punto de ebullición (78 y 77°C, respectivamente) sumamente adecuados para su posterior recuperación. Para el caso del ácido fenil borónico, la proporción 50:50 agua:etanol, resultó la más adecuada para solubilizar el ácido fenil borónico y los carbohidratos en su totalidad, ya que su solubilidad en agua está limitada a 10 g/L .



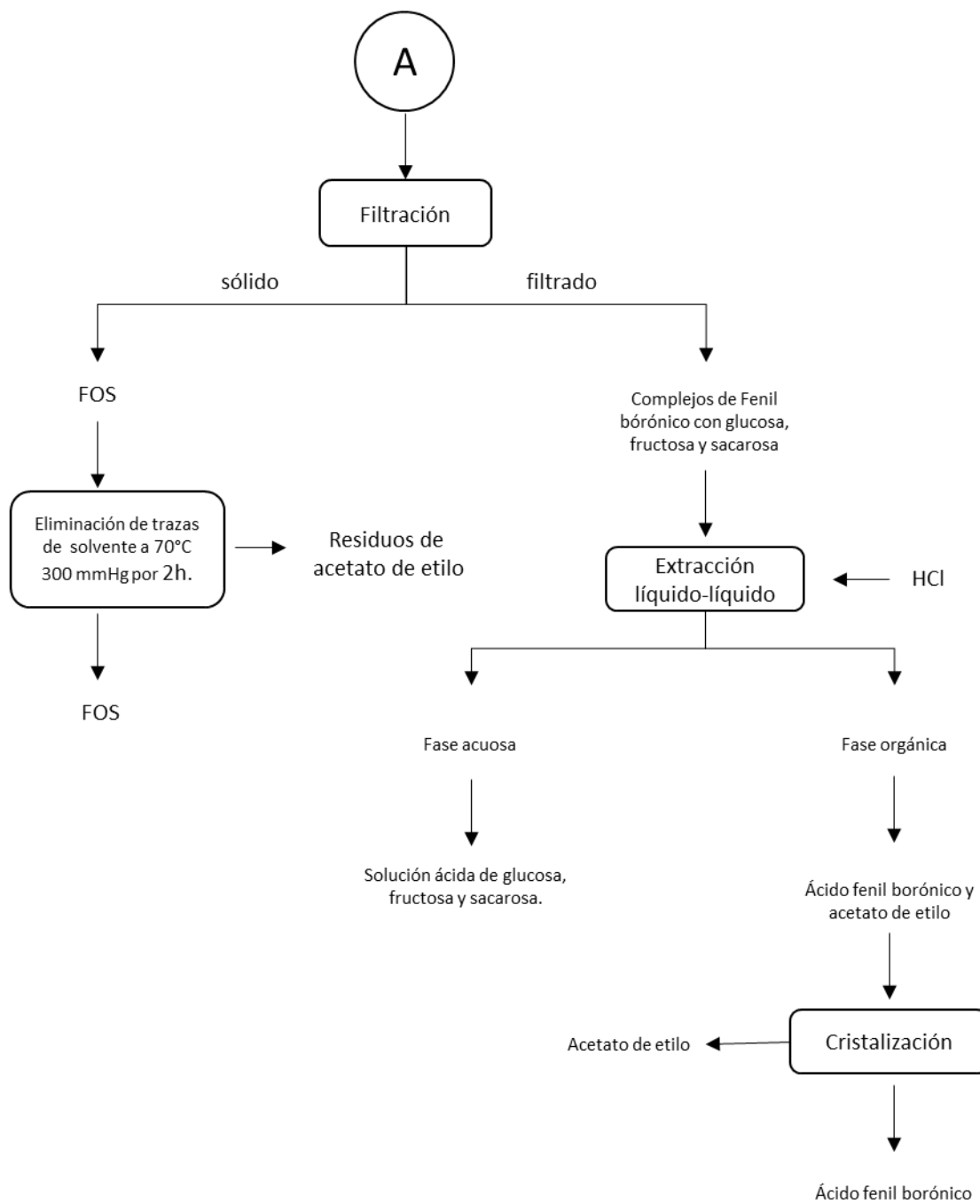


Figura 47. Diagrama de purificación de FOS por complejación con el ácido fenil borónico.

La reacción de complejación puede llevarse a cabo por dos mecanismos, como se muestra en la figura 48, partiendo de la base de que el ácido fenil borónico en solución se encuentra en dos formas, trigonal (1 o 3) y tetraédrico (2 o 4), resultado de que una molécula de agua reaccione con la forma trigonal liberando un protón. Ambas especies son capaces de reaccionar con dioles en posición *cis*, siendo la especie tetraédrica la que forma complejos más estables.

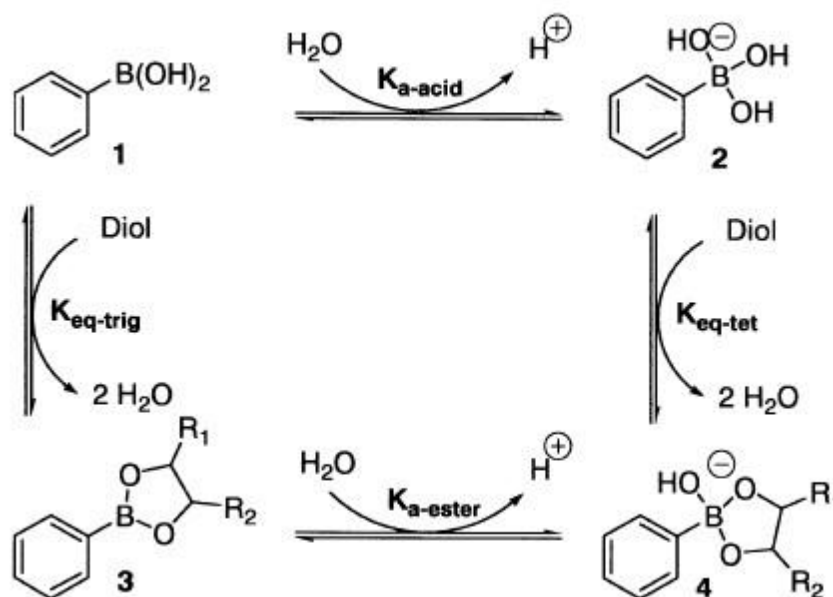


Figura 48. Equilibrios de la formación de complejos con dioles y el ácido fenil borónico (Springsteen & Wang, 2002).

Las constantes de formación de complejos con fructosa, glucosa y sacarosa han sido calculadas tanto para las especies trigonales como tetraédricas (Springsteen and Wang 2002). Dichas constantes se muestran en la tabla 8.



Tabla 8. Constantes de equilibrio de la formación de ésteres a pH 7.0 con sus respectivos pKas.

|          | <b>Keq</b> | <b>pka</b> |
|----------|------------|------------|
| Fructosa | 160        | 4.6        |
| Glucosa  | 4.6        | 6.8        |
| Sacarosa | 0.67       | 7.5        |

La constante de equilibrio de la formación de ésteres de boro es más favorable para la fructosa, 10% en la mezcla, que, para la glucosa, que se encuentra en mayor proporción en la mezcla de FOS (casi un 43%). Es importante mencionar que las constantes de equilibrio están en función del pH. En soluciones ácidas las constantes de formación del complejo resultan ser menores a 1 por lo que el complejo tiende a disociarse. La misma disolución del ácido fenil borónico en agua genera protones, siendo el pKa de este equilibrio de 8.9. Al ser la forma tetraédrica la más reactiva (Springsteen & Wang, 2002), el equilibrio se desplaza hacia esta forma al adicionar un diol y formar los ésteres correspondientes, acidificando el medio. La acidez generada por esta reacción puede afectar el proceso de purificación en dos puntos: en la formación del complejo que es más favorable en soluciones básicas, y en las posteriores etapas, durante la eliminación de los solventes, que requiere de un aumento en la temperatura de solución, provocando pérdidas por hidrólisis de los FOS. Por los inconvenientes mencionados, después de llevar a cabo la mezcla de reacción es indispensable neutralizar la solución

Una vez formado el complejo, es necesario evaporar hasta sequedad la mezcla de reacción ya que esto facilitará la extracción de complejo con acetato de etilo. Si no se elimina el agua en su totalidad, la naturaleza anfipática del complejo da lugar a la formación de una emulsión, lo cual impide que la extracción de los monosacáridos resulta eficiente. Por otro lado, la deshidratación del medio de reacción ocasiona la formación de boroxinas (figura 49

), como consecuencia de la deshidratación del ácido fenil borónico residual, siendo estos compuestos más solubles en medios orgánicos, y por lo mismo, de fácil extracción (Hall 2006).

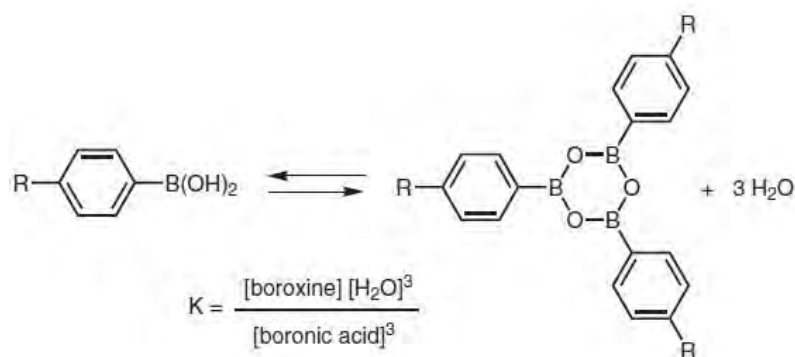


Figura 49. Equilibrios de la formación de boroxinas en la deshidratación del ácido fenilborónico (Hall, 2006).

Tanto los azúcares complejados como el ácido fenil borónico residual son removidos por el acetato de etilo; los FOS y los monosacáridos no complejados son insolubles por lo que pueden ser fácilmente removidos por filtración.

Tras haber definido las condiciones del proceso ya mencionadas, se realizaron experimentos variando la concentración de fenil borónico en el medio y midiendo el nivel de purificación logrado. Los equivalentes agregados se calcularon a partir de la concentración molar de glucosa y fructosa iniciales. Los resultados se muestran en la figura 50.

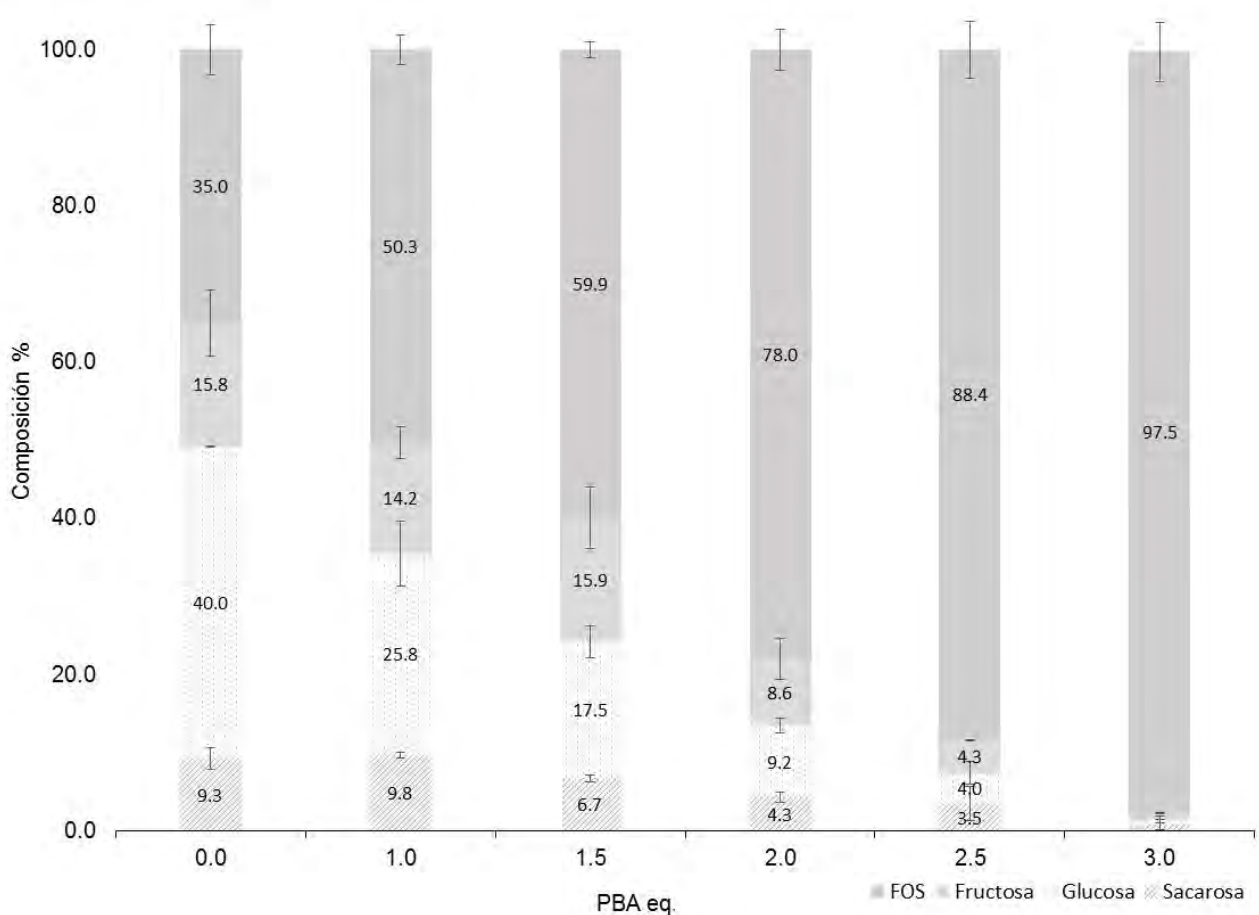


Figura 50. Composición de la mezcla de carbohidratos después de ser purificados mediante el proceso de complejación con ácido fenil borónico a diferentes equivalentes.

En esta figura 50 se muestra que el empleo de un equivalente de ácido fenil borónico no permite una eliminación total de los monosacáridos, ya que sólo se observó una reducción parcial de la glucosa. Por un lado, sabemos que la constante de equilibrio con la fructosa es mayor que con la glucosa; sin embargo, esta última se encuentra en mayor proporción. Por otro lado, Springsteen et al. (2002), mencionan que siempre hay una fracción de fenil borónico residual en las reacciones de formación de esteres debido a los múltiples equilibrios que presenta la molécula, por lo que es necesario un exceso de los reactivos para obtener una complejación total. También se comprobó que el otro reactivo, es decir el etanol, no estuviera interviniendo en la formación de esteres, disminuyendo así los rendimientos en la remoción de azúcares. Para analizar este aspecto, se realizó un control

empleando un disolvente sin grupos hidroxilos con una polaridad similar empleando una mezcla de acetonitrilo agua 50:50 como medio de reacción (figura 51). No se observó diferencia alguna con el cambio de disolvente.

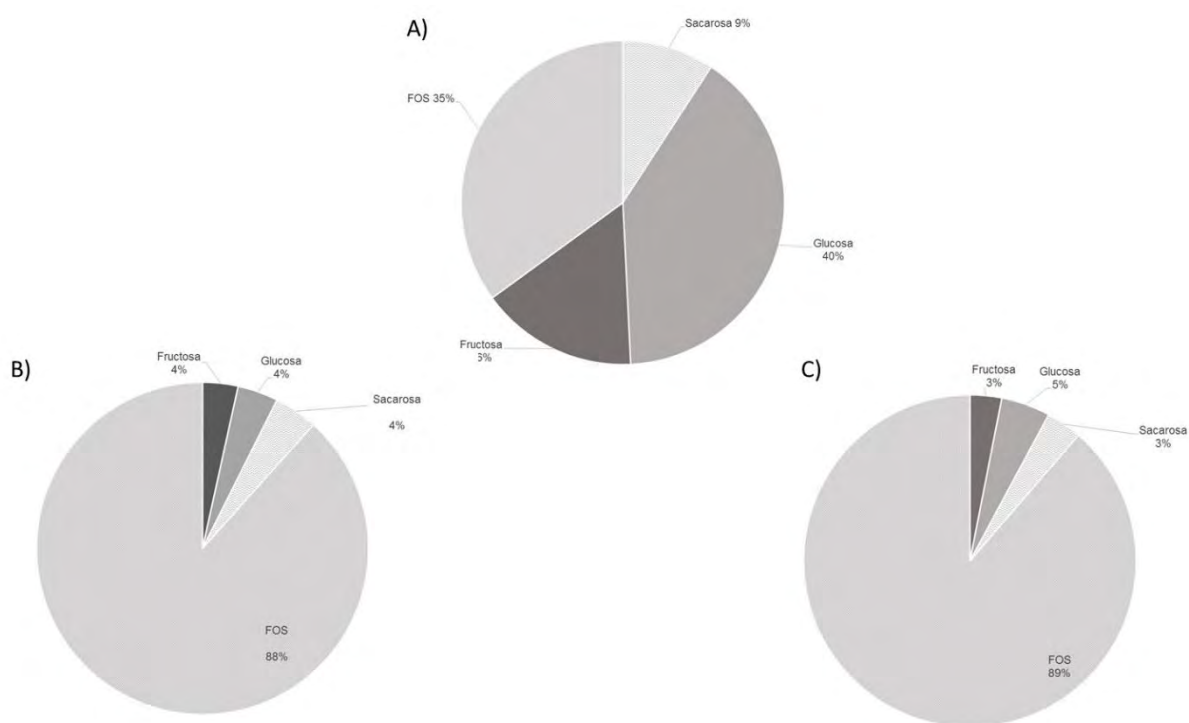


Figura 51. Composición de la mezcla de carbohidratos después de ser purificados mediante el proceso de complejación con ácido fenil borónico empleado B) etanol:agua 50:50 y C) acetonitrilo:agua 50:50, empleando 2.5 eq. de ácido fenil borónico. A) Composición original

Por otro lado, otros autores proponen la formación de ésteres de glucosa complejada con dos moléculas de ácido fenil borónico, con los hidroxilos correspondientes a los carbonos 5,6, 1 y 2 en conformación alfa furanosa (figura 52), requiriendo 2 moléculas de ácido por molécula de glucosa (Wu et al. 2013)

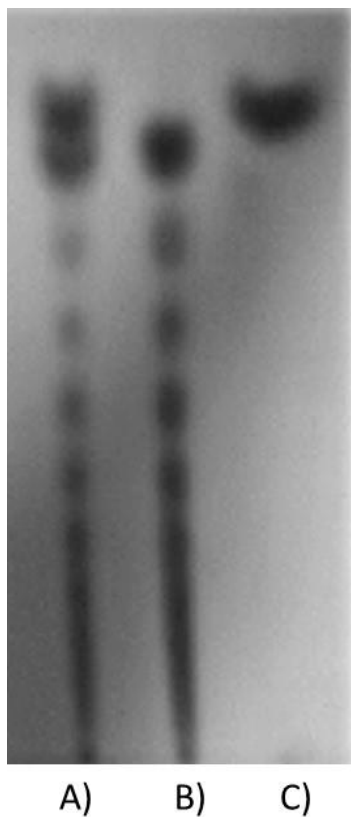


Figura 52. Equilibrio de la formación de la alfa glucofuranosa (Wu et al. 2013).

Para comprobar esta teoría será necesario sintetizar los complejos con cada uno de los azúcares, para analizarlos por RMN, y así determinar la estructura de los complejos.

Hasta este punto se logró desarrollar una metodología de purificación de FOS que, en función de los equivalentes de ácido fenil borónico agregados, permite obtener una mezcla de FOS con diferentes grados de pureza. En la figura 53 se muestra una cromatografía de capa fina de los productos purificados empleando 2.5 equivalentes de PBA mediante la técnica antes descrita. Como ya señalamos, los FOS cuya síntesis aquí hemos descrito, son moléculas con propiedades prebióticas, por lo que una menor cantidad de monosacáridos en la mezcla favorecería estas propiedades. Sin embargo, también se sabe que las bacterias que poseen los mecanismos para metabolizar estos azúcares, se activan con

concentraciones bajas de fructosa, glucosa y sacarosa por lo que en pequeñas cantidades potenciará el efecto de los FOS (Kim et al. 2013; Goh and Klaenhammer 2015)



*Figura 53. TLC de A) mezcla original de FOS B) Mezcla de FOS purificada con 2.5 equivalentes y C) estándar de monosacáridos glucosa y fructosa.*

## 9. Conclusiones

- Se logró desarrollar un proceso de síntesis de FOS a partir de sacarosa mediante un sistema bi-enzimático empleando la levansacarasa de *B. subtilis* SacB y la endolevanasa de *B. licheniformis* LevB<sub>1</sub>, ya sea con las dos enzimas en solución a concentración equimolares (1μM), o mediante la fusión de las mismas, fusión que da lugar a una enzima nueva. En ambos casos el rendimiento alcanzado fue superior al 80% con respecto a la sacarosa.
- El cambio en el perfil de productos en el sistema simultáneo o secuencial con respecto al hidrolizado de levana se debe a la combinación de los productos producidos por la reacción de transferencia de la levansacarasa y de la hidrólisis de la levana por la endolevanasa, produciendo principalmente levanobiosa, 1-kestosa, 6-kestosa y presuntamente blastosa.
- Se logró purificar la levanobiosa y caracterizarla por RMN C<sup>13</sup> y H<sup>1</sup>, así como la purificación del producto que posiblemente se trate de blastosa.
- Se logró obtener y caracterizar bioquímicamente la enzima de fusión LevB<sub>1</sub>SacB. Se logró sintetizar FOS empleando esta nueva enzima encontrándose que tiene el mismo perfil que el sistema simultáneo.
- El perfil de productos de SacB puede ser modificado por altas concentraciones de fructosa, reduciendo el GP de los productos debido al incremento de moléculas aceptoras. La fructosa actúa como molécula aceptora en la síntesis de levana generando levana con extremos reductores.
- Se logró obtener un método de purificación de FOS eficiente para la eliminación de monosacáridos.

## 10. Publicaciones.

- Resultados del apartado 7.1 junto con resultados reportados previamente en la tesis de maestría “Porrás Domínguez Jaime Ricardo (2012). Obtención de Fructooligosacáridos a partir de levanas bacterianas mediante el uso de endolevanasas. México, 2012. Presentada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM para obtener el grado de Maestro en Ciencias.” Concluyeron en la siguiente publicación: Porrás-Domínguez JR, Ávila-Fernández Á, Miranda-Molina A, et al (2015) *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydrate Polymers* 132:338–344. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.056.
- Resultados del apartado 7.2 junto con resultados reportados previamente en la tesis de maestría “Porrás Domínguez Jaime Ricardo (2012). Obtención de Fructooligosacáridos a partir de levanas bacterianas mediante el uso de endolevanasas. México, 2012. Presentada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM para obtener el grado de Maestro en Ciencias.” Concluyeron en la siguiente publicación: Porrás-Domínguez JR, Ávila-Fernández Á, Rodríguez-Alegría ME, et al (2014) Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochemistry* 49:783–790. doi: 10.1016/j.procbio.2014.02.005.
- Los resultados del apartado 7.3 y 7.4 concluyeron en la siguiente publicación: Porrás-Domínguez Jaime R., Rodríguez-Alegría María Elena, Ávila-Fernández Ángela a, Montiel-Salgado Silvia and López-Munguía Agustín (2017). Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrase-endolevanase fusion enzyme (LevB<sub>1</sub>SacB). *Carbohydrate Polymers*: doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.040.



- Resultados presentes en los apartados 7.2 aun no publicados y los resultados de los apartados 7.3 y 7.4 dieron origen a una solicitud de patente con folio: MX/E/2017/002339.
- Se logró una publicación de divulgación relacionada con las fructanas en los alimentos en la Revista Como ves: Porras-Domínguez, J. Lopez-Munguia A. 2017. Cómo alimentar la microbiota intestinal Como ves, 220.

## 11.- Prospectivas

- Estudiar un sistema de producción de fructooligosacáridos, basado en la expresión de la enzima de fusión en un sistema GRAS, empleando la levadura *Pichia pastoris*, permitiendo la expresión de la enzima, la producción de FOS y la purificación en una sola etapa.
- Continuar con los ensayos sobre el efecto prebiótico de los levano FOS en los simuladores del sistema gastrointestinal, así como también en estudios *in vivo*.

## 12. Bibliografía

Abdel-Akher, M., & Smith, F. (1951). The Reduction of Sugars with Sodium Borohydride<sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society*, 73(1950), 4691–4692.

Alekseev, Y. E., Garnovskii, A. D., & Zhdanov, Y. a. (2007). Complexes of natural carbohydrates with metal cations. *Russian Chemical Reviews*, 67(8), 649–669.

Angyal, S. J. (1973). Complex formation between sugars and metal ions. *Pure and Applied Chemistry*, 35(2), 131–146.

Capello, C., Fischer, U., & Hungerbühler, K. (2007). What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, 9, 927–934.

Chambert, R. (1974). Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biochemistry*, 300, 285–300.

Cuskin, F., Flint, J. E., Gloster, T. M., Morland, C., Baslé, A., Henrissat, B., Gilbert, H. J. (2012). How nature can exploit nonspecific catalytic and carbohydrate binding modules to create enzymatic specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(51), 20889–20894.

DOWEX™ MONOSPHERE™ (2016). Ion Exchange Resins Chromatographic Separation of Fructose and Glucose with DOWEX MONOSPHERE Ion Exchange Resins Technical Manual, 1-20.

Enrique Raga (2013). Estudio del mecanismo de elongación de levanas por SacB (tesis de maestría). México. Presentada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Goh, Y. J., & Klaenhammer, T. R. (2015). Genetic Mechanisms of Prebiotic Oligosaccharide Metabolism in Probiotic Microbes. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 137–156.

Gomez, E., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Klinder, a, & Costabile, a. (2010). In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 2114–21.

Goulas, A. K., Fisher, D. a, Grimble, G. K., Grandison, A. S., & Rastall, R. a. (2004). Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranase. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(4), 327–338.

Hall, D. G. (2006). Structure, Properties, and Preparation of Boronic Acid Derivatives. Overview of Their Reactions and Applications. *Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis and Medicine*.

Hendry, G. A. F. (2006). Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist*, 123(1), 3–

Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D., & Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. *The Biochemical Journal*, 407(2), 189–98.

Kang, S. A., Jang, K., Seo, J., Kim, K. H., Kim, H., Rairakhwada, D., ... Do, S. (2000). Levan: Applications and Perspectives.

Kilian, S., Kritzinger, S., Rycroft, C., Gibson, G., & Preez, J. (2002). The effects of the novel bifidogenic trisaccharide, neokestose, on the human colonic microbiota, 637–644.

Kim, J. H., An, H. J., Garrido, D., German, J. B., Lebrilla, C. B., & Mills, D. A. (2013). Proteomic Analysis of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Reveals the Metabolic Insight on Consumption of Prebiotics and Host Glycans. *PLoS ONE*, 8(2).

Kim, Y.-M., Seo, M.-Y., Kang, H.-K., Atsuo, K., & Kim, D. (2009). Construction of a fusion enzyme of dextransucrase and dextransucrase: Application for one-step synthesis of isomalto-oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(3), 159–164.

Kulminkaya, A. a., Arand, M., Eneyskaya, E. V., Ivanen, D. R., Shabalin, K. a., Shishlyannikov, S. M., ... Neustroev, K. N. (2003). Biochemical characterization of *Aspergillus awamori* exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1650(1-2), 22–29.

Marx, S. P., Winkler, S., & Hartmeier, W. (2000). Metabolization of B-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria, 182, 163–169.

Mena Arizmendi Arlette. (2012). Glicosilación enzimática de fenoles mediante el uso de fructosiltransferasas bacterianas (tesis de doctorado). Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Méndez-Lorenzo, L., Porrás-Domínguez, J. R., Raga-Carbajal, E., Olvera, C., Rodríguez-Alegría, M. E., Carrillo-Nava, E., Munguía, A. L. (2015). Intrinsic levansucrase activity of *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB). *PLoS ONE*, 10(11), 1–15.

Meng, G., & Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural Biology*, 10(11), 935–41.

Miasnikov, A. N. (n.d.). Characterization of a novel endo-levanase and its gene from *Bacillus* sp L7. *Micromiology Letters*.

Miranda-Molina, A., Castillo, E., & Lopez Munguia, A. (2017). A novel two-step enzymatic synthesis of blastose, a  $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2 $\leftrightarrow$ 6)-D-glucopyranose sucrose analogue. *Food Chemistry*, 227, 202–210.

Morales-Arrieta, S., Rodríguez, M. E., Segovia, L., López-Munguía, A., & Olvera-Carranza, C. (2006). Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene*, 376(1), 59–67.

Moulis, C., Joucla, G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., & Remaud-Simeon, M. (2006). Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31254–67.

Muñoz-Gutiérrez, I., Rodríguez-Alegría, M. E., & López Munguía, A. (2009). Kinetic behaviour and specificity of  $\beta$ -fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans. *Process Biochemistry*, 44(8), 891–898.

Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñera, E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering, Design & Selection : PEDS*, 21(10), 589–95.

Pereira, Y., Petit-Glatron, M. F., & Chambert, R. (2001). yveB, Encoding endolevanase LevB, is part of the sacB-yveB-yveA levansucrase tricistronic operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 3413–9.

Porras Domínguez Jaime Ricardo (2012). Obtención de Fructooligosacáridos a partir de levanas bacterianas mediante el uso de endolevanasas (tesis de maestría). México, 2012. Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, 137, 830–7.

Sanz Valero José Ignacio (2009). Production of galactooligosaccharides from lactose by immobilized beta-galactosidase and posterior chromatographic separation (tesis de doctorado). Universidad de Ohio EU.

Springsteen, G., & Wang, B. (2002). A detailed examination of boronic acid–diol complexation. *Tetrahedron*, 58(26), 5291–5300.

Tanaka, T. (1979). Synthesis of Levan by Levansucrase. *Journal of Biochemistry*, 287–293.

Tanaka, T., Oi, S., & Yamamoto, T. (1980). The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase. *Journal of Biochemistry*, 297–303.

Velázquez-Hernández, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Bravo-Patiño, a, Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M. P., & Valdez-Alarcón, J. J. (2009). Microbial fructosyltransferases and the role of fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 1763–78.

Wang, J.-H., Tsai, M.-Y., Lee, G.-C., & Shaw, J.-F. (2007). Construction of a recombinant thermostable beta-amylase-trehalose synthase bifunctional enzyme for facilitating the conversion of starch to trehalose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1256–63.

Wu, X., Li, Z., Chen, X.-X., Fossey, J. S., James, T. D., & Jiang, Y.-B. (2013). Selective sensing of saccharides using simple boronic acids and their aggregates. *Chemical Society Reviews*, 42(20), 8032.

Yamamoto Satoru, Iizuka Masaru, Tanaka Toshio, Y. T. (1984). The Mode of Synthesis of Levan by *Bacillus subtilis* Levansucrase. *Agricultural and Biological Chemistry Biol Chem*, 2, 343–349.

# Cómo alimentar la microbiota intestinal

Por Jaime Porras Domínguez y Agustín López Munguía

Foto: Romi M. Abramovitz/Shutterstock

Hay alimentos fermentados tradicionales, como el mismísimo pulque, que contienen sustancias que nos ayudan a mantener la salud.

**Los seres humanos** somos hogar de billones de bacterias; se calcula que tan sólo en el intestino tenemos unas 10<sup>13</sup>. Desde la oscuridad de sus rumbos la microbiota intestinal nos protege de bacterias patógenas como salmonela o *Escherichia coli*, mantiene activo nuestro sistema inmunitario, desactiva sustancias tóxicas y activa y produce otras benéficas. Por si fuera poco, hoy sabemos que la microbiota intestinal es la base del llamado *eje intestino-cerebro*, que regula las emociones, el apetito, el peso e incluso el estado de ánimo, todo desde las tripas. En nuestro intestino hay gran cantidad de neuronas que envían mensajes al cerebro y tam-

bién reciben mensajes de este último. A esa forma de comunicación es a lo que se denomina eje intestino-cerebro.

Nuestras bacterias intestinales comen lo mismo que nosotros, así que para ayudarlas a realizar estas funciones primordiales hay que comer alimentos ricos en fibra, como verduras, cereales y frutas, así como azúcares complejos generalmente derivados de la misma fibra, llamados prebióticos (véase *¿Cómo ves?*, No. 122).

Los azúcares simples como la glucosa y fructosa de los jarabes industriales o de las frutas, o como la sacarosa (combinación de glucosa y fructosa) de la caña



de azúcar o de la miel, no requieren de mayor procesamiento para ser digeridos y llegan con facilidad al intestino donde son absorbidos o usados indistintamente por cualquier microorganismo de la microbiota que está ahí. Estos azúcares son dulces.

Los azúcares complejos, cuyo dulzor apenas se percibe, requieren de un proceso de digestión con enzimas. Un ejemplo es el almidón, en el que cientos de moléculas de glucosa se enlazan químicamente formando largas cadenas (conocidas como polímeros o polisacáridos); otro ejemplo son las inulinas y levanas, formadas por cadenas de fructosa. Aquí se incluyen también los azúcares complejos de la leche materna. A diferencia del almidón, que podemos digerir con nuestras enzimas, las fructanas o los oligosacáridos de la leche materna sólo son digeridos por las bacterias, generalmente las bacterias benéficas, de ahí su carácter prebiótico.

El problema es que nuestra dieta suele basarse en derivados de leche, carne y huevos, y muchas veces preferimos la comida chatarra con alto contenido de azúcar simple y muy poca fibra. La salud de nuestras bacterias intestinales debería importarnos, y mucho, porque una microbiota deficiente envía constantemente mensajes de hambre incontrolable y provoca avidez por el azúcar dulce y la grasa. Esto, dicen los neurofisiólogos, es una de las causas del problema de la obesidad, que ha adquirido dimensiones mundiales (véase *¿Cómo ves?*, No. 106).



Foto: www.hydroenv.com.mx

Pulque.

## PARA SER UN PREBIÓTICO

En 1995, Marcel Roberfroid de la Universidad de Reading en Inglaterra, definió a los prebióticos como ingredientes alimentarios no digeribles que mejoran la salud de quien los consume mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de bacterias del colon. Más tarde, en 2004, se incluyeron otros criterios:

a) Resistir la acidez gástrica, la hidrólisis enzimática y la absorción gastrointestinal. Es decir, resistir todos los medios que los humanos usamos para digerir: el ácido clorhídrico del estómago, las enzimas con las que rompemos las estructuras de carbohidratos, proteínas y grasas de los alimentos y finalmente, el paso a la sangre a través de la pared intestinal.

b) Ser fermentado por la microbiota intestinal. Los prebióticos son empleados como

fuentes de carbono y de energía por las bacterias benéficas, tal como nuestras células usan el carbono de la glucosa.

c) Estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar. Es aquí donde el carácter prebiótico se define, ya que al ser fuente de carbono y energía de las bacterias benéficas, les confiere una ventaja sobre el resto de la microbiota, esa que prefiere el azúcar y la chatarra.

Desde el punto de vista químico, los prebióticos están constituidos por azúcares como la impopular fructosa, pero arreglados en estructuras complejas, como los oligosacáridos de la levana o la inulina.

### Bacterias alegres

Uno de los prebióticos más estudiados, la inulina, es junto con su pariente química cercana, la levana, parte de la fibra soluble de alimentos como la cebolla, el ajo, las alcachofas, los plátanos y los espárragos. La inulina y la levana constituyen entre el 2 y el 10% de esos alimentos y están formadas de largas cadenas de moléculas de fructosa, —un azúcar muy dulce—, enlazadas químicamente. Cuando estas cadenas se cortan en fragmentos pequeños se producen fructo-oligosacáridos o FOS, los prebióticos más benéficos para nuestra microbiota. Actualmente sólo la inulina y sus FOS se usan como aditivos en alimentos, bebidas lácteas y fórmulas infantiles. La principal fuente de inulina en el mundo es la chicoria, una

especie de camote de climas fríos, aunque en nuestro país son los agaves, la materia prima para elaborar también bebidas como tequila, mezcal y sotol, entre otras.

La inulina, la levana y otras estructuras complejas de fructosa no sólo se obtienen mediante procesos industriales modernos, también abundan en pro-

ductos tradicionales como nuestro ancestral pulque y la bardana en Asia. Hasta hace sólo unas décadas los agaves se usaban principalmente para elaborar bebidas alcohólicas, orgullo de nuestra gastronomía e importante lubricante social. Los agaves contienen una gran cantidad de inulina (16 a 25% de la piña de esas plantas), que podría consumirse como prebiótico, pero durante la elaboración de las bebidas se transforma en fructosa, un azúcar muy dulce que posteriormente es fermentado por las levaduras para hacer alcohol.

La miel de agave, edulcorante producido industrialmente a partir de inulina, tampoco tiene propiedades prebióticas, ya que contiene esencialmente fructosa, que fue liberada mediante calor de las cadenas que forma en la inulina. Contiene también glucosa y algo de sacarosa, que como ya señalamos, son azúcares simples. El aguamiel, en cambio, es un producto natural de determinadas especies de agave, que conserva FOS de inulina en baja proporción, pero también altas concentraciones de azúcar simple.

Las raíces de la bardana, una planta poco conocida en México pero abundante en Oriente medio y Japón, tienen los más altos niveles de inulina reportados en un producto natural: entre el 30 y 45% en la parte seca. La bardana se utiliza en la cocina oriental desde hace siglos para elaborar una ensalada cocida (*kinpira gobō*) y un tipo de sushi. Por su contenido de inulina, los productos que se elaboran con



Raíz de bardana con alto contenido de inulina.  
Foto: Kei Shooting/Shutterstock



Natto, frijol de soya fermentado.  
Foto: Naoki Kim/Shutterstock

bardana tienen propiedades que benefician directamente la microbiota intestinal.

### Viscosos, pegajosos y elásticos

Otra fuente de nutrición para nuestras bacterias intestinales y con historia de siglos de consumo local, son algunos alimentos fermentados tradicionales en los que ciertos tipos de bacterias producen fibra soluble. Dentro de la fibra bacteriana encontramos frecuentemente inulina y/o levana. Sin embargo, dada la presencia de estas moléculas, este tipo de alimentos fermentados tienen características que no los hacen muy atractivos al gusto: son viscosos, pegajosos y elásticos, pero muy adecuados para nuestras bacterias intestinales dado su carácter prebiótico.

El más popular de estos alimentos en nuestro país es el pulque, bebida de origen prehispánico cuya “baba” tiene propiedades de fibra soluble y prebióticas. Esta bebida se obtiene de la fermentación del aguamiel, un proceso que actualmente investigan diversos grupos de científicos en el país. El Dr. Adelfo Escalante y sus

colaboradores hicieron en 2016 una revisión de los estudios de este proceso realizados en el mundo que se puede consultar en la revista *Frontiers in Microbiology*. Además de la fermentación alcohólica, bacterias del pulque como *Leuconostoc mesenteroides* o *Zymomonas mobilis*, transforman la sacarosa del aguamiel en inulinas y levanas (fructanas), entre otros polisacáridos, esto es, moléculas formadas por muchos azúcares simples. Hay que incluir aquí a las dextranas, que al igual que el almidón están formadas por largas cadenas de glucosa, solo que enlazadas químicamente de forma distinta. Estos polisacáridos complejos aumentan la viscosidad de la bebida y la hacen espesa. De ahí que el pulque, entre otras propiedades, sea rico en prebióticos para beneficio de las bacterias intestinales de los adictos a él.

Es importante señalar que si bien en cada sorbo de pulque bebamos algunos residuos de las fructanas de la planta de la que éste se obtiene, la mayor parte de las fructanas que contiene provienen de bacterias que participan en el proceso de fermentación.

Buscando compuestos análogos a los que los mexicanos bebemos en el pulque, encontramos que en Japón hay un fermentado de soya llamado natto. Se trata de frijoles de soya sometidos a una fermentación en la que interviene fundamentalmente la bacteria *Bacillus subtilis natto*, cuyo nombre deriva del producto. En nuestro laboratorio del Instituto de Biotecnología de la UNAM hemos estudiado detalladamente la capacidad de *Bacillus subtilis* de elaborar levanas a partir de sacarosa, pero fue hasta hace poco que nos atrevimos a probar el natto. De hecho, hemos estudiado en detalle la enzima levansacarasa y el mecanismo que le permite producir (sintetizar) levanas de diversos tamaños, lo que influye en la viscosidad de las soluciones en la que se encuentra.

Para hacer natto, los frijoles de soya se remojan, se cuecen y luego se depositan en un recipiente donde se les añade la bacteria fermentadora. El proceso puede hacerse con la bacteria pura, como se haría en una industria, o con el mismo natto al estilo casero, como cuando agregamos búlgaros (*Lactobacillus bulgaricus*) a la leche para hacer yogur. Sólo que la preparación del natto es un poco más complicada que la del yogur o el pulque, pues hay que mantenerlo a una temperatura de 40 °C. Como resultado de la fermentación se obtienen unos frijoles recubiertos de una mucosidad que hace pensar en queso derretido sobre frijoles. Pero no es queso: un 40% de esa mucosidad es levana y el resto es otro polímero que contiene ácido glutámico, entre otros componentes. El ácido glutámico es un aminoácido abundante en las proteínas muy conocido por su capacidad de potenciar el sabor y usado ampliamente como aditivo por la industria alimentaria en forma de sal de sodio (glutamato). El natto es un producto rico en proteína y prebióticos que la mayoría de los japoneses consume más por los beneficios a la salud que por su sabor o aspecto; al menos eso pensamos después de probarlo y de interrogar a algunos japoneses.

Los productos fermentados de soya pueden encontrarse en otros países. En la

### PULQUE AZTECA

Los aztecas nombraron al pulque de muchas formas: *metoctli* (*metl* = agave, *octli* = vino), *iztaoctli* (*izac* = blanco) o *polihquioctli* (*polihqui* = podrido). De este último es de donde probablemente derivó el nombre de pulque.



Pulque, bebida fermentada.

Foto: Don Day





Durian, materia prima del condimento tempoyak de Malasia.

Foto: Torjrtx/Shutterstock



Kimchi, ensalada coreana de col salada.

Foto: Yulia K/Shutterstock

India tienen *hawaijar* y *perayaan*, y en Corea tienen *doenjang*, y aunque la preparación y la apariencia son diferentes a la del natto, en todos se han encontrado cepas de *Bacillus subtilis* y la levana asociada.

Los prebióticos también pueden llegar a las bacterias intestinales vía los condimentos, como el ajo, que contiene una buena cantidad de inulina. En Malasia e Indonesia se consume un condimento conocido como *tempoyak*, una especie de salsa preparada a partir de la pulpa del fruto del árbol del durián, fruto que se parece a la guanábana pero de tonalidad más oscura. Su producción es sencilla: se prepara la pulpa del fruto, se agrega hasta una cucharada de sal por cada 100 ml, y se deja fermentar durante siete días. Durante la fermentación el azúcar del fruto (sacarosa) se transforma en ácido láctico, málico, acético —asociados comúnmente con la acidez de nuestros alimentos— y muy particularmente en inulina. Estos ácidos orgánicos le confieren un sabor característico que se agrega al de la fruta, y la inulina le da una textura viscosa.

### Microbiota global

Una consecuencia indirecta de la globalización hasta ahora poco documentada es la tendencia a compartir bacterias de la microbiota intestinal. La disponibilidad de

materias primas y productos alimenticios de todos los rincones del mundo, ahora que los mexicanos consumimos sushi y los orientales maíz y frijoles, tiende a uniformar las microbiotas. Sin embargo, las fructanas podrían ser un factor que por miles de años ha permitido que compartamos bacterias independientemente de la región del mundo a la que pertenecemos. Un ejemplo de esto es un producto fermentado conocido como *kimchi* que se consume en Corea. Su nombre significa algo así como “vegetales en agua con sal” debido quizá a la forma en que se prepara. Se trata de un encurtido de col adicionado con otros vegetales como pepino y rábano, que se condimenta con pimienta roja y se fermenta con una bacteria del género *Leuconostoc*. Esta bacteria produce ácido láctico, la sustancia que le da a los lácteos su sabor característico y también sintetiza inulina, nuestro prebiótico predilecto.

En 2000, Jeongho Kim del Departamento de Biología de la Universidad Inha en Corea del Sur, reportó una nueva especie de *Leuconostoc* aislada de este alimento a la que llamó *Leuconostoc kimichii*. No hemos encontrado reportes de la presencia de inulina en el kimchi, quizás porque nadie la ha buscado, pero hay dos evidencias que sugieren que podría formar parte de dicho alimento: la primera es que el microorganismo es capaz de sintetizarla y la segunda es que los vegetales utilizados en su elaboración tienen un poco de sacarosa, la materia prima que *L. kimichii* requiere para elaborarla. Pues bien, hace un par de años el Dr. Adelfo Escalante, quien ha identificado decenas de bacterias en alimentos fermentados, reportó las propiedades de una bacteria aislada del pulque con capacidad de producir inulina y dextrana. Después de una caracterización genética, Escalante encontró que se trataba nada menos que de *L. kimichii*.

### MÁS INFORMACIÓN



- López Munguía, Agustín, *La biotecnología*, Tercer Milenio-CONACULTA, México, 2000.
- Wachter Rodarte, Carmen, “La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados”, *Revista Digital Universitaria*, Vol. 15, 1 de agosto de 2014: [www.revista.unam.mx](http://www.revista.unam.mx)
- Flores Ramírez, Eleonora, “Pozol: una bebida fermentada tradicional de México”, *Cienciorama*: [www.cienciorama.unam.mx](http://www.cienciorama.unam.mx)

Los seres humanos necesitamos nutrientes para nuestro organismo y nuestra microbiota. La dieta occidental y el exceso de alimentos chatarra amenazan con volver nuestras microbiotas intestinales menos diversas y hacernos más susceptibles a las enfermedades.

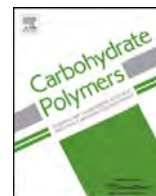
Quien vive constipado y sufre de otros problemas intestinales es porque no ha aprovechado el conocimiento que nos brinda la biotecnología moderna y las ventajas de la globalización. En vez de visitar los locales de hamburguesas, pizzas y comprar sopas rápidas en tiendas como Oxxo y Seven Eleven, habría que empezar a enriquecer nuestra dieta agregando un poco de bardana a la ensalada y aderezarla con tempoyak, entrarle al natto alternándolo con el sushi, y aprender a preparar un encurtido de col; olvidarse de los refrescos embotellados y empujarlo todo con agua, y de vez en cuando, por qué no, con pulque. Total, el ser humano no tiene por qué vivir sólo de pan. 🐼

Jaime Porras Domínguez es químico de alimentos de la Facultad de Química, maestro en ciencias y pasante de doctorado en Ciencias Bioquímicas en la UNAM.

Agustín López Munguía es investigador del Instituto de Biotecnología de la UNAM, frecuente colaborador y consejero editorial de *¿Cómo ves?*

### OPORTUNIDAD DE NEGOCIO

El natto es un fermentado de soya que está disponible en los mercados japoneses, y es apreciado por sus cualidades prebióticas. En ciertos aspectos se parece a nuestro pulque, pero los esfuerzos por industrializar este último han tenido pobres resultados, dada la complejidad de su proceso fermentativo. No obstante, su potencial nutricional recién descubierto bien podría representar un aliciente para la innovación.



## *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight



Jaime R. Porras-Domínguez<sup>a</sup>, Ángela Ávila-Fernández<sup>b</sup>, Afonso Miranda-Molina<sup>a,b</sup>,  
María Elena Rodríguez-Alegría<sup>a</sup>, Agustín López Munguía<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, CP 62240 Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>b</sup> Centro de Investigación, DACS-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Av. Gregorio Méndez no. 2838-A. Col. Tamulte, CP 86150 Villahermosa, Centro, Tabasco, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 February 2015

Received in revised form 30 May 2015

Accepted 22 June 2015

Available online 30 June 2015

#### Keywords:

Levan

Fructan

Levansucrase

SacB

Transferase

Fructosyltransferase

### ABSTRACT

Levan is a fructan polymer that offers a variety of applications in the chemical, health, cosmetic and food industries. Most of the levan applications depend on levan molecular weight, which in turn depends on the source of the synthesizing enzyme and/or on reaction conditions. Here we demonstrate that in the particular case of levansucrase from *Bacillus subtilis* 168, enzyme concentration is also a factor defining the molecular weight levan distribution. While a bimodal distribution has been reported at the usual enzyme concentrations (1 U/ml equivalent to 0.1  $\mu$ M levansucrase) we found that a low molecular weight normal distribution is solely obtained at high enzyme concentrations (>5 U/ml equivalent to 0.5  $\mu$ M levansucrase) while a high normal molecular weight distribution is synthesized at low enzyme doses (0.1 U/ml equivalent to 0.01  $\mu$ M of levansucrase).

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Levansucrases are enzymes that carry out transferase and hydrolysis reactions from sucrose as substrate, in which transferase results in levan, a fructan polymer joined mainly through  $\beta$ -2,6 linkages. Levansucrase activity has been described in bacterial species such as *Microbacterium laevaniformans*, *Rahnella aquatilis*, *Zymomonas mobilis*, and some *Bacillus*, *Erwinia* and *Pseudomonas* species. Hydrolysis to transferase activities in levansucrases may be modulated by several factors such as sucrose concentration, temperature or the presence of organic solvents in the reaction medium. In general, high sucrose concentration increases transferase activity and markedly reduce sucrose hydrolysis (Euzenat, Guibert, & Combes, 1997); low temperatures also promote transferase (Tanaka, Oi, & Yamamoto, 1980), while high temperatures favor hydrolysis (Chambert & Gonzy-Treboul, 1976); high concentrations of organic solvents also increase transferase activity (Castillo & López-Munguía, 2004; Chambert & Petit-Glatron, 1989)

Levan is the main product of levansucrase transferase activity and has a molecular weight (Mw) associated to the source of the enzyme. Some levansucrases synthesize oligosaccharides such as the enzymes from *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Z. mobilis* and *Lactobacillus sanfranciscensis* while levans produced by enzymes obtained from cultures of *Gluconoacetobacter xylinus*, *M. laevaniformans*, *R. aquatilis* and *Z. mobilis* have average Mw of 40, 710, 380 and 570 kDa, respectively (Yoo, Yoon, Cha, & Lee, 2004). According to Ozimek, Kralj, van der Maarel, and Dijkhuizen (2006) fructans may be synthesized by two distinct processes following either a processive or a non-processive mechanism, at least in the case of levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121. Nevertheless, in some particular cases, levansucrases produce *in vitro* levan with a bimodal type Mw distribution. This is the case of *Z. mobilis* levansucrase which is able to synthesize high and low Mw levan with an average of 3000 and 5 kDa respectively (Byun, Lee, & Mah, 2014). Similarly, *Bacillus subtilis* 168 levansucrase synthesizes levan with high ( $\geq 2000$  kDa) and low (8.3 kDa) average Mw distributions (Ortiz-Soto, Rivera, Rudiño-Piñera, Olvera, & López-Munguía, 2008), and *B. subtilis* TH4-2 which produces levans of 6 and 660 kDa (Ben Ammar, Matsubara, Ito, Iizuka, & Masaru, 2002), in all cases under the reaction conditions tested.

Levan Mw distributions may also be modulated by several factors all related to reaction conditions. Temperature for instance has an unclear effect, as *Bacillus sp.* TH4-2 levansucrase produces

\* Corresponding author. Tel.: +52 5556227637; fax: +52 5556227671.

E-mail addresses: [jrpcd@ibt.unam.mx](mailto:jrpcd@ibt.unam.mx) (J.R. Porras-Domínguez), [angela.avila@ujat.mx](mailto:angela.avila@ujat.mx) (Á. Ávila-Fernández), [maelena@ibt.unam.mx](mailto:maelena@ibt.unam.mx) (M.E. Rodríguez-Alegría), [agustin@ibt.unam.mx](mailto:agustin@ibt.unam.mx) (A.L. Munguía).

levan with average Mw of 8 kDa at 30 °C, while at 50 °C the bimodal distribution already described is observed. But contrary to other levansucrases, this enzyme is able to produce high Mw levan at 50 °C (Ben Ammar et al., 2002) which is the same effect observed for levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 which synthesizes high Mw levan (612 kDa) as a major product at 50 °C while at low temperature (30 °C), an 11 kDa levan is the main product. The effect of temperature is different in levansucrase from *B. subtilis* C4 which produces high Mw levan more efficiently at 37 °C than at 60 °C (Euzenat et al., 1997). Other factors described in the literature include the ionic strength and the presence of solvents. In reactions with levansucrase from *B. subtilis*, the average Mw distribution is shifted toward high Mw levan in the presence of 40% ethanol or 20% polyethylene glycol. On the contrary, levan Mw distribution shifts from the bimodal type, to a single low Mw distribution increasing the ionic force from 0.08 to 0.8 mM phosphate buffer (Tanaka et al., 1980). A similar effect is observed in levansucrase from *B. licheniformis* RN-01 when 0.5 M NaCl is included in the reaction medium, with 11 kDa as the major levan size obtained at various reaction temperatures (Nakapong, Pichyangkura, Ito, Iizuka, & Pongsawasdi, 2013).

Levan offers a variety of applications depending on its Mw, particularly in the fields of health, cosmetics and foods (Belghith, Song, Kim, & Rhee, 1996). Levans can be used as industrial rubber, substitute for blood plasma, and as a prebiotic sweetener. Other proposed potential applications include its use as emulsifier, stabilizer, thickener and carrier of flavors and fragrances (Shih, Yu, Shieh, & Hsieh, 2005). Furthermore, levan from *B. licheniformis* has been proposed as biological sealant in highly permeable soils, reducing significantly the hydraulic conductivity (Ghaly, Arab, Mahmoud, & Higgins, 2007). In recent years, reports about the health benefits of levan have increased, most of them associated to a particular levan size. High Mw levan produced by levansucrase from *B. subtilis* NRC1aza and its sulfated derivative exhibits the strongest free radical scavenging activity with DPPH (Abdel-Fattah, Gamal-Eldeen, Helmy, & Esawy, 2012). The low Mw levans produced by levansucrase from *Z. mobilis* have a stronger *in vitro* antibacterial inhibitory effect than the high Mw levan (Byun et al., 2014). Levans produced by several *Z. mobilis* strains show anti-tumor activities depending on the polysaccharide size (Calazans, Lima, de Franca, & Lopes, 2000). It is also important to point out that levan has been part of a traditional fermented product known as natto, produced from cooked soybeans using *B. subtilis* natto, and consumed in Japan since early times (Shurtleff & Aoyagi, 2014). More recently, the prebiotic properties of levan-type fructooligosaccharides have been evaluated to explore its role as soluble fiber and/or prebiotics (Porras-Domínguez et al., 2014).

Therefore, the possibility to define reaction conditions leading to the synthesis of levan with a defined Mw is an interest subject to understand the mechanism of levan chain elongation, but also to ensure the efficient production and availability of levans required for industrial scale applications.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Enzyme preparation

Recombinant *B. subtilis* 168 levansucrase (SacB) was obtained as previously described (Ortiz-Soto et al., 2008). *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformants were grown in Luria-Bertani broth containing 100 µg/ml of ampicillin at 37 °C. Culture was induced during 8 h at 18 °C by addition of 0.2 mM IPTG when the optical density reached 0.5. Cells recovered by centrifugation were suspended in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.0) and broken with a French Press (Thermo Spectronic). Enzyme was purified by ion exchange

chromatography (AKTA prime; Amersham Pharmacia Biotech). The enzymatic extract was charged in a CM Sepharose resin (Pharmacia) previously equilibrated at pH 6.0 with 100 mM phosphate buffer at 1 ml/min, and eluted in a 100–1000 mM phosphate buffer (pH 6.0) gradient.

### 2.2. Standard activity assay

Levansucrase activity was assayed at 37 °C in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) using 1% sucrose solutions as substrate in 500 µl reactions. Global initial rate was determined by measurement of the reducing sugar released by DNS method (Miller, 1959). This is a general activity measurement used only as reference as the reducing power release includes both glucose and fructose in the case of hydrolytic activity, but only glucose in the transferase activity. Moreover, when low Mw levans are synthesized, a significant amount of sucrose molecules are consumed as acceptors, so that the reaction rate determination requires the measurement of sucrose consumption. Therefore, global activities are only measured during initial rates where the enzyme is mainly hydrolytic and the resulting values used only as reference for reaction conditions. However, when required, the activity value was corrected by HPLC determination of sucrose, glucose and fructose concentrations (see later). One global enzyme unit (U) was defined as the amount of enzyme that releases 1 µmol of glucose per minute. The effect of temperature on the Mw of the reaction products was evaluated at 4 °C and 37 °C in reactions containing 5 U/ml of enzyme activity, while the effect of sucrose concentration was evaluated in the range of 200–600 g/l. The effect of enzyme concentration was evaluated using 0.1, 1.0 and 10.0 U/ml of levansucrase activity in assays performed at 37 °C. All measurements were carried out in duplicates.

### 2.3. Identification and analysis of products

#### 2.3.1. Structural analysis of low and high Mw levans

Low and high Mw levans were purified from reaction by ethanol fractionation using 3.5 and 1.5 v/v respectively. The precipitated levans were washed three times and freeze dried.

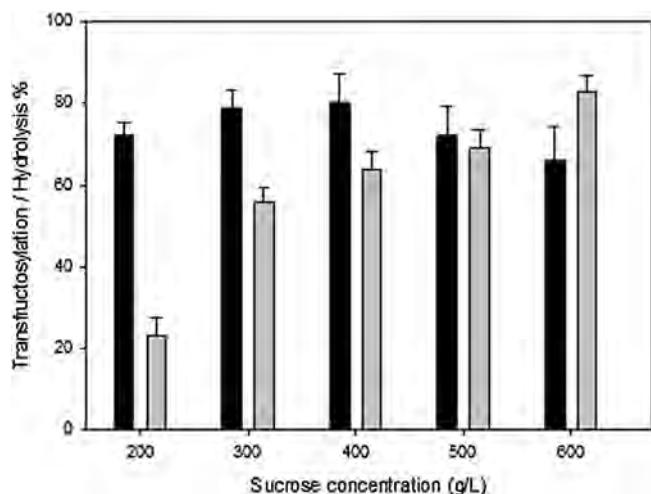
Levan structure was characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) in a Varian 400 instrument operated at 100 MHz for <sup>13</sup>C and at 400 MHz for <sup>1</sup>H. FT-IR Spectroscopy was also obtained for the low and high Mw levan in a Fourier NICOLET 6700 between 400 and 4000 wave number (cm<sup>-1</sup>), with DTGS KBr detector.

#### 2.3.2. Polymer analysis by GPC and HPAEC-PAD

The Mw distributions of levan produced in levansucrase reactions were determined by gel permeation chromatography (GPC), with an HPLC equipment (see later) equipped with an isocratic pump and a refractive index detector (Shodex). Size exclusion columns of Ultrahydrogel Linear (7.8 mm × 300 mm) and Ultrahydrogel 500 (7.8 mm × 300 mm) with a size exclusion index between 0.50 and 10,000 kDa, respectively, were serially connected on the HPLC equipment. Levans diluted 1/10 directly from reactions were analyzed in the GPC columns at 37 °C with 0.8 ml/min of 0.1 M sodium nitrate as eluent. A 10 µl 1/10 diluted samples from the reaction medium were directly injected to the HPLC. Dextrans of 5.2, 11.6, 23.8 and 48.6 kDa at 1% (w/v) (Waters. Polymers Std. Service) were used as standards to determine the low Mw levan profile. For the high Mw levan, a 2000 kDa dextran standard was available (Sigma Chemical), which is eluted in the column void volume.

A 10 µl sample of the low Mw levan distribution diluted 1/10 from the reaction medium was also analyzed by high performance anion exchange chromatography (HPAEC), using a precolumn and a CarboPac PA 200 column (Dionex) (3 mm × 250 mm) at 30 °C. NaOH (150 mM) was used as the mobile phase at 0.5 ml/min.





**Fig. 1.** Transfructosylation and hydrolysis reaction specificities (%) in levansucrase reactions as a function of sucrose concentration at 4 °C (black) and 37 °C (gray). Hydrolysis and reaction products were measured at final sucrose conversions in reactions with 5 U/ml of enzyme activity in 50 mM phosphates buffer (pH 6.0).

Detection was performed using a pulsed amperometric detector (PAD, Dionex). Integration was carried out using the Chromeleon Dionex software.

### 2.3.3. Sugars HPLC analysis

In order to measure sucrose, fructose, and glucose concentrations, samples were centrifuged and analyzed in an HPLC system (Waters 510) equipped with a Prevail Carbohydrate ES column (Part. No. 35101 Alltech) (4.6 mm × 250 mm) and a refracton index detector (Shodex). Separations were carried out from 10 µL samples of appropriate dilution charged at 30 °C and using a 75:25 acetonitrile:water mixture as eluent and a flow rate of 1.0 ml/min. All measurements were performed in duplicates.

### 2.4. Determination of kinetic constants of hydrolysis and transferase

In order to study the effect of sucrose concentration and temperature on reaction specificity (hydrolysis and transferase) and levan distribution profile, reactions were carried out at 4 and 37 °C varying sucrose concentrations from 200 g/l to 600 g/l. The transferase and hydrolysis rates were determined from glucose, fructose and

sucrose quantification carried during the reaction. The efficiency of the transferase reaction (expressed as transferase percentage, %T) is obtained with the following equation:

$$\%T = \frac{S_i - S_r - F_f}{S_i - S_r} \times 100$$

where  $S_i$  is the sucrose initial molar concentration,  $S_r$  is the residual sucrose molar concentration and  $F_f$  is the free fructose molar concentration (which is equivalent to the molar concentration of the hydrolyzed sucrose).

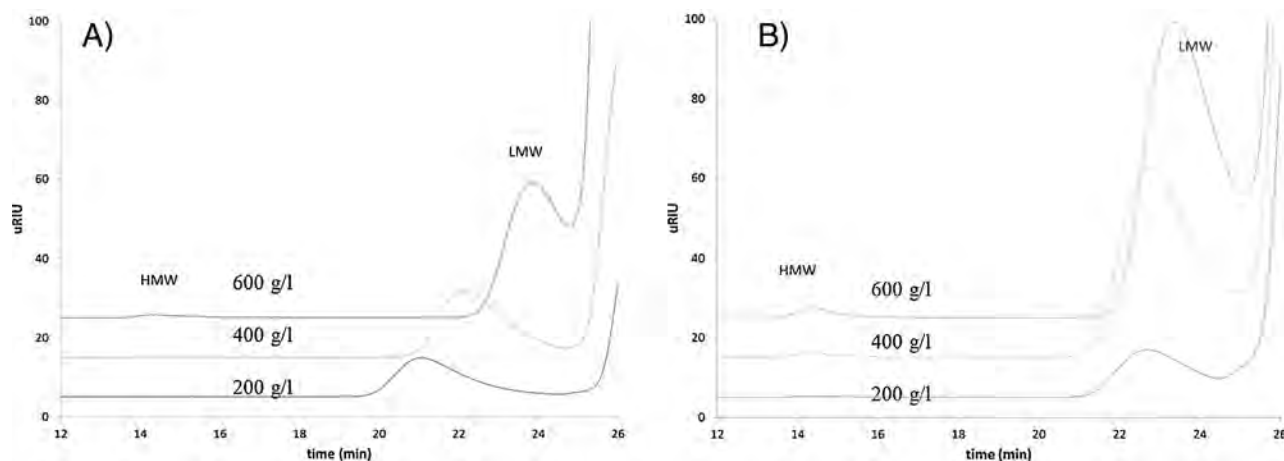
Independent kinetic constants for hydrolysis and transferase reactions were determined from initial reaction rate data measured in a sucrose concentration range of 0–300 mM sucrose, adjusting protein concentration to an enzymatic activity of 0.5 U/ml. Fructose is the result of the hydrolytic activity, while the difference between glucose and fructose concentration is the result of the transferase activity. Data was analyzed through a non linear fit to the Michaelis–Menten equation using the GraphPad Prism software, version 3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). All measurements were carried out by duplicate on two batches of purified protein. Some reactions were also monitored until final conversion, in order to follow the evolution of hydrolysis and transferase during the reaction.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Effect of sucrose concentration and reaction temperature on the transferase reaction of *B. subtilis* levansucrase (SacB)

When reactions are performed at 4 °C, transferase is favored regardless of the substrate concentration (Fig. 1). On the other hand, in reactions carried out at 37 °C, where higher rates occur, transferase activity decreases but increases with initial substrate concentration, going from 20% transferase efficiency at the lowest substrate concentration to 83% at the highest. These evaluations were performed when conversions above 95% were reached, in all cases after 24 h of reaction. It is important to point out that in these experiments at 5 U/ml of enzyme activity, only a low Mw levan distribution is observed,

As far as the Mw is concerned, as sucrose concentration increases, the average Mw of the low dextran distribution decreases as already reported by Euzenat et al. (1997). This is shown in Fig. 2, where the reduction in average Mw is clearly observed at 4 °C. In particular, at 4 °C compared to 37 °C, the low Mw distribution region increases



**Fig. 2.** GPC Mw distributions of levan molecules as a function of temperature and substrate concentration in synthesis with 5 U/ml of *B. subtilis* levansucrase in 50 mM acetate buffer (pH 6.0) (A) 4 °C and (B) 37 °C. Distributions were obtained at final conversion. LMW = low molecular weight levan distribution (see Table 1). HMW = high Mw levan distribution (average ≥ 2000 kDa).

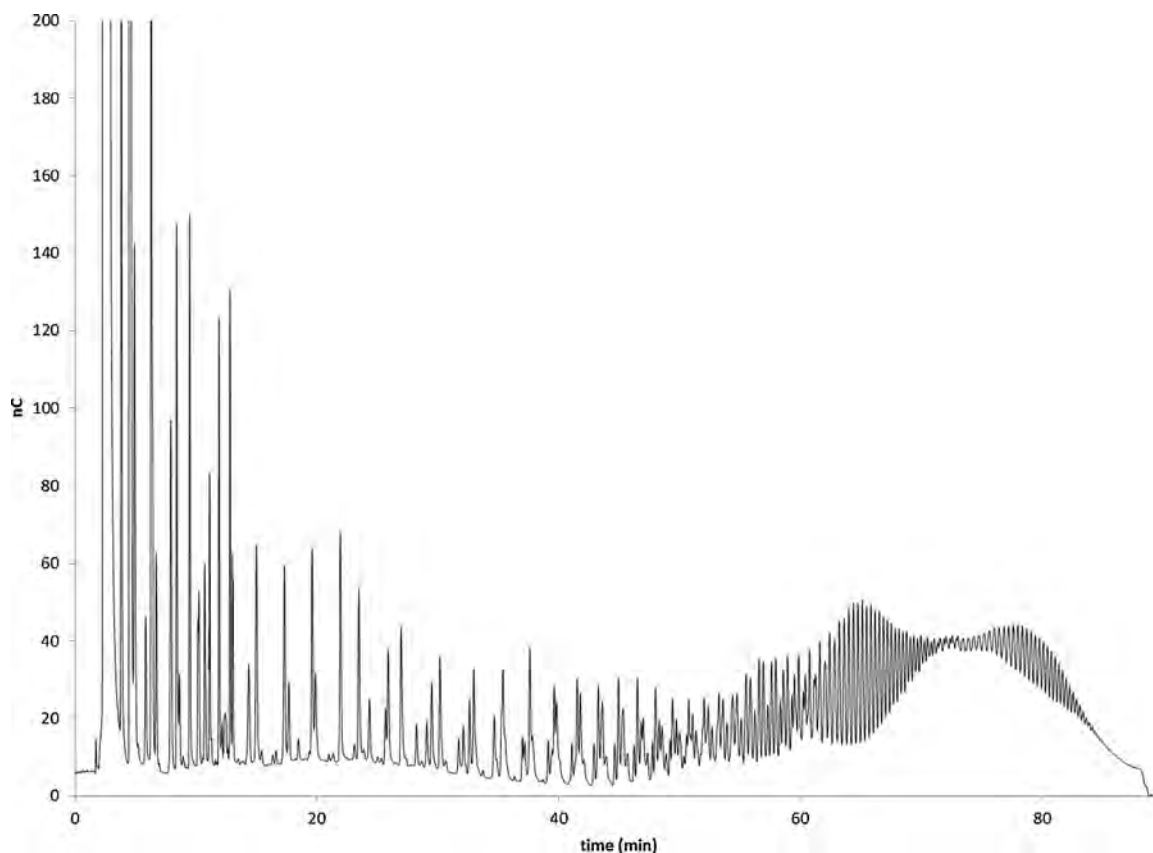


Fig. 3. HPAEC chromatogram of a low levan Mw distribution fraction, exclusively synthesized at 200 g/l sucrose with 5 U/ml of *B. subtilis* levansucrase at 37 °C.

in size at any given substrate concentration, and a maximum of 20.64 kDa is obtained at 200 g/l (Table 1).

As already mentioned, in almost all cases there is an exclusive synthesis of low Mw levans, which account for 99% of the total transferase products, as calculated from the area under the curve of the reaction products from the GPC chromatograms obtained at the end of the synthesis (Fig. 2). Only when sucrose concentration reaches very high values (600 g/l) an incipient amount of high Mw levan is observed. Previous reports (Ortiz-Soto et al., 2008; Tanaka et al., 1980) often refer to a bimodal levan distribution, with the low Mw levan accounting for only 60% of the total levan products. However, experiments reported in the literature where the bimodal distribution is obtained are performed at 0.8–1.0 U/ml of enzyme activity. Therefore, the effect of enzyme concentration should be considered.

In fact, what is observed by GPC as a low Mw levan is a wide distribution of molecules as demonstrated by the HPAEC-PAD analysis which includes residual sucrose, fructose, glucose and several fructooligosaccharides that increase in size up to a polymerization degree of 50 (Fig. 3). Higher Mw levans can not be separated by the column.

**Table 1**  
Effect of temperature and sucrose concentration on the average size of the levan low Mw distribution (see Fig. 2).

| Sucrose concentration (g/l) | Temperature (°C) | Mw (kDa) |
|-----------------------------|------------------|----------|
| 200                         | 37               | 7.73     |
| 400                         | 37               | 7.26     |
| 600                         | 37               | 4.98     |
| 200                         | 4                | 20.64    |
| 400                         | 4                | 10.62    |
| 600                         | 4                | 4.50     |

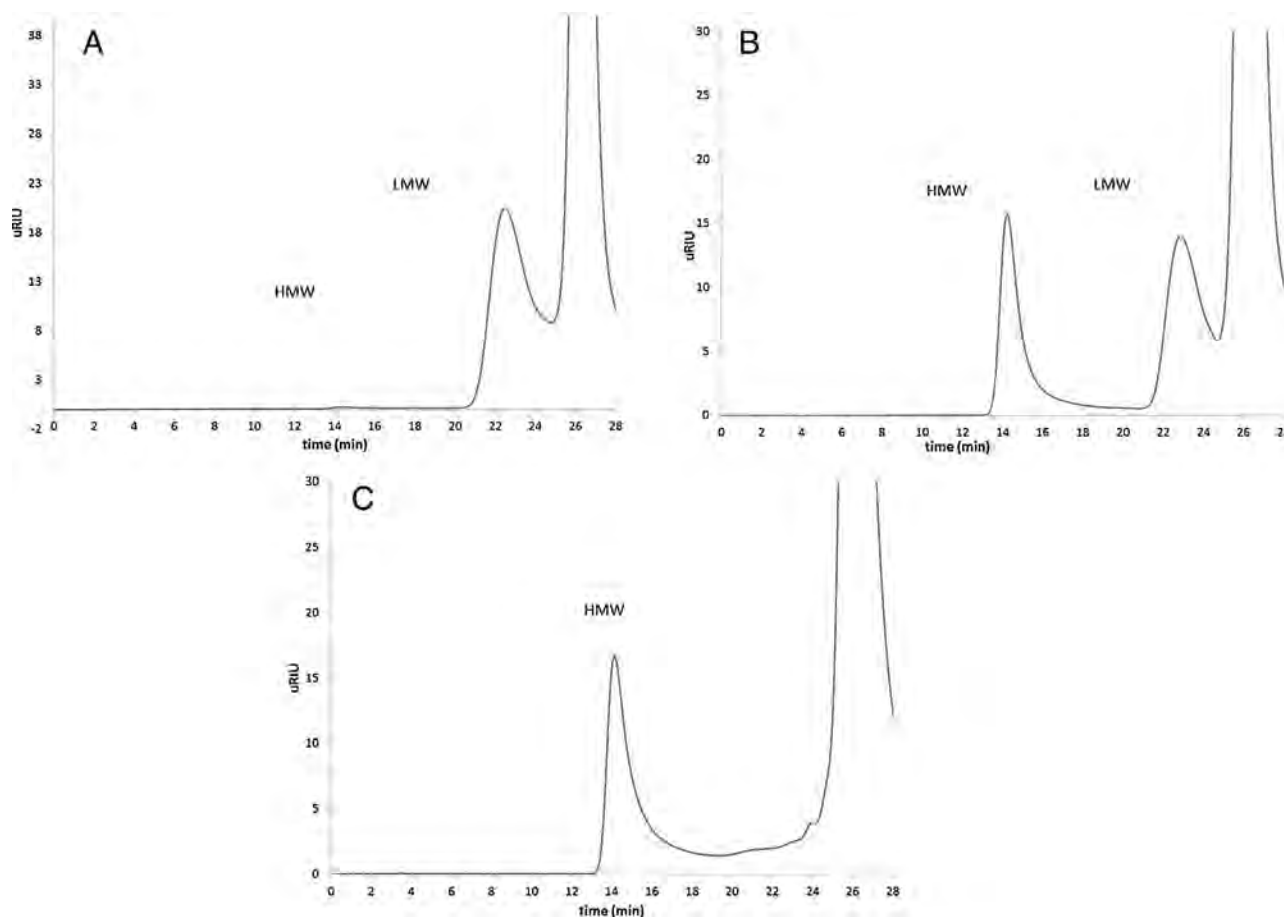
### 3.2. Effect of enzyme concentration on the Mw distribution of levan synthesized by SacB levansucrase

To further validate the previous conclusion, SacB reactions were carried out at three different enzyme concentrations including experiments at 1.0 U/ml, where the well known bimodal distribution of levan molecules has been reported, a high (10 U/ml), and a low (0.1 U/ml) enzyme activity, equivalent to 0.1, 1 and 0.01 μM of levansucrase, in order to explore a large spectra of enzyme concentration. Sucrose was included in all reactions at 200 g/l.

Surprisingly, under low enzyme concentration conditions (0.1 U/ml) at 200 g/l of sucrose the exclusive synthesis of high Mw levan was observed (Fig. 4C). To our knowledge this is the first report dealing with the exclusive synthesis of high Mw levan modulated with a low enzyme concentration and, although a bimodal distribution is obtained at the usual activity levels (1 U/ml), we also show here that the product Mw may be also shifted toward low Mw levans if the enzyme concentration is increased to activities higher than 5 U/ml. SacB concentration is therefore an additional parameter that can be handled in the design of specific Mw levans.

Interestingly, in these experiments only two distributions are observed without any intermediate products detected in the GPC chromatogram between the two levan distributions (Fig. 4B). This might be explained through a shift in the enzyme synthesis mechanism to a processive-type when going from a high to a low enzyme concentration. In the processive-type manner, there is no release of intermediates to the reaction medium, a mechanism associated to the high Mw levan synthesis (Fig. 4C).

Levan Mw bimodal distributions has been observed in synthesis with levansucrases from various *B. subtilis* strains, with different average Mw values, but so far, an effect of enzyme concentration on the Mw distribution has not been described. Abdel-Fattah,



**Fig. 4.** GPC Mw distributions of levan molecules as a function of enzyme activity in synthesis with levansucrase using 200 g/l of sucrose at 37 °C in 50 mM acetate buffer (pH 6.0) (A) 5 U/ml, (B) 1 U/ml and (C) 0.1 U/ml. Distributions were obtained at final conversion. LMW = low molecular weight levan distribution (average 7.2 kDa). HMW = high molecular weight levan distribution (average  $\geq$  2000 kDa).

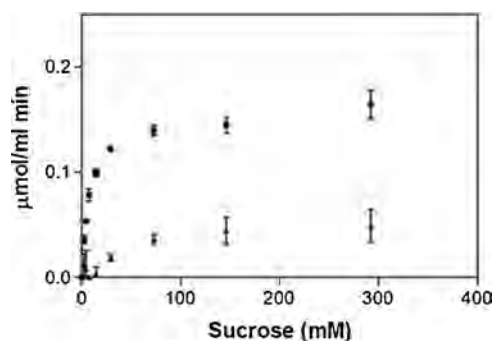
Mahmoud, and Esawy (2005) reported no effect of levansucrase from *B. subtilis* NRC on the synthesized levan Mw distribution, reporting a normal Mw distribution with an average of around 50 kDa. In the case of levan from *B. subtilis* C4 levansucrase, whose Mw distribution is bimodal (similar to levansucrase *B. subtilis* 168), high enzyme concentrations (equivalent to 4 U/ml) also result in low Mw products. However, the authors also report high Mw levan, probably due to the high substrate concentration used (342 g/l) (Euzenat et al., 1997).

On the other hand, in levansucrase from *Z. mobilis* the product profile seems to be related to two possible forms of the enzyme, which are dependent on pH. In effect, at pH 6.0 a dimer is form which behaves mainly as an hydrolytic enzyme, with the synthesis of a trisaccharide, while at pH 7.0 the enzyme forms microfibrils which synthesize levan with an average Mw of 20 kDa (Goldman et al., 2008). Several authors have reported that *B. subtilis* levansucrase is a monomer, although the possibility of a dimer or oligomer formation may be dependent on the enzyme concentration. Moreover, SacB crystal structure shows a monomer at least in the crystal forming conditions (Meng & Fütterer, 2003), which are different from the synthesis reaction conditions.

### 3.3. Levan structure

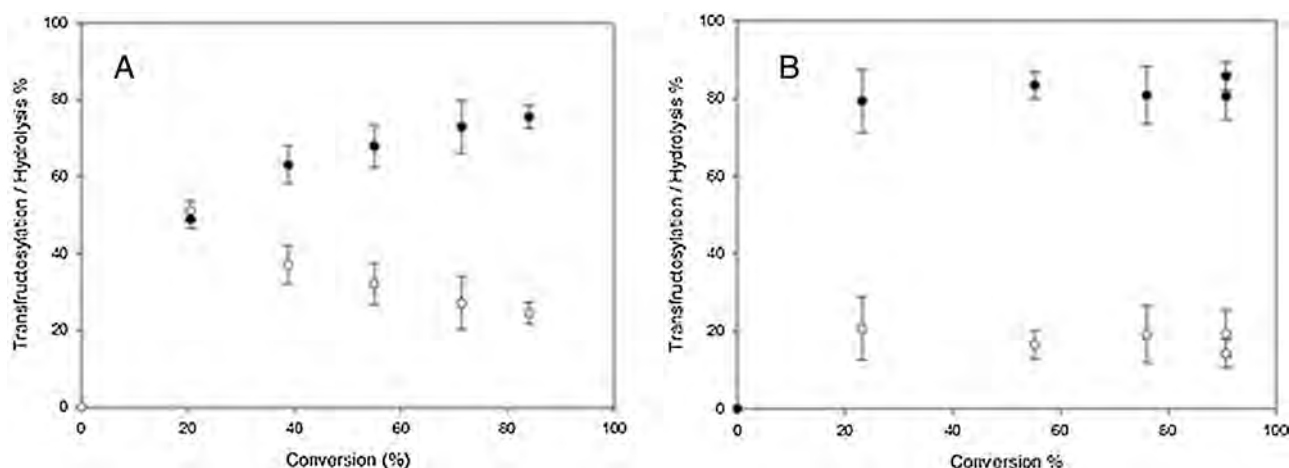
Tanaka et al. (1980), found that both, low and high Mw levan consist of a set of linear chains of around 11 fructose molecules each, joined by  $\beta$  (2–1) linkages, including a glucose unit per levan

molecule. The levan fractions were purified and their structure analyzed by  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and FT-IR. We found that the  $^1\text{H}$  NMR spectrum is similar for both polymers. However, in the proton spectrum for low Mw levan, there is a clear presence of  $\alpha$ -anomeric protons in the region  $\delta$  5.1–5.3, corresponding to glucose molecules. In the case of high Mw levan, it is not possible to detect the glucose molecules by  $^1\text{H}$  NMR, as the ratio fructose to glucose molecule is overwhelming. The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of both levans show seven signals in the region of skeletal protons ( $\delta$  4.25–3.20) corresponding to  $\beta$ -fructofuranose units, easily assigned by COSY. In the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the low Mw levan, the C-2 signal of  $\beta$ -fructofuranose



**Fig. 5.** Initial sucrose hydrolysis (■) and transferase (▲) *B. subtilis* levansucrase activities at a wide range of sucrose concentrations. Enzyme concentration 0.5 U/ml, 37 °C, in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0).





**Fig. 6.** Evolution of the hydrolytic (○) and transferase (●) specificities in levansucrase reaction as a function of sucrose conversion in reactions with (A) 1 U/ml, with 600 g/l of sucrose, at 37 °C in pH 6.0, 50 mM phosphate buffer. (B) 0.1 U/ml at 200 g/l of sucrose, at 37 °C in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0).

appears at  $\delta$  106.67, C-1 and C-6 of methylenes at  $\delta$  62.28 and 65.84. The  $^{13}\text{C}$  NMR of the high Mw levan shows six resonance signals at  $\delta$  104.11 (C-2), 80.18 (C-5), 76.12 (C-3), 75.05 (C-4), 63.25 (C-6) and 59.71 (C-1). Therefore, both polymers contain mainly fructose; glucose is only detected in the low Mw polymer.

Both levans were also analyzed by IR. In both spectra an intensive broad band due to  $\nu(\text{CC})$  and  $\nu(\text{CO})$  vibrations with a maximum at  $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$  was observed, with two shoulders at  $\sim 940\text{ cm}^{-1}$  and  $\sim 1130\text{ cm}^{-1}$ , that correspond to fructose molecules. As in NMR, the differences in both spectra is due to the influence of glucose molecules observed only in the low Mw levan around  $2200\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ . The NMR and IR spectra are included as supplementary material.

#### 3.4. Evolution of hydrolysis and transferase reaction

The measurement of SacB initial hydrolysis and transferase rates was performed in a wide range of sucrose concentration, in the enzyme concentration region where the bimodal levan distribution is found (0.5–1 U/ml) (Fig. 5). It is clearly shown that the initial reaction is mainly hydrolytic, as indicated by the negligible difference between free glucose and fructose concentrations. From this data, SacB  $k_{\text{cat}}$  values for sucrose hydrolysis and transferase activities of  $71.24 \pm 3.1$  and  $26.57 \pm 1.1\text{ s}^{-1}$  were respectively calculated, while  $K_{\text{m}}$  for sucrose increased from  $8.26 \pm 0.41$  to  $57.62 \pm 2.7\text{ mM}$  for hydrolysis and transferase reactions, respectively. Therefore, if SacB is analyzed only through initial rate experiments, a highly hydrolytic enzyme is found (50%) even at high sucrose concentration for this enzyme concentration.

As the reaction proceeds, SacB becomes less hydrolytic while transferase becomes preponderant to reach up to 80% at the end of the reaction, as also shown in Fig. 6A. Water is a better acceptor than sucrose of the fructosyl unit that is transferred by the enzyme, while sucrose is the initial acceptor for levan synthesis. In contrast, when hydrolysis/transferase activities are followed for 0.1 U/ml reactions (Fig. 6B) much less sucrose hydrolysis is found (20%).

It has been known since long (Hestrin, Feingold, & Avigad, 1956) that fructose may act as acceptor to produce levanobiose, which in turn acts as acceptor of fructosyl moieties, setting the basis of an alternative mechanism of fructan elongation. The difference in the synthesis of low or high Mw levan may be explained by the synthesis of higher affinity acceptors built from fructose issued from sucrose hydrolysis. The exact mechanism of levan elongation is still open to question, in particular this new evidence in which enzyme concentration is also a factor influencing levan Mw distribution.

#### 4. Conclusions

Levan Mw distribution in synthesis with *B. subtilis* levansucrase (SacB) may be modulated through enzyme concentration in the reaction medium. Although it has been known since long that several factors such as temperature, ionic force, organic solvents, among others, define levan Mw distributions, we here demonstrate that the bimodal Mw distribution reported at common enzyme concentrations (1 U/ml), may be shifted to a normal high Mw distribution of levans (average of  $\geq 2000\text{ kDa}$ ) at low enzyme concentration (0.1 U/ml) or to a low normal Mw distribution levans with average Mw depending on temperature and sucrose concentration at high enzyme doses ( $>5\text{ U/ml}$ ). The exact mechanism of levan elongation is still open to debate.

#### Acknowledgments

This work was supported by DGAPA-UNAM (PAPIIT No. IN212311-3); CONACYT (Proinnova 198044) and the UJAT project UJAT-2012-IB-39 for financial support. The authors thank Mario Trejo, Fernando Gonzalez, Juan Manuel Hurtado and Roberto Rodriguez for technical support.

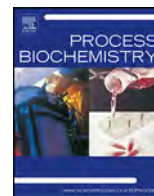
#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.carbpol.2015.06.056](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.056)

#### References

- Abdel Fattah, A. F., Mahmoud, D. A., & Esawy, M. A. (2005). Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Current Microbiology*, 51(6), 402–407.
- Abdel-Fattah, A. M., Gamal-Eldeen, A. M., Helmy, W. A., & Esawy, M. A. (2012). Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 314–322.
- Belghith, H., Song, K. B., Kim, C. H., & Rhee, S. K. (1996). Optimal conditions for levan formation by an overexpressed recombinant levansucrase. *Biotechnology Letters*, 18(4), 467–472.
- Ben Ammar, Y., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., et al. (2002). Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *Journal of Biotechnology*, 99, 111–119.
- Byun, B. Y., Lee, S. J., & Mah, J. H. (2014). Antipathogenic activity and preservative effect of levan ( $\beta$ -2,6-fructan), a multifunctional polysaccharide. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(1), 238–245.
- Calazans, G. M. T., Lima, F., de Franca, P., & Lopes, C. E. (2000). Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 245–247.

- Castillo, E., & López-Munguía, A. (2004). Synthesis of levan in water-miscible organic solvents. *Journal of Biotechnology*, 114(1), 209–217.
- Chambert, R., & Gonzy-Treboul, G. (1976). Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Kinetic and thermodynamic aspects of transfructosylation processes. *European Journal of Biochemistry*, 62, 55–64.
- Chambert, R., & Petit-Glatron, M. F. (1989). Study of the effect of organic solvents on the synthesis of levan and the hydrolysis of sucrose by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Carbohydrate Research*, 191(1), 117–123.
- Euzenat, O., Guibert, A., & Combes, D. (1997). Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*, 32(3), 237–243.
- Ghaly, A. E., Arab, F., Mahmoud, N. S., & Higgins, J. (2007). Production of levan by *Bacillus licheniformis* for use as a soil sealant in earthen manure storage structures. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 3(2), 47.
- Goldman, D., Lavid, N., Schwartz, A., Shoham, G., Danino, D., & Shoham, Y. (2008). Two active forms of *Zymomonas mobilis* levansucrase. An ordered microfibril structure of the enzyme promotes levan polymerization. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32209–32217.
- Hestrin, S., Feingold, D. S., & Avigad, G. (1956). The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 3. Donor–acceptor specificity of levansucrase from *Aerobacter levanicum*. *Biochemical Journal*, 64(2), 340–351.
- Meng, G., & Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(11), 935–941.
- Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Nakpong, S., Pichyangkura, R., Ito, K., Iizuka, M., & Pongsawasdi, P. (2013). High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 30–36.
- Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñera, E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering, Design & Selection*, 21(10), 589–595.
- Ozimek, L. K., Kralj, S., van der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyze processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology*, 152(4), 1187–1196.
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Escalante, A., González-Cervantes, R., et al. (2014). Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochemistry*, 49(5), 783–790.
- Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J., & Hsieh, C. Y. (2005). Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8211–8215.
- Shurtleff, W., & Aoyagi, A. (2014). *History of soybeans and soyfoods in Japan, and in Japanese cookbooks and restaurants outside Japan (701 CE to 2014)*. Soyinfo Center.
- Tanaka, T., Oi, S., & Yamamoto, T. (1980). The molecular structure of low and high molecular weight synthesized by levansucrase. *Journal of Biochemistry*, 87(1), 297–303.
- Yoo, S. H., Yoon, E. J., Cha, J., & Lee, H. G. (2004). Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1–2), 37–41.



## Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase



Jaime R. Porras-Domínguez<sup>a</sup>, Ángela Ávila-Fernández<sup>b</sup>, María Elena. Rodríguez-Alegría<sup>a</sup>, Alfonso Miranda-Molina<sup>a</sup>, Adelfo Escalante<sup>a</sup>, Rina González-Cervantes<sup>c</sup>, Clarita Olvera<sup>a</sup>, Agustín López Munguía<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dpto. de Ingeniería celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>b</sup> Centro de Investigación, DACS-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Av. Gregorio Méndez no. 2838-A. Col. Tamulte, CP 86150 Villahermosa, Centro, Tabasco, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100 Villa Quietud, 04960 Coyoacán, Distrito Federal, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 November 2013  
Received in revised form 31 January 2014  
Accepted 12 February 2014  
Available online 22 February 2014

#### Keywords:

Levan  
Levan-type FOS  
Fructooligosaccharides  
Endolevanase  
Levansucrase  
Prebiotics

### ABSTRACT

In the present work we describe an enzymatic production method to obtain  $\beta$ 2-6 fructose oligosaccharides (levan-type FOS) through a sequential reaction in which a bacterial endolevanase is applied to levan produced from sucrose by bacterial levansucrases. A putative gene encoding an endolevanase, designated as LevBI, was identified through a bioinformatics search, isolated from a strain of *Bacillus licheniformis* IBT1 from our own collection and expressed in *Escherichia coli*. LevBI showed a specific activity of 1.8 U/mg protein at 35 °C in 50 mM phosphate buffer pH 6.0. A first order kinetic behavior was found when up to 150 g/L of low molecular weight levan (8.3 kDa) was used as the substrate. The product profile was determined by HPAEC-PAD and consisted of levan-type FOS with a polymerization degree between 2 and 8, with levanbiose as the major product after long reaction times. Yields of 97% of levan-type FOS were obtained when 1.0 U/mL of LevBI reacted with 100 g/L of levan produced by the levansucrase from *Bacillus subtilis*. Finally, it was observed that levan-type FOS are efficiently fermented by probiotic lactic acid bacteria.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Prebiotics are useful functional ingredients in the food industry because they are selectively fermented by the intestinal microbiota, which produce specific changes in its composition and activity and, ultimately, provides the host with health benefits [1,2]. Structurally, there are two main types of fructans: inulin and levan, which bear  $\beta$ 2-1 and  $\beta$ 2-6 linkages between fructose units in the main polymer chain, respectively. In the same context, fructans are known as fructooligosaccharides (inulin-type or levan-type FOS) when they contain a polymerization degree lower than 10. Inulin-type FOS are most likely the most widely studied compounds exhibiting proven prebiotic properties [1]. Inulin and inulin-type FOS prebiotic properties have been widely confirmed through both in vivo and in vitro experiments and, together with GOS (galactooligosaccharides), are now the most important components of industrially formulated prebiotic foods [3]. Commercial inulin-type

FOS are produced either from sucrose using fungal fructosyltransferases using sucrose as a substrate or from chicory inulin using microbial endoinulinases [4].

Despite several reports demonstrating the potential applications of levan-type FOS as food and feed additive [5,6] in agriculture [7] as well as its pharmaceutical applications [8], the production of levan-type FOS has not reached industrial levels. In particular, there are reports of fructans containing anti-tumor properties [9], and more recently, their ability to inhibit diabetes-induced hyperglycemia and oxidative stress has been reported [10,11]. Marx et al. [12] observed that levan-type FOS obtained via the acid hydrolysis of levan were metabolized by different *Bifidobacterium* strains, thus further demonstrating their prebiotic potential. Nevertheless, the levan-type FOS prebiotic properties have not been fully characterized, likely due to their limited availability. Because there is an existing process to produce inulin-type FOS, an enzymatic method involving the hydrolysis of levan to produce lev-FOS may be possible. However, with the lack of an available plant source of levan, as there is for inulin, it is possible to derive an enzymatic two-step process to produce levan-type FOS from microbial levan. In the first step, levan may be synthesized by bacterial levansucrase using

\* Corresponding author. Tel.: +52 5556227637; fax: +52 5556227671.  
E-mail address: [agustin@ibt.unam.mx](mailto:agustin@ibt.unam.mx) (A. López Munguía).

sucrose as the raw material. In the second step, levan-type FOS may be produced by the partial enzymatic hydrolysis of bacterial levan using endolevanases.

In this context, there are many reports in the literature that describe the synthesis of levans by employing levansucrases obtained from a wide variety of sources. However, few reports regarding the use of endolevanases have been published. An endolevanase (LevB) in a tricistronic operon in *Bacillus subtilis* was described by Pereira et al. [13] and was shown to be inducible upon the addition of sucrose. Furthermore, the modulator effect of the *levB* transcript on the operon expression was also studied [14]. However, none of these reports detailed the properties of the enzyme, particularly with regard to its specificity and its ability to produce levan-type FOS.

We performed a bioinformatic search for sequences encoding enzymes with endolevanase activity and identified a *Bacillus* species containing hypothetical endolevanases. Using this information, we isolated a gene coding for a new endolevanase (LevB1) from a strain of *Bacillus licheniformis* IBt1 from our own collection and expressed it in *E. coli*. The *B. licheniformis* IBt1 strain identity was verified by 16S rDNA sequencing, and the endolevanase (LevB1) properties were determined. It was found that LevB1 hydrolyzes levans via an endo-type mechanism and liberates a low amount of free fructose. In this paper, we describe a method to produce levan-type FOS by partial enzymatic hydrolysis of bacterial levan using the *B. licheniformis* IBt1 endolevanase LevB1.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cloning of the *B. licheniformis* IBt1 endolevanase gene

Genomic DNA was extracted from a *B. licheniformis* IBt1 strain from our own collection using the UltraClean<sup>®</sup> Microbial DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc.). In order to verify the nature of the strain, one microliter of extracted DNA was used as a template for 16 rDNA PCR amplification using the universal primers set fd1 + rd1 [15], as previously described [16]. The *B. licheniformis* IBt1 endolevanase gene was isolated from genomic DNA using the forward primer *levB1 EKmad*-(CAT GCC ATG GAA AAA AAG GGA GAA TCT CCG) and the reverse primer *levB1 fin*-(ACG CTC GAG ATC GCG GAT TGA ACG CAA ATG). Both primers were designed based on a glycoside hydrolase sequence identified by a genomic analysis carried out on the *B. licheniformis* strain ATCC 14580 and reported in the GenBank database (BAL45528.1). An Nco I restriction site was added to the forward primer, *levB1 EKmad*-, and an Xho I restriction site was added to the reverse primer, *levB1 fin*-, for the later fusion of a His-tag in the C-terminal. The amplified product was purified with the High Pure PCR product purification kit (Roche Diagnostics), digested with Nco I and Xho I restriction enzymes (New England Biolabs), and cloned in the pET-22b(+) expression vector using T4 DNA ligase (Fermentas). *E. coli* Rosetta 2 cells were transformed with the ligation product (pET-22b (+) *levB1*) and selected by plating on LB/Ampicillin (100 mg/L) plates.

### 2.2. Protein expression and extraction

To produce the recombinant enzyme, an *E. coli* Rosetta 2 single transformant was inoculated in 50 mL of YT2X medium and incubated at 37 °C with shaking at 250 rpm. When an OD<sub>600</sub> of 0.5 was reached, the culture was induced with 0.4 mM IPTG for 18 h at 18 °C and 90 rpm. Cells were harvested by centrifugation and equilibrated in 15 ml of 50 mM phosphate buffer, pH 6.0. After the sonication and filtration of the cellular debris, a cell extract containing the crude endolevanase activity was obtained.

### 2.3. Protein purification

LevB1 was purified using affinity Ni chromatography with an AKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech) instrument. The enzymatic extract was charged in a HiTrap<sup>™</sup> Chelating HP column previously treated with 100 mM NiSO<sub>4</sub>. To elute the endolevanase, a phosphate buffer flow of 1.0 mL/min and a 0.01 to 0.5 M imidazole gradient was applied for 30 min.

### 2.4. Fructan preparation

Levans were produced or extracted from different sources, and Inulin HP was purchased from Orafti (Belgium). Microbial levan was produced from *B. subtilis* (SacB levan), *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F (LevS levan) and *L. mesenteroides* ATCC 8293 (LevC levan), as previously reported [17,18,19]. Fructan molecular weight was determined by GPC [20]. All microbial levans were present as a high molecular weight normal distribution of polymer molecules, except for SacB levan, which has a bimodal distribution containing a high and a low average molecular weight fraction. When indicated, specific fractions of SacB were used as the substrate in hydrolysis experiments. In particular, a low molecular weight (LMW) SacB levan fraction of 8.3 kDa was obtained by the fractional precipitation of the high molecular weight (HMW) levan fraction of 3500 kDa using a 1.5:1 ethanol:water ratio, centrifugation and further addition of ethanol to reach a 3.5:1 ethanol:water final ratio. The LMW levan fraction has a high solubility, which allows concentrations in the reaction greater than 20 g/L.

### 2.5. Enzymatic reactions

Endolevanase activity assays were performed at 35 °C in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0. All activity assay reactions were carried out in duplicate in solutions containing 10 g/L of fructan, following the initial rate of reducing power release by the dinitrosalicylic method (DNS) [21]. One unit of endolevanase activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μmol of fructose equivalents per minute. Protein concentration was determined using the Bradford Method [22]. To explore endolevanase specificity and its product profile, reactions were performed for 3 h using 50 μL of cell extract as a source of the enzyme and sucrose (Sigma–Aldrich 99%), Inulin HP (Orafti Belgium), 1-kestose (Wako Pure Chemicals industries), 6-kestose (donated by Dr. M. Iiusuka from the Faculty of Human Science of Kobe Shoin Women's University in Osaka, Japan) or microbial levans as substrates at 10 g/L. Reaction product profiles were examined by HPAEC-PAD after a 3 h incubation with 1 U/mL of purified LevB1 and 20 g/L of the assayed levan.

### 2.6. Effect of pH and temperature on LevB1 activity

The effect of pH on activity was evaluated in the 4–8 range in 50 mM acetate (pH 3–5.5), phosphate (pH 5.5–7.5) and Tris–HCl (pH 8–9) buffer at 35 °C using 10 g/L of the LMW SacB levan. The effect of temperature was evaluated in the 20–80 °C range at pH 6.0 using 10 g/L of the LMW SacB levan. Both parameters were studied using 1.0 U/mL of LevB1 endolevanase. The thermal stability of LevB1 was evaluated following the residual activity during incubation at 30° and 35 °C in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0. Samples of 50 μL were withdrawn every 2 h for a 10 h period, with a final sample taken after 24 h of incubation.

### 2.7. LevB1 Kinetic properties

Kinetic properties were evaluated at 35 °C measuring the initial reaction rate of LevB1, for different levan concentration up to a



maximum of 150 g/L for LMW and 30 g/L for HMW SacB levan. All measurements were carried out in duplicate.

### 2.8. Production and analysis of levan-type FOS

Levan-type FOS were produced by the endolevanase hydrolysis of the bi-modally distributed SacB levan at 100 g/L at 35 °C. Reactions were carried out using 1 U/mL of LevB1 for 5 h. The reaction products were analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC) using silica gel Plates 60 (MERCCK) as the stationary phase and an ethanol:butanol:water (15:9:6) v/v mix as the mobile phase. Plates were eluted two times in the mobile phase and stained with  $\alpha$ -naftol and heat. High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) was carried out on a Dionex instrument using a CarboPac PA-200 (2 mm  $\times$  250 mm) column. The column was equilibrated at 30 °C with mM NaOH, with a flow of 0.5 mL/min. Fructans were eluted with a sodium acetate gradient, 5 mM for 5 min, then 5–230 mM from 5 to 100 min.

Glucose, fructose, sucrose (Sigma–Aldrich), 1-kestose, 6-kestose, 1-nystose and f-nystose (Wako Pure Chemicals industries) 6-kestose and neokestose (donated by Dr. M. Iiusuka from the Faculty of Human Science of Kobe Shoin Women's University in Osaka, Japan) were used as standard. The total levan-type FOS concentration was quantified by measuring the fructose content before and after Fructozyme (Novozymes) hydrolysis by HPAEC-PAD. Fructozyme is a commercial preparation containing exo- and endoinulinases capable of transforming levans into fructose, as confirmed by HPAEC-PAD. The main levan-type FOS product was isolated and purified for NMR analysis.

### 2.9. Purification and NMR analysis of the LevB1 product

The most abundant hydrolysis compound was separated by preparative HPLC using a Waters-Millipore chromatograph equipped with an automatic injector (model 717 plus). The HPLC conditions were as follows: Column Spherisorb® S5 ODS2 C18 20 mm  $\times$  250 mm (Waters); eluent H<sub>2</sub>O; flow rate 7.0 mL/min; column temperature 35 °C; RI detector (Waters 410). The NMR spectra were acquired on a Varian Unity NMR Spectrometer operating at 400 MHz for <sup>1</sup>H and 100 MHz for <sup>13</sup>C nuclei. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) and were referenced to H<sub>2</sub>O and performed on the basis of 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C) and 2D (COSY, TOCSY, HSQC and HMBC) spectral analyses as required. The following NMR data were obtained: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  3.98 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3); 3.91 (2H, m, H-4, H-4'); 3.90 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3'); 3.74 (1H, m, H-1'a); 3.70 (1H, ddd, J = 2.8 Hz, J = 7.3 Hz, J = 7.3 Hz, H-5'); 3.68 (1H, ddd, J = 2.8 Hz, J = 7.3 Hz, J = 7.3 Hz, H-5); 3.65 (1H, dd, J = 2.8 Hz, J = 18.0 Hz, H-6a); 3.62 (1H, dd, J = 2.8 Hz, J = 12.4 Hz, H-1a); 3.56 (1H, m, H-1'b); 3.48 (1H, dd, J = 7.8 Hz, J = 12.2 Hz, H-1b); 3.45 (1H, dd, J = 8.8 Hz, J = 16.4 Hz, H-6b); 3.43 (1H, m, H-6'a), 3.37 (1H, m, H-6'b). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 104.87 (C-2'), 101.66 (C-2), 81.05 (C-5), 79.35 (C-5'), 76.75 (C-3), 74.99 (C-3'), 74.65 (C-4), 74.55 (C-4'), 62.39 (C-1', C-6, C-6'), 59.95 (C-1).

### 2.10. Probiotic bacterial strains growth in the presence of levan-type FOS

Six bacterial strains were selected to perform single culture fermentation assays on the potential prebiotics: *Bifidobacterium longum* (ATCC 15707), *B. longum* var. *infantis* (ATCC 17930), *B. longum* var. *infantis* (NRRL 41661), *Bifidobacterium breve* (NRRL 41408), *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 29521) and *Lactobacillus paracasei* (from UAM collection). Each strain was grown from a glycerol stock (stored at –80 °C) in MRS liquid medium containing cysteine–HCl (0.5 g/L) for 12 h. From the MRS culture, a TPY

medium with fructose (0.5%) as the carbon source was inoculated (5%) and incubated for 12 h; this culture was subsequently used as an inoculum in a second TPY with fructose medium, which was cultured until the strain reached the mid-exponential growth phase. At this stage, cells were harvested and used for the final FOS or levan fermentations. FOS fermentations were carried out in liquid cultures of 5% (v/v) cell suspensions in a semisynthetic medium [23]. Filtered sterile solutions (S1) of the levan-type FOS or levan [0.5% (w/v)] were prepared in water. A sterile solution (S2) of Bacto yeast nitrogen base 6.7 g/L and 0.5 g/L of L-cysteine–HCl in water [Difco; 13.4% (w/v)] was prepared. Additionally, a sterile solution (S3) in water was prepared containing a salt solution [40% (w/v); MgSO<sub>4</sub> (0.2 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0.2 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/L), NaHCO<sub>3</sub> (10 g/L), and NaCl (2 g/L)], casein enzymatic hydrolysate [N-Z-Amine A; bovine milk (Sigma; 5% (w/v)), and sodium thioglycolate [Sigma; 0.5% (w/v)]. The three solutions (S1, S2, and S3) were combined (9.1 mL) at a ratio of 17:1:2 (v/v) (pH 6–7), respectively, and 1 mL/L of Tween 80 was added. All cultures and fermentation media were incubated anaerobically at 37 °C and 200 rpm in sealed bottles previously flushed with CO<sub>2</sub>. Samples were withdrawn by a syringe every 2 h over 24 h of growth, and pH measurements were taken. Growth was measured by monitoring the increase of the biomass via optical density and expressed as the calculated area under the growth curves measured at 600 nm (OD<sub>600</sub>). The baseline growth in the Kabel medium without the addition of carbohydrates was used as the blank control, and the growth obtained was subtracted from the growth data obtained in the presence of substrate. The experiments were performed in duplicate for each strain and carbohydrate substrate. Data are given as the mean values  $\pm$  standard error.

## 3. Results and discussion

Several protein sequences exhibiting high identity with the hypothetical endolevanase, LevB1 sequence were identified through a BLAST analysis using a sequence from *B. subtilis* strain 168, the only endolevanase sequence that has been characterized previously [13]. Some of the sequences found, with up to 60% identity, had already been characterized as exo-enzymes, including the *Streptomyces exfoliatus* and *Microbacterium laevaniformans* exolevanbihydrolyses [24,25,26]. Among the additional high identity sequences, we found a hypothetical endolevanase from *B. licheniformis* ATCC 14580 that exhibited 66% identity with the *B. subtilis* 168 enzyme. We selected this enzyme for further experimentation using a *B. licheniformis* IBT1, a similar strain from our culture collection, previously verifying its identity via molecular characterization.

### 3.1. *Bacillus licheniformis* IBT1

Analysis of the 16S rDNA sequence of *B. licheniformis* in the non-redundant NCBI database resulted in a close match with several 16S rDNA sequences deposited into the database that corresponded to *B. licheniformis*. To corroborate this result, a phylogenetic analysis, which included several *Bacillus* species' 16S rDNA sequences retrieved from the GenBank database, was performed. A neighbor-joining tree demonstrated that the 16S rDNA sequence found refers to a cluster in which only the *B. licheniformis* species is included. The sequence was deposited in the GenBank database and registered with the accession number: KJ094598.

### 3.2. Sequence analysis and expression of the *B. licheniformis* IBT1 endolevanase gene

The sequence encoding the putative mature *B. licheniformis* IBT1 endolevanase (LevB1) (nucleotides 87–1545, beginning at the ORF)



**Fig. 1.** Endolevanase sequences alignment from *B. licheniformis* IBt1, *B. licheniformis* SVD1 and *B. licheniformis* ATCC 14580 strains. Conserved motifs found GH32 enzymes are shown inside gray squares, while the differences among sequences are displayed in black.

was amplified from genomic DNA, and the isolated 1458 bp fragment was analyzed by BLASTN. The amplified sequence showed 99% and 94% identity with a putative glycoside hydrolase identified from *B. licheniformis* SVD1 (accession number: BAL45528.1) and the putative endolevanase identified from *B. licheniformis* ATCC 14580 (AN:YP\_080795.1), respectively. Comparing LevB1 and SVD1 sequences it may be observed (Fig. 1) that mismatches are found in the C-terminal sequence: V372A, T470A, L481M and R485H; nevertheless the last three aminoacids are the same in the ATCC 14580 putative endolevanase sequence. We did not observe mismatches close to conserved motifs reported for GH32 enzymes [27]. Plasmid pET-22b(+)*levB1* was subcloned and expressed in *E. coli* Rosetta 2 cultures. Total protein concentration in the enzymatic extracts obtained after cell sonication was 0.5 mg/mL for both enzymes. Enzymatic extracts were analyzed with a Western-blot in which the presence of the 56.4 kDa recombinant enzymes was confirmed using an antibody to the tag that was added to the expression vector at the C- or N-terminus of the protein. The gels and Western-blot are provided as supporting information. The sequence was deposited in the GenBank database and registered with the accession number KJ173778.

### 3.3. Biochemical Characterization of *B. licheniformis* IBt1 endolevanase

LevB1 was from cell extracts as described in materials and methods, and assayed with levan produced by *B. subtilis* levansucrase (SacB). The purified enzyme was obtained at a 51% yield, in the 0.18 M imidazole fraction with a specific activity of 1.8 U/mg. The SDS-PAGE gels are shown as complementary information. The enzyme showed optimal activity at pH = 6.0,  $T = 35^\circ\text{C}$  in initial rate experiments, in reactions with a 1% (w/v) the levan substrate. The enzyme was found to be very stable when stored at  $30^\circ\text{C}$  or  $35^\circ\text{C}$  as no change in activity was observed after 24 h of storage.

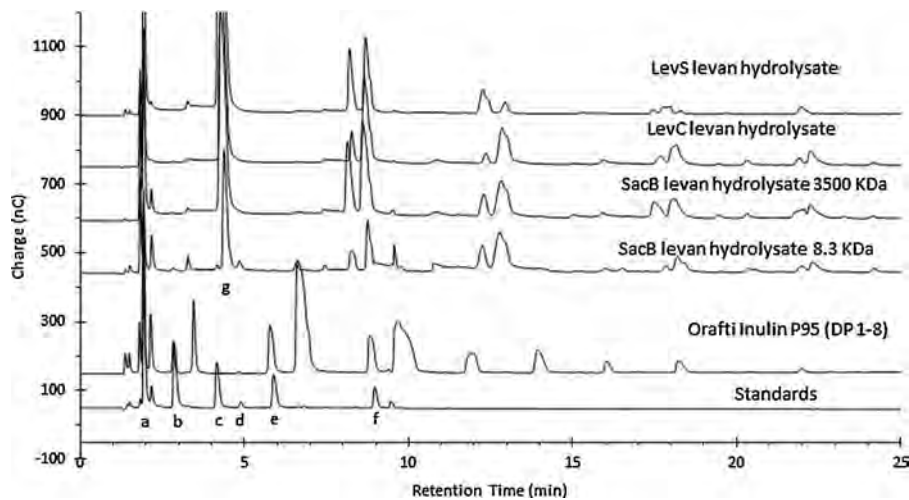
Specificity toward the levan source was explored by a comparative product profile analysis after 16 h of incubation under the same conditions, including enzyme concentration and 20 g/L of levan. It was found that all type of levans were transformed to lower molecular weight products (levan-type FOS and fructose), with no residual high molecular weight polymer detected by TLC after 16 h. The same band profile was observed in all cases. Nevertheless, when analyzing the product profile in detail by HPAEC-PAD, some differences in the intensities of the signals were observed, particularly in products derived from LevS levan hydrolysis. Although no levan-type standards are available (except for 6-kestose), all levan hydrolysis products are found in the same region as the standards (Fig. 2). The major product of levan hydrolysis which elutes

close to 6-kestose was purified by preparative HPLC for subsequent NMR analysis. In terms of specificity toward fructans, we found that LevB1 was not capable to hydrolyze sucrose, 1-kestose, 6-kestose or inulin (HP Orafiti DP 60). Almost no differences in specific activity at 1% (w/v) levan were found when LevB1 was assayed with levans obtained from the levansucrases of *B. subtilis* or *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. However, LevB1 is ten-fold less active (0.15 U/mg) toward levan from *L. mesenteroides* NRRL-B512 levansucrase. We have previously reported that LevS levan, has a complex branched structure as compared to the more linear structures found in other levans [18]. Therefore, the inability to split the  $\beta$ -2-1 linkages at the branching points may explain the differences in LevB1 specific activity. In terms of levan molecular weight, the initial rate is higher for low molecular weight levan (Fig. 3). A first order kinetic behavior was observed for LevB1 initial reaction rates when SacB levan of 8.3 or 3500 kDa were used as a substrate. This kinetic behavior has previously been observed in other enzymes from the GH32 family as only low molar levan concentrations can be prepared from high molecular weight polymer substrates. In this concentration region, the initial rate assay conditions are far from saturation ( $S_0 < K_m$ ), and are typical of first order behaviors as deduced by Michaelis–Menten kinetics (Fig. 3).

### 3.4. Levanbiose:

#### *O*- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 6')- $\beta$ -D-fructofuranoside

The major product of the LevB1 hydrolysis of levans was purified and analyzed to define its structure. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum showed 12 carbon signals (three overlapped), with 2 signals corresponding to quaternary carbons ( $\delta$  104.87 C-2' and  $\delta$  101.66 C-2) and 10 signals in the 58–66 ppm range. Fourteen H resonances in the  $^1\text{H}$  NMR spectra were also observed. All carbon signals, except for the quaternary carbons, were assigned according to the hydrocarbon-related information offered by the HSQC spectrum. The H-3 and H-3' signals of the fructosyl residues were observed at  $\delta$  3.98 and  $\delta$  3.90 and served as the starting point for the analysis of  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and TOCSY experiments. The eight diastereotopic hydrogens ( $-\text{CH}_2-$ ) on the fructosyl residues were useful markers that were clearly identifiable in the  $^1\text{H}$  spectrum and were attached to the up-field carbons ( $\delta$  62.39 and  $\delta$  59.95) in the  $^{13}\text{C}$  spectrum. The remaining resonance fructosyl ring assignments were straightforward. The HMBC correlations clearly exhibited a typical  $\beta$ -2,6-O-glycosidic linkage between the fructose units, which was confirmed by the three-bond correlation of two  $\text{CH}_2$ -O nonequivalent protons: H-6'a at  $\delta$  3.43 and H-6'b at  $\delta$  3.37 to the carbon (C-2) at  $\delta$  101.66 in the HMBC spectrum. From this result, we deduced that the major LevB1 levan hydrolysis product was



**Fig. 2.** Comparative HPAEC-PAD chromatographic hydrolysis profile of products obtained after incubation of levan (LevS and LevC from *Leuconostoc mesenteroides*, and SacB from *B. subtilis*) with LevB1, an endolevanase from *B. licheniformis*, Standards: Orafti inulin P95 DP 1-8, (a) fructose, (b) 1-kestose, (c) 6-kestose, (d) neokestose, (e) nystose and (f) f-nystose. Product (g) was identified as levanbiose.

O- $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 6')- $\beta$ -D-fructofuranoside (levanbiose). Pereira et al. [13] also reported that levanbiose was the major product of LevB obtained from *B. subtilis*, while Miasnikov [28] reported that levantriiose was the major product of the endolevanase from *Bacillus* sp.

### 3.5. Levan-type FOS production

Levan-type FOS were produced by *B. licheniformis* IBt1 endolevanase from 100 g/L of SacB levan in reactions carried out with 1.0 U/ml of LevB1 at pH = 6.0 and 35 °C. The reaction rate was measured following the release of reducing sugars and free fructose, as described in Section 2. Fructose that was incorporated into FOS (f-FOS) was calculated as the difference between total fructose after hydrolysis and the initial amount of free fructose, as described in Section 2. The product profile was followed throughout the reaction to define the amount of time required for maximum levan-type FOS formation with a minimum release of free fructose. The endo-acting reaction of LevB1 can be deduced from the production of intermediate oligofructans (DP > 2) during the time-course hydrolysis of levan (Fig. 4A). After only 30 min of incubation, all of the levan was reduced to lower molecular weight products, as shown in Fig. 4A, whereas after 120 min of incubation, the changes in reducing sugars were negligible, with a minimum rate of free fructose release. This finding is most likely

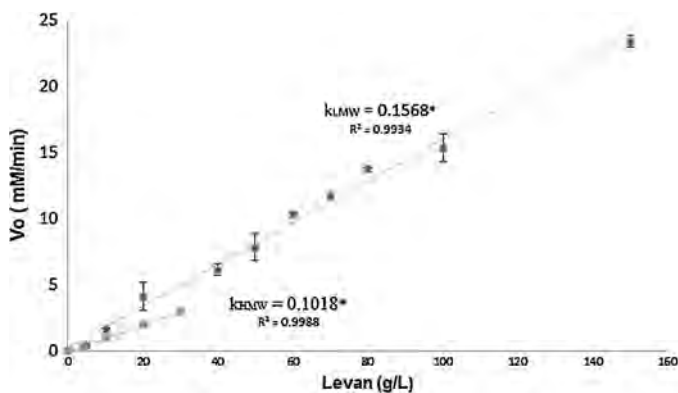
due to a decrease in the specificity of endo-LevB1 toward low molecular weight products as the reaction proceeds (Fig. 4B). After min of incubation, 97% of the total fructose originally present in the fructans was recovered as fructose in FOS (711.4 mM), while only a minor amount of free fructose (21.6 mM) was released. This product profile was similar to those shown in Fig. 2. This is an interesting result considering that most of the isolated levanases reported up to now, exhibit an exohydrolase mechanism resulting in fructose as the direct product, as described in the <http://www.brenda-enzymes.info> internet page for the EC 3.2.1.65 levanase enzymes.

### 3.6. Growth of probiotics in levan-type FOS

Differential growth efficiency was determined for several probiotic strains by comparing the area under the growth curve when levan-type FOS or levan were used as carbon sources. These results are given in Fig. 5, which shows the comparative efficiency of substrate utilization for the selected probiotic strains. *L. paracasei*, *B. longum* var. *infantis* 17930 and *B. longum* exhibited similar growth with both substrates. In contrast, *B. bifidum*, *B. longum* var. *infantis* NRRL 4661 and *B. breve* exhibited higher net growth in the presence of levan-type FOS. Most reports in the literature regarding FOS consumption by probiotic strains are related to FOS produced by the enzymatic hydrolysis of inulin from chicory, in which *Bifidobacteria* generally exhibits efficient growth.

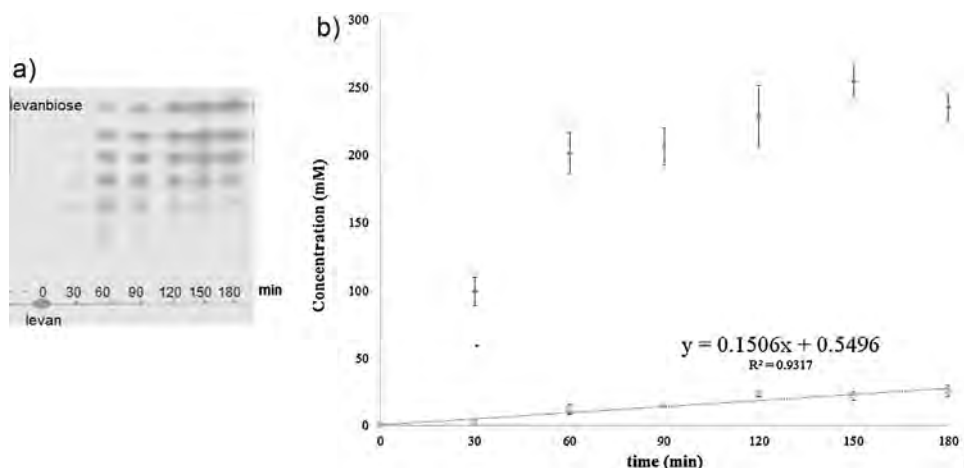
Nevertheless, there are variable and strain-dependent results regarding the preferential use of inulin against inulin-type FOS from chicory by *Bifidobacteria*. Most *Bifidobacteria* hardly ferment inulin and require extracellular endoinulinases from other microorganisms to obtain fructose and inulin-type FOS as carbon source (feed-crossing) [29]. In this particular case, *B. bifidum*, *B. longum* var. *infantis* NRRL 4661 and *B. breve* strains which grow better in levan type FOS probably lack the machinery for levan uptake.

In all cases, the strains lowered the pH (data not shown) in fermentation reactions containing levan as the sole carbon source. These results suggest that the probiotic strains can efficiently transport and metabolize  $\beta$ 2-6 FOS derived from levan hydrolysis, in some cases faster than the direct consumption of  $\beta$ 2-6 FOS added as carbon source. One hypothesis to explain these results could be a more specific  $\beta$ 2-6 FOS profile for growth obtained from the endogenous endolevanase activity; or just a rapid availability of fructose from exolevanase induction. Until now, endolevanase



**Fig. 3.** Kinetic behavior of LevB1, an endolevanase from *B. licheniformis*, with 8.3 kDa SacB levan (dark rhombus) and 3500 kDa SacB levan (gray squares) as substrates. (\*) Units from kinetic constants mmol of reducing sugars/g levan  $\times$  min.

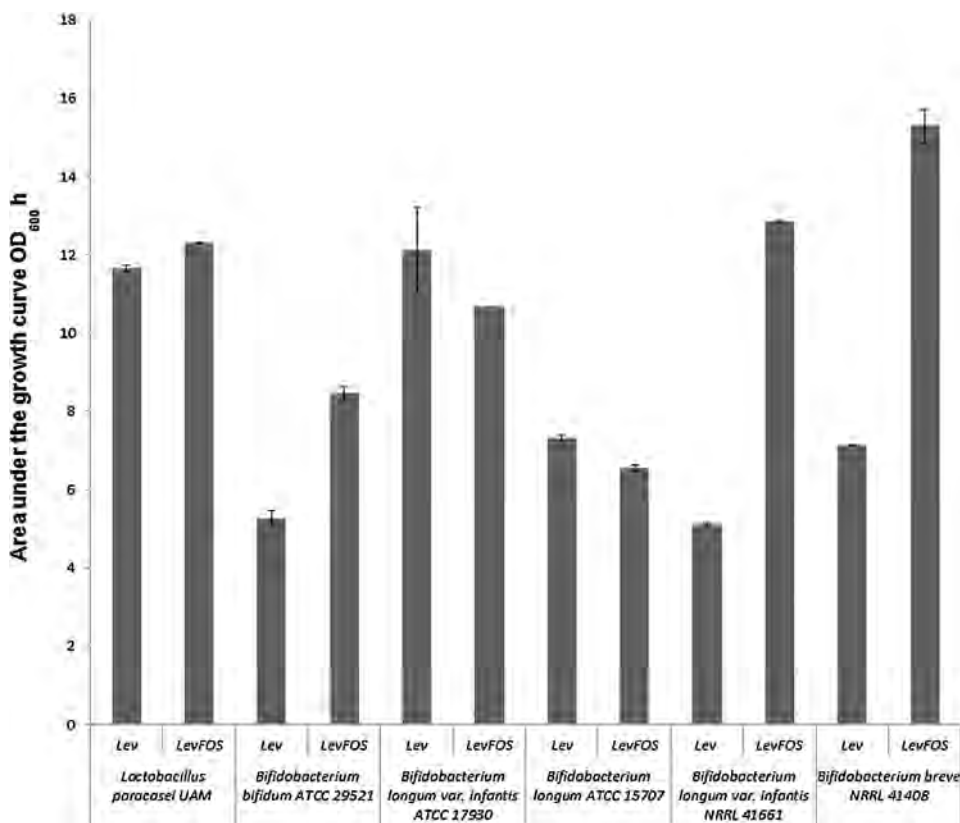




**Fig. 4.** Evolution of a SacB levan hydrolysis during an endolevanase LevB1 catalyzed reaction. (A) Thin layer chromatography of samples taken throughout the reaction. (B) Evolution of free fructose and reducing sugars released during the reaction. The reaction was carried out using 1 U/mL of LevB1 at 100 g/L of bimodal SacB levan. Reducing sugars (dark rhombus) and fructose (gray squares).

reports in the NCBI protein database regarding the probiotic strains used in our study or related strains are scarce. Nevertheless,  $\beta$ -fructofuranosidase, described as a levanase/invertase has been already described in *B. bifidum* LMG 13195 and *B. longum* NCC2705 [30]. The *B. longum* var. *infantis* ATCC 15697 is the same strain as the *B. longum* var. *infantis* NRRL 41661 used in the present study. Martel et al. [31] overexpressed a  $\beta$ -fructofuranosidase as a truncated cytosolic protein in *E. coli*. This enzyme exhibited its highest affinity for bacterial levan, followed by nystose, chicory inulin, 1-kestose and sucrose. Approximately 16 proteins belonging to the glycosyl hydrolase family have been reported in *B. longum* genome

[32]. It should also be considered that levan-type FOS have the advantage of a higher water solubility than levan. Specific growth rates ( $\mu$  h<sup>-1</sup>), calculated as the slope of the log (OD) vs. time, curve describing the culture are reported in Table 1. In general, the actual  $\mu$  value ranged from 0.14 to 0.29 h<sup>-1</sup> when levan was used as a substrate, while the range was wider, from 0.099 to 0.35 h<sup>-1</sup>, for *B. longum* var. *infantis* NRRL 41661 grown in the presence of levan-type FOS, with the latter substrate exhibiting the highest specific growth rate value reported in this experiments. By providing prebiotic supplementation to the host, such as levan or levan-type FOS, some strains could arguably grow faster in levan than others, which



**Fig. 5.** Prebiotic bacterial strains growth with levan and levan-type FOS used as carbon sources (0.5%, w/v for all growth assays). Data are expressed as the calculated area under the growth curve (OD600 nm h) and are presented as the average values of two growth experiments (bars indicate the SD).



**Table 1**

Specific growth rate ( $\mu \cdot h^{-1}$ ) of different strains using levan or levan-type FOS as the only carbon source (Data in parenthesis: range of the exponential growth phase in hours).

| STRAIN  | LEVAN                                  | Levan-type FOS                        |
|---|--|---------------------------------------|
| <i>Lactobacillus paracasei</i>                                | 0.181 <sub>(4–14)</sub> $\pm$ 0.002    | 0.155 <sub>(4–16)</sub> $\pm$ 0.004   |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i>                                | 0.296 <sub>(2–8)</sub> $\pm$ 0.025     | 0.1342 <sub>(4–16)</sub> $\pm$ 0.0005 |
| <i>Bifidobacterium longum</i> var. <i>infantis</i> ATCC 17930 | 0.179 <sub>(4–13)</sub> $\pm$ 0.01     | 0.206 <sub>(4–13)</sub> $\pm$ 0.0003  |
| <i>Bifidobacterium longum</i>                                 | 0.29 <sub>(2–10)</sub> $\pm$ 0.22      | 0.161 <sub>(10–20)</sub> $\pm$ 0.001  |
| <i>Bifidobacterium longum</i> var. <i>infantis</i> NRRL 41661 | 0.1495 <sub>(12–22)</sub> $\pm$ 0.001  | 0.357 <sub>(6–14)</sub> $\pm$ 0.012   |
| <i>Bifidobacterium breve</i>                                  | 0.1165 <sub>(3–20)</sub> $\pm$ 0.00084 | 0.10 <sub>(6–16)</sub> $\pm$ 0.006    |

would grow better in levan-type FOS. Thus, the fastest growing microorganism would be able to colonize or preferentially maintain a colony in the host environment. Therefore, the advantage is not solely the ability to consume the prebiotic but rather to consume it faster. Further studies to investigate the presence of functional extracellular levanases either exo or endo-type are needed.

#### 4. Conclusions

The gene encoding the endolevanase LevB1 from *B. licheniformis* IBt1 was isolated, cloned and expressed as a heterologous protein in *Escherichia coli* Rosetta 2 cells. Endolevanase LevB1 was an adequate enzyme for the production of levan-type FOS, which occurred through an endo-type reaction mechanism and resulted in a higher ratio of reducing sugar to free fructose compared to the other alternatives available. The purified enzyme was characterized in terms of its kinetic properties and optimal reaction conditions. When the enzyme was applied to levan, which was obtained from different sources, the reaction resulted in yields of as high as 97% FOS, with a degree of polymerization between 2 and 8. Extensive hydrolysis resulted in the formation of a disaccharide as the major product that was identified as levanbiose. Finally, the ability of several probiotic strains isolated from the intestinal microbiota to generate levan-type FOS as a carbon source was demonstrated. The six prebiotic strains studied utilized levan and levan-type FOS as carbon source for growth, although with a variable preference, as *B. breve* NRRL 41408 and *B. longum* var. *infantis* NRRL 41661 strains exhibited higher growth rates in the presence of levan-type FOS.

#### Acknowledgments

We acknowledge Dr. Enrique Merino from the Instituto de Biotecnología UNAM who kindly provided the *B. licheniformis* strain IBt1 used in this work and Eugenio López, Santiago Becerra, Paul Gaytán, and Jorge Yáñez for the primer synthesis and sequence analyses. We also thank Fernando Gonzalez for technical support. Finally, we thank DGAPA-UNAM (PAPIIT No. IN212311-3); CONACYT (Proinnova 198044) and the UJAT project UJAT-2012-IB-39 for financial support.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.procbio.2014.02.005.

#### References

- Gibson G, Roberfroid B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 1995;(125):1401–12.
- Franck A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 2002;(87):287–91.
- Kolida S, Gibson G. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *Journal of Nutrition* 2007;(137):2503–6.
- Roberfroid M. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *Journal of Nutrition* 2007;(137):2493–502.
- Kang S, Hong K, Jang K, Kim S, Lee K, Chang B, Kim C, Choue R. Anti-obesity and hypolipidemic effects of dietary levan in high fat diet-induced obese rats. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2004;(14):796–804.
- Dina R, Pal A, Bhatena Z, Sahu N, Jha A, Mukherjee S. Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish Shellfish Immunology* 2007;(22):477–86.
- Bezzate S, Aymerich S, Chambert R, Czarnes S, Berge O, Heulin T. Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere. *Environmental Microbiology* 2000;(3):333–42.
- Kim K, Chung C, Kim Y, Kim K, Han C, Kim C. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Cosmetic Science* 2005;(56):395–406.
- Yoon E, Yoo S, Cha J, Lee H. Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *International Journal of Food Microbiology* 2004;(34):191–4.
- Dahech I, Belghith K, Hamden K, Feki A, Belghith H, Mejdoub H. Oral administration of levan polysaccharide reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. *International Journal of Biological Macromolecules* 2011;(5):942–7.
- Dahech I, Belghith K, Hamden K, Feki A, Belghith H, Mejdoub H. Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. *International Journal of Biological Macromolecules* 2011;(4):742–6.
- Marx S, Winkler S, Hartmeier W. Metabolization of beta-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 2000;(182):163–9.
- Pereira Y, Petit-Glatron M, Chambert R. yveB, encoding endolevanase LevB, is part of the sacB-yveB-yveA levansucrase tricistronic operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 2001;(12):3413–9.
- Daguer J, Geissmann T, Petit-Glatron M, Chambert R. Autogenous modulation of the *Bacillus subtilis* sacB-levB-yveA levansucrase operon by the levB transcript. *Microbiology* 2004;(11):3669–79.
- Weisburg W, Barns S, Pelletier D, Lane D. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 1991;(173):697–703.
- Escalante A, Wacher C, Farrés A. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology* 2001;(64):21–31.
- Ortiz-Soto M, Rivera M, Rudiño-Piñera E, Olvera C, López-Munguía A. Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering, Design & Selection* 2008;(10):589–95.
- Morales-Arrieta S, Rodríguez M, Segovia L, López-Munguía A, Olvera-Carranza C. Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene* 2006;(376):59–67.
- Olvera C, Centeno-Leija S, López-Munguía A. Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie van Leeuwenhoek* 2007;(92):11–20.
- Muñoz-Gutiérrez I, Rodríguez-Alegria M, López Munguía A. Kinetic behaviour and specificity of  $\beta$ -fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans. *Process Biochemistry* 2009;(8):891–8.
- Miller L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959;(3):426–8.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;(72):248–54.
- Kabel M, Kortenoeven L, Schols HA, Voragen AGJ. In vitro fermentability of differently substituted xylo-oligosaccharides. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 2002;(50):6205–10.
- Saito K, Kondo K, Kojima I. Purification and characterization of 2,6- $\beta$ -D-fructan-6-levanbiohydrolase from *Streptomyces exfoliatus* F3-2. *Applied and Environmental Microbiology* 2000:252–6.
- Saito K, Oda Y, Tomita F, Yokota. A molecular cloning of the gene for 2,6-beta-D-fructan 6-levanbiohydrolase from *Streptomyces exfoliatus* F3-2. *FEMS Microbiology Letters* 2003;(28):265–70.
- Song E, Hyunjin K, Sung H, Jaeho C. Cloning and characterization of a levanbiohydrolase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953. *Gene* 2002;(291):45–55.
- Lammens W, Le Roy K, Schroeven L, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Journal of Experimental Botany* 2009;(60):727–40.
- Miasnikov A. Characterization of a novel endo-levanase and its gene from *Bacillus* sp L7. *FEMS Microbiology Letters* 1997;(154):23–8.
- Van Den Broek L, Voragen. *Bifidobacterium* glycoside hydrolases and (potential) prebiotics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2008;(9):401–7.
- Schell M, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Arigoni F. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(22):14422–514.

- [31] Martel C, Warrilow A, Jackson C, Mullins J, Togawa R, Parker J, Morris M, Donnison I, Kelly D, Kelly S. Expression, purification and use of the soluble domain of *Lactobacillus paracasei* B-fructosidase to optimize production of bioethanol from grass fructans. *Bioresource Technology* 2010;(101): 4395–402.
- [32] Sela D, Chapman J, Adeuya A. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;(48):18964–9.



## Research paper

# Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrase-endolevanase fusion enzyme (LevB<sub>1</sub>SacB)



Jaime R. Porras-Domínguez<sup>a</sup>, María Elena Rodríguez-Alegría<sup>a</sup>, Ángela Ávila-Fernández<sup>b</sup>,  
Silvia Montiel-Salgado<sup>a</sup>, Agustín López-Munguía<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>b</sup> Centro de Investigación, DACS-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Av. Gregorio Méndez no. 2838-A, Col. Tamulte, CP 86150, Villahermosa, Centro, Tabasco, Mexico

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Levan  
Fructooligosaccharides  
Endolevanase  
Levansucrase  
Fusion enzyme

## ABSTRACT

We describe here the enzymatic production of levan type-fructooligosaccharides (L-FOS) with a DP from 2 to 10, through simultaneous synthesis and hydrolysis reactions. This was accomplished by LevB<sub>1</sub>SacB, a new enzyme resulting from the fusion of SacB, a levansucrase from *Bacillus subtilis* and LevB<sub>1</sub>, an endolevanase from *B. licheniformis*. In the fusion enzyme, SacB retains its catalytic behavior with a decrease in *k*<sub>cat</sub> from 164 to 108 s<sup>-1</sup>. LevB<sub>1</sub> in LevB<sub>1</sub>SacB kinetic behavior improves considerably reaching saturation with levan and following Michaelis-Menten kinetics, quite differently from the previously reported first order kinetic behavior. We also report that LevB<sub>1</sub>SacB or both enzymes (LevB<sub>1</sub> & SacB) at equimolar concentrations in simultaneous reactions result in an optimal, wide and diverse L-FOS profile, including 6-kestose, levanbiose and blastose among other L-FOS and 1-kestose, which accumulates as by-product of SacB levan synthesis. Yields of around 40% (w/w) were obtained from 600 g/l sucrose with either LevB<sub>1</sub>SacB or LevB<sub>1</sub> & SacB. The reaction was successfully scaled up to a stirred 2 l bioreactor.

## 1. Introduction

Inulin-type fructooligosaccharides (I-FOS) bearing β2-1 linkages have been recognized as one of the most powerful nutraceuticals (prebiotics) due to their beneficial health effects in various physiological functions of the human gut microbiota (Kolida, Tuohy, & Gibson, 2007). Although a certain amount of FOS occurs naturally in fruits and vegetables, they are commercially produced by enzymatic hydrolysis of inulin from *Chicorium intybus* or by enzymatic synthesis from sucrose by fungal fructosyltransferases (Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2005).

In recent years, it has been shown that structurally different fructooligosaccharides may also behave as prebiotics. This is the case of agave fructans which contain highly branched inulin and neofructans (graminans ramified in the glucose C6) (Gomez, Tuohy, Gibson, Klinder, & Costabile, 2010; Kilian, Kritzinger, Rycroft, Gibson, & Preez, 2002; Ravenscroft et al., 2009). It is also the case of levan-type FOS (L-FOS), which bear mainly β2-6 linkages among fructose molecules, and have been used selectively as carbon and energy sources for growth of beneficial intestinal microbiota (Marx, Winkler, & Hartmeier, 2000; Porras-Domínguez et al., 2014).

Reaction yield, low monosaccharides content and low degree of

polymerization (DP between 2 and 10) are three important considerations in the design of an oligosaccharide production process either from transglycosylation with sucrose as substrate, or by fructan hydrolysis. In this context, L-FOS have been produced using different approaches, in particular, by direct levansucrases synthesis, using enzymes such as levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* (Li, Seo, & Karboune, 2015), *B. megatherium* (Homann, Biedendieck, Götze, Jahn, & Seibel, 2007), and *B. subtilis* C4 (Recherches & Ranguel, 1997). Other levansucrases from gram negative bacteria such as those from *Guconacetobacter diazotrophicus*, *Zymomonas mobilis* and *Pseudomonas syringae* pv tomato, have also been successfully used for L-FOS production (Visnapuu et al., 2011). In these cases, reaction specificity has been modulated defining reaction conditions –sucrose concentration and temperature mainly- to favor L-FOS synthesis: however, in all cases the presence of high polymerization degree levan seems unavoidable. A rational approach has also been considered, modifying levansucrase specificity through site directed mutagenesis, in order to avoid levan. For instance, Ortiz-Soto, Rivera, Rudiño-Piñera, Olvera, and López-Munguía (2008), reported SacB mutants with a high L-FOS specificity. However, most of the SacB mutants with interesting product profiles became highly hydrolytic. A third alternative consists in a two-step

\* Corresponding author.

E-mail address: [agustin@ibt.unam.mx](mailto:agustin@ibt.unam.mx) (A. López-Munguía).

process where the enzymatic synthesis of levan is followed by a controlled hydrolysis yielding L-FOS: Tian, Karboune, and Hill (2014) described such a bi-enzymatic system consisting of levan synthesis from sucrose with levansucrase from *B. amyloliquefaciens* followed by partial hydrolysis by means of an endoinulinase from *Aspergillus niger*. In this process, the low specificity of endoinulinase on levan as substrate results in low L-FOS yields. Actually, the amount of short fructan chains observed after the reaction was the consequence of direct levansucrase synthesis at high sucrose concentration, rather than endoinulinase activity on levan, reaching yields of 15% w/w at 0.6 M of sucrose. In conclusion, none of these strategies has resulted in a feasible process for L-FOS synthesis.

SacB, the levansucrase from *B. subtilis*, has been intensively studied since last century; nevertheless, there are still some unsolved questions related with its specificity, particularly the structural features influencing levan molecular weight. Actually, we have recently demonstrated that high or low molecular weight levan may be obtained through a rational selection of enzyme activity in the reaction medium. In effect, while a high molecular weight levan distribution is obtained at low enzyme concentrations (0.01  $\mu\text{M}$ ) a shift in reaction mechanism is obtained at concentrations higher than 1.0  $\mu\text{M}$ , where a low molecular weight levan distribution is obtained (Porras-Domínguez, Ávila-Fernández, Miranda-Molina, Rodríguez-Alegria, & Munguía, 2015). In this context, we have recently described a two-step process for L-FOS synthesis. The first step consists of low molecular weight levan synthesis from sucrose using the recombinant SacB levansucrase from *B. subtilis*, which after a purification step, is hydrolyzed by LevB<sub>1</sub>, a recombinant endolevanase from *B. licheniformis*, with high endo-specificity for  $\beta$ -2-6 bonds in levan but unable to hydrolyze sucrose, 1-kestose or 6-kestose. After hydrolysis, the yield of levan free L-FOS is around 97% containing only 5% of free fructose. Furthermore, LevB<sub>1</sub> produces the disaccharide levanbiose as the main long-term activity product (Porras-Domínguez et al., 2014).

Analogous synthesis/hydrolysis bi-enzymatic systems have been reported for the production of isomalto-oligosaccharides combining dextran synthesis from sucrose with dextransucrase, followed by endodextranase hydrolysis (Goulas, Cooper, Grandison, & Rastall, 2004; Goulas, Fisher, Grimble, Grandison, & Rastall, 2004). In their report, several activity ratios were explored to modulate the yield and polymerization degree of the final products. An optimal isomalto-oligosaccharides yield was obtained when a 1:10 dextransucrase: endodextranase ratio was used, with di and tri saccharides as the main products. However, in terms of prebiotic properties the products obtained with the 1:1 and 1:2 dextransucrase:endodextranase ratios were more efficient. In addition, Kim, Seo, Kang, Atsuo, and Kim (2009), constructed an enzyme, fusing a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* with a dextranase from *Arthrobacter oxidans* with a two amino-acid linker. This new fusion enzyme was more efficient for the synthesis of isomalto-oligosaccharides from sucrose than the bi-enzymatic system, considering the higher performance of endodextranase in the fused enzyme.

In this work, we first explored L-FOS synthesis through a *simultaneous* levansucrase/endolevanase reaction with sucrose as substrate under different enzyme concentration and enzyme concentration ratios, followed by the design of a gene coding for a single biocatalyst in which a six aminoacid linker joins the C-terminal end of the endolevanase LevB<sub>1</sub> with the N-terminal end of the levansucrase SacB. The enzymatic behavior of the fusion enzyme was compared to the individual enzymes behavior and the levan-type L-FOS production scaled up to 2-l.

## 2. Material and methods

### 2.1 levansucrase SacB expression and purification

Recombinant *B. subtilis* 168 levansucrase (SacB) was obtained as previously described (Ortiz-Soto, Rudiño-Piñera, Rodríguez-

Alegria, & Munguía, 2009). *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformants were grown in Luria-Bertani broth containing 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of ampicillin at 37 °C. The culture was induced during 8 h at 18 °C by addition of 0.2 mM IPTG when the optical density (OD<sub>600</sub>) reached 0.5. Cells recovered by centrifugation were suspended in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) and disrupted with a French Press (Thermo Spectronic). The enzyme was purified by ion exchange chromatography (AKTA prime; Amersham Pharmacia Biotech). The enzymatic extract was charged in a CM Sepharose resin (Pharmacia) previously equilibrated at pH 6.0 with 100 mM phosphate buffer and eluted in a 100–1000 mM phosphate buffer (pH 6.0) gradient. Fractions containing the enzyme were pooled and dialyzed against 50 mM sodium acetate buffer, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.0

### 2.2. Endolevanase LevB<sub>1</sub> expression and purification

Recombinant endolevanase LevB<sub>1</sub> was obtained as previously reported (Porras-Domínguez et al., 2014). An *E. coli* Rosetta 2 single transform was inoculated in 50 ml of YT2X medium containing ampicillin (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and incubated at 37 °C and 250 rpm. When an OD<sub>600</sub> of 0.5 was reached, the culture was induced with IPTG 0.4 mM during 18 h at 18 °C and 90 rpm. Cells were harvested by centrifugation and washed with 15 ml of 50 mM, phosphate buffer (pH 6.0). After sonication in 130 W Ultrasonic Processor Model CV18 four cycles of 10 s ON/30 s OFF at 70% amplitude, cell debris were separated by centrifugation (20,000 x g for 20 min at 4 °C) to recover the enzyme. Endolevanase in the supernatant was purified using affinity Ni chromatography in an AKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech) equipment. The enzymatic extract was charged in a HiTrap™ Chelating HP 1 ml column previously treated with 100 mM NiSO<sub>4</sub> and equilibrated with phosphate buffer 50 mM pH 6.0 and 300 mM NaCl. To elute the endolevanase, a 10–500 mM imidazol gradient was applied in 30 min with a flow of 1.0 ml/min. LevB<sub>1</sub> was recovered at 180 mM imidazole. Finally, the eluted enzyme was dialyzed against 50 mM sodium acetate buffer, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and pH 6.0.

### 2.3. Cloning and expression of LevB<sub>1</sub>SacB, the fusion protein gene

The corresponding C-terminal end of LevB<sub>1</sub> nucleotide sequence was joined with SacB N-terminal end through a linker sequence designed as GGSGGS. Glycins and serins are common in flexible linkers, in this particular case, with the minimum recommended linker length ([http://parts.igem.org/Protein\\_domains/Linker](http://parts.igem.org/Protein_domains/Linker)). The gene was synthesized by GenScript USA Inc. and cloned in a pET-22b (+) vector (Novagen) between the restriction sites NdeI and XhoI (supplementary material 1). *E. coli* Rosetta 2 single transformant was inoculated in 50 ml of YT2X medium, containing ampicillin 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and incubated at 37 °C at 250 rpm. When an OD<sub>600</sub> of 0.5 was reached, the culture was induced with IPTG 0.4 mM during 18 h at 18 °C, reducing agitation to 90 rpm. Afterwards, cells were harvested by centrifugation and washed with 15 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 6.0). Cells were disrupted by sonication (four cycles of 10 s ON/30 s OFF at 70% amplitude) in 15 ml of the same buffer. Protein extract was recovered by centrifugation (20,000g for 20 min at 4 °C) and the fusion enzyme (LevB<sub>1</sub>SacB) purified by affinity Ni chromatography (AKTA prime; Amersham Pharmacia Biotech) as already described. The SDS-PAGE gel of the purified protein is shown in the supplementary material. The designed fusion enzyme LevB<sub>1</sub>SacB has a molecular weight of 107 kDa.

### 2.4. Standard activity assay

Levansucrase activity was assayed in 600  $\mu\text{l}$  reactions at 37 °C in 50 mM acetate buffer (pH 6.0) containing 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 100 g/l sucrose as substrate. A global measurement of the initial reaction rate was determined by following the reducing sugar released by the DNS method (Miller, 1959); The transferase and hydrolytic activities were



also determined, from direct measurement of glucose and fructose release in an HPLC system (see later). One unit of overall levansucrase activity was defined as the amount of enzyme releasing 1  $\mu\text{mol}$  of reducing sugars per minute. Endolevanase activity assays were performed at 37 °C in 600  $\mu\text{l}$  reactions in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0), with 10 g/l of 3.3 kDa and 7.6 kDa levan as substrate and following the initial rate of reducing sugars release by the DNS method. The 3.3 kDa levan was kindly provided by Enrique Raga. One unit of endolevanase activity was defined as the amount of enzyme releasing 1  $\mu\text{mol}$  of fructose equivalents per minute. For assays with the fusion enzyme, the same procedure was followed to measure the individual levansucrase and endolevanase initial rate activities. All activity assays were carried out by duplicates.

### 2.5. Kinetic studies

Kinetic studies were carried out in 1 ml assay reactions containing either 0.1  $\mu\text{M}$  or 1.0  $\mu\text{M}$  of levansucrase (SacB), equivalent to 1 and 10 U/ml respectively. The reactions were performed at 35 °C in 50 mM acetate buffer at pH 6.0,  $\text{CaCl}_2$  1 mM containing with 600 g/l of sucrose. This is a compromise temperature considering that the final goal is to have both enzyme activities acting simultaneously in the reaction and fused in a single protein. To evaluate the combined effect of both enzymes, several endolevanase doses were assayed for each SacB concentration. Protein concentration was determined by the Bradford method. Additional reactions with a minimum amount of levansucrase SacB (0.01  $\mu\text{M}$  equivalent to 0.1 U/ml) were carried out under the same reaction conditions, exploring different endolevanase concentrations. In this last case, sucrose was reduced to 200 g/l considering the very long reaction times required to consume the substrate completely when low concentrations of enzyme are selected. As recently reported, the synthesis of low molecular weight levan is favored when high SacB concentrations are used in the reaction (10 U/ml), while low enzyme concentrations (0.1 U/ml) result in high molecular weight levan distribution synthesis (Porras-Domínguez et al., 2015). All reactions were carried out in duplicates.

In reactions with the fusion enzyme LevB<sub>1</sub>SacB, enzyme concentration was adjusted to 10 U/ml of levansucrase activity. Reaction conditions were 600 g/l of sucrose in 50 mM acetate buffer, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH 6.0) in a 1 ml volume assay also at 35 °C. The effect of temperature on LevB<sub>1</sub>SacB activity and stability was the subject of a detailed analysis.

### 2.6. Chromatographic analysis

High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) was carried out on a Dionex instrument using a CarboPac PA-200 (2 × 250 mm) column. The column was equilibrated at 30 °C with 100 mM NaOH, with a flow of 0.5 ml/min. Fructans and FOS were eluted with sodium acetate ionic strength program as follows: 5 mM for 5 min, followed by a 5–230 mM linear gradient in 95 min. Glucose, fructose, sucrose (Sigma Aldrich), 1-kestose, 1-nystose and 1-fructofuranosyl-nystose (Wako Pure Chemicals industries) 6-kestose and neokestose (kindly donated by Professor M. Iiusuka from the Faculty of Human Science of Kobe Shoin Women's University in Osaka, Japan) were used as standards. Blastose and levanbiose were synthesized as recently reported (Miranda-Molina, Castillo, & Lopez Munguia, 2017; Porras-Domínguez et al., 2014) and purified by preparative HPLC using a Waters-Millipore chromatograph (Model 1525) equipped with an automatic injector (Model 717 plus), a RI detector (Waters 2414) and a 20 × 250 mm column (Spherisorb<sup>®</sup> S5 ODS2 C18 from Waters). Water was used as eluent at 7.0 ml/min flow rate and 35 °C.

In order to measure sucrose, fructose, and glucose concentration, samples were centrifuged and analyzed in a HPLC system (Waters 510) equipped with a Prevail 4.6 × 250 mm Carbohydrate ES column (Part.

No. 35101 Alltech) and a refraction index detector (Shodex). Separations were carried out from 10  $\mu\text{l}$  samples with an appropriate dilution at 30 °C and using a 75:25 acetonitrile: water eluent at a flow rate of 1.0 ml/min. All measurements were performed by duplicate.

Total L-FOS concentration was quantified by measurement of the fructose content before and after hydrolysis with Fructozyme (Novozymes), a commercial preparation containing exo- and endoinulinases capable to transform all levans to fructose, as confirmed by HPAEC-PAD.

### 2.7. Scaling of L-FOS production in a 2 l reactor

The L-FOS synthesis reactions with LevB<sub>1</sub>SacB were carried out in a of 2 l stirred reactor (Setric Genie Industrie) of 20 cm high and 12 cm of total diameter, equipped with a 6-blade Rushton propeller.

## 3. Results and discussion

### 3.1 L-FOS synthesis by simultaneous levansucrase & endolevanase reactions

#### 3.1.1. Effect of levansucrase & endolevanase concentration ratio

In order to define adequate reaction conditions for the synthesis of L-FOS through the simultaneous synthesis and hydrolysis of levan, the effect of the levansucrase (SacB) and endolevanase (LevB<sub>1</sub>) concentration ratio on product profile was first studied. For this purpose, two SacB concentrations were defined (0.1  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$ ) corresponding to conditions previously defined for low molecular weight levan synthesis (Porras-Domínguez et al., 2015). For each levansucrase concentration, up to four reactions combining different SacB:LevB<sub>1</sub> ratios were performed, starting from an equimolar ratio (SacB:LevB<sub>1</sub> 1:1) and up to an endolevanase excess (SacB:LevB<sub>1</sub> 1:100 or 1:20, for the 0.1  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$  SacB concentration, respectively). In each case, sucrose consumption as well as fructose and glucose release were analyzed until 90% conversion was reached, as described in Fig. 1. As expected, in all cases the sucrose consumption rate is a function of SacB concentration without any negative effect derived from the presence of endolevanase or its products (Fig. 1A and B). The presence of endolevanase neither affect the glucose release rate, as shown in Fig. 1C and D. As glucose results either from sucrose hydrolysis or sucrose consumed as fructosyl donor, SacB hydrolysis/transferase ratio is dependent on sucrose concentration, as already demonstrated (Porras-Domínguez et al., 2015). In contrast, major changes were observed in the fructose release rate, with the largest amount of fructose obtained in reactions with an endolevanase excess (Fig. 1E and F). As already described (Porras-Domínguez et al., 2014), endolevanase behaves as an exo-type enzyme when acting on L-FOS.

These results are also consistent with the report by Goulas, Fisher et al. (2004) who, in a bi-enzymatic dextranase/dextranase system, found increasing monosaccharide concentrations with increasing dextranase activity. An important observation derived from these experiments is that fructose released from reactions carried out with an equimolar SacB/LevB<sub>1</sub> concentration ratio is not significantly higher when compared to the single SacB reactions. Actually, among all conditions tested, the minimum amount of fructose released during the reaction was found at equimolar enzyme concentration ratios. In particular, reactions carried out using 1  $\mu\text{M}$  of both enzymes, produce the highest yields of L-FOS (37.5%) with a maximum degree of polymerization of 8. Additionally, under these reaction conditions, no levan was detected (Table 1).

In contrast, in all bi-enzymatic reactions with 0.1  $\mu\text{M}$  SacB concentration, high Mw levan is present. A SacB/LevB<sub>1</sub> ratio of 1:1 at 1  $\mu\text{M}$  concentration is therefore the best option for L-FOS synthesis, limiting the reaction to the time required to reach 90% sucrose conversion to avoid further hydrolysis. Additional advantages of these reaction conditions are the low sucrose lost by hydrolysis, the low fructose release from L-FOS by endolevanase, as well as the product distribution profile,

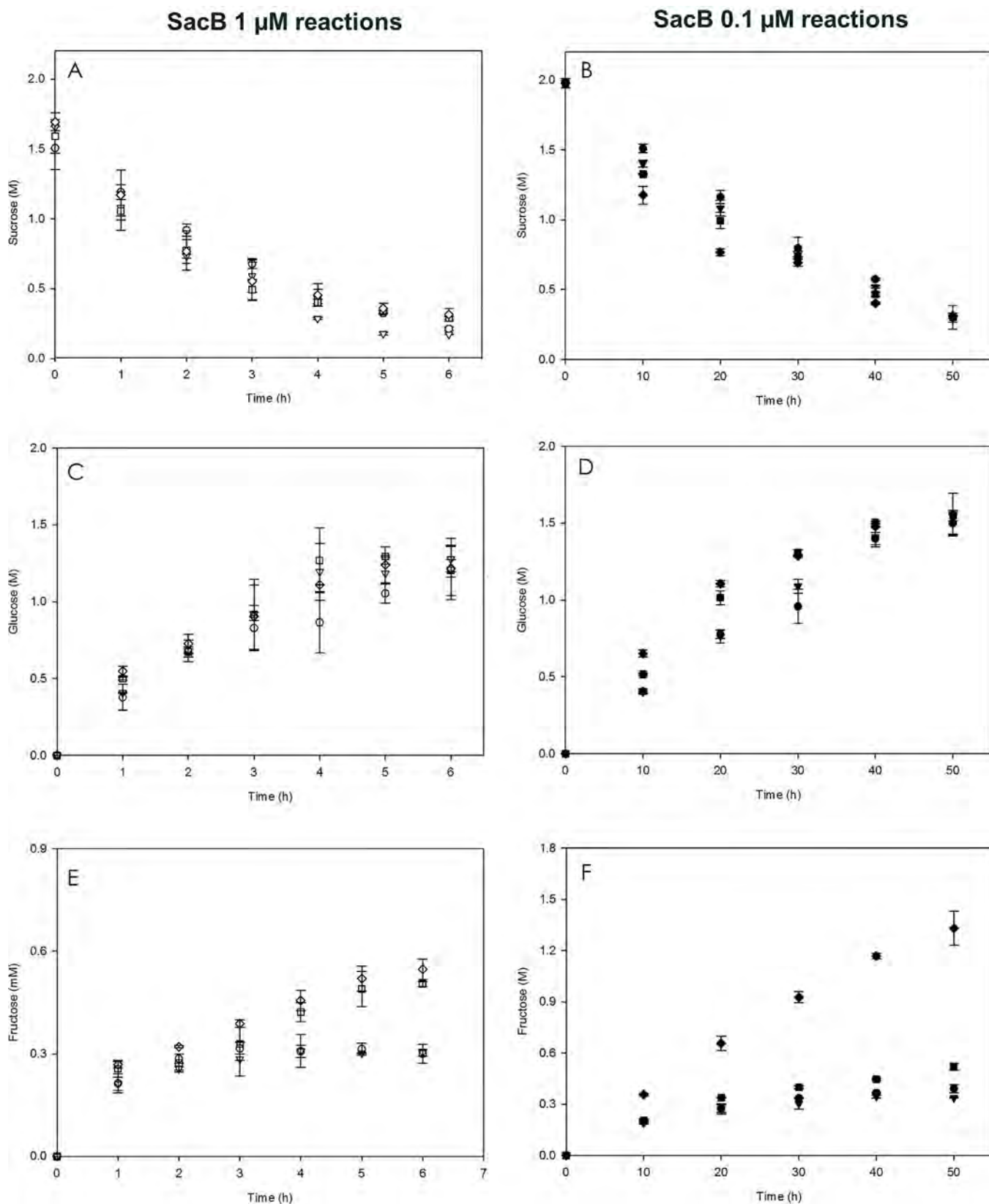
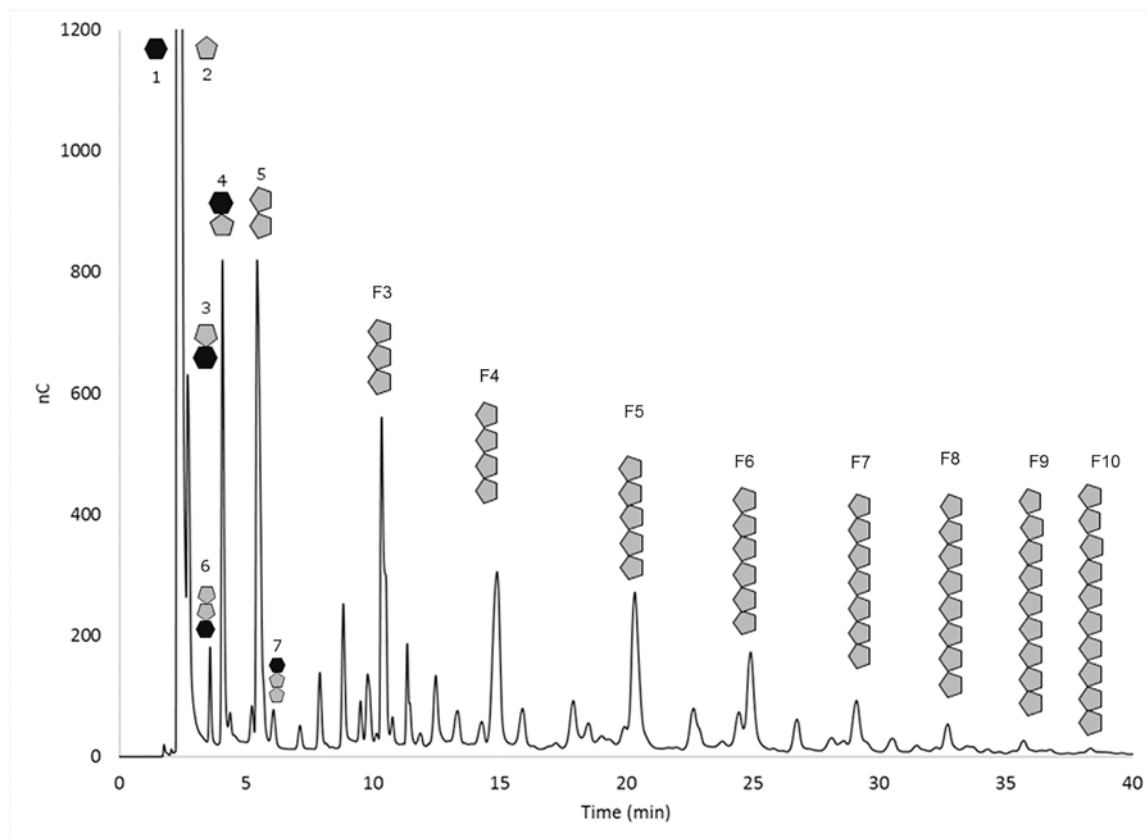


Fig. 1. Evolution of sucrose (A & B) consumption and glucose (C & D) and fructose (E & F) release at different SacB/LevB<sub>1</sub> ratios from 600 g/l sucrose at 37 °C, pH 6.0 50 mM acetate buffer and 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Open symbols correspond to reactions at 1 μM of SacB at different SacB/LevB<sub>1</sub> ratios 1-0 (circle), 1-1 (triangle), 1-10 (square) and 1-20 (rhomb). Closed symbols correspond to reactions at 0.1 μM of SacB at different SacB/LevB<sub>1</sub> ratios 1-0 (circle), 1-1 LevB<sub>1</sub> (triangle), 1-10 (square) and 1-100 (rhomb).

**Table 1**L-FOS synthesis yields obtained at different SacB/LevB<sub>1</sub> ratios.

| SacB (μM) | LevB <sub>1</sub> (μM) | SacB/LevB <sub>1</sub> ratio | High Mw levan (> 2200 kDa) (g/l) | High Mw product yield (w/w) % | Low Mw products (g/l) | Low Mw product yield (w/w) % | Maximum Low Mw DP products |
|-----------|------------------------|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------------------|
| 0.1       | 0                      | 0                            | 82.1 ± 2.3                       | 14.4                          | 125 ± 2.7             | 22.4                         | 30                         |
| 0.1       | 0.1                    | 1:1                          | 64.3 ± 4.1                       | 11.2                          | 148 ± 4.6             | 26.8                         | 30                         |
| 0.1       | 1                      | 1:10                         | 32.2 ± 1.2                       | 5.6                           | 156 ± 3.7             | 26.9                         | 10                         |
| 0.1       | 10                     | 1:100                        | 2 ± 0.8                          | 0.4                           | 52 ± 2.5              | 9.1                          | 10                         |
| 1         | 0                      | 0                            | 0                                | 0                             | 161 ± 8.8             | 36.2                         | 30                         |
| 1         | 1                      | 1:1                          | 0                                | 0                             | 191 ± 5.4             | 37.5                         | 10                         |
| 1         | 10                     | 1:10                         | 0                                | 0                             | 128 ± 2.9             | 29.1                         | 5                          |
| 1         | 20                     | 1:20                         | 0                                | 0                             | 135 ± 6.2             | 28.6                         | 5                          |

High molecular weight (Mw) levan was determined by GPC. Low molecular weight products concentration was calculated by mass balance, measuring glucose, fructose and residual sucrose concentrations. The degree polymerization was determined from HPAEC-PAD standards.



**Fig. 2.** L-FOS product profile observed by HPAEC-PAD, as obtained from SacB/LevB<sub>1</sub> reactions with 1 μM of each enzyme, 600 g/l sucrose, 37 °C, pH 6.0, 50 mM acetate buffer containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>. The figures over the chromatographic signals are drawn to give an idea of the most probable polymerization degree as concluded from standards. Grey pentagons represent fructose molecules (oligofructans) β2-6 linked while black hexagons represent glucose molecules. 1) glucose, 2) fructose, 3) sucrose, 4) blastose and 5) levanbiose, 6) 1-kestose, 7) 6-kestose. F# represents the degree of polymerization in the oligofructan series of L-FOS.

which remains in the L-FOS region (Fig. 2).

In all cases, the product profile consists of a set of L-FOS (GF<sub>n</sub>) resulting from direct SacB synthesis from sucrose, and oligolevans (F<sub>n</sub>) series, resulting from LevB<sub>1</sub> endo-hydrolysis of levan chains, all reaching a certain molecular weight defined by LevB<sub>1</sub> affinity. Among the wide set of L-FOS shown in Fig. 2, with a maximum polymerization degree of around 10, the main products identified are 1-kestose, 6-kestose and levanbiose, including blastose, the disaccharide eluted between 1-kestose and 6-kestose, as already described by Strube et al. (Strube et al., 2011).

### 3.1.2 levan synthesis in SacB/LevB<sub>1</sub> reactions

As already explained, very low SacB concentrations (0.01 μM) result in the synthesis of high molecular weight levan (average Mw ≥ 2000 kDa), while a low molecular weight fraction (7.6 kDa) is

obtained at high SacB concentration (> 1 μM). A bimodal levan distribution is obtained when an intermediate SacB concentration is used (0.01 μM < SacB < 1 μM). As previously reported (Porras-Domínguez et al., 2014), in the bi-enzymatic system, LevB<sub>1</sub> shows higher affinity for low than for high molecular weight levan, the hydrolysis rate resulting 1.5 times higher, probably due to the more complex branched structure of the high molecular weight levan fraction (Tanaka, Oi, & Yamamoto, 1980). As a result, high molecular weight levan accumulates depending on LevB<sub>1</sub> concentration, as shown in Table 1.

### 3.1.3. Kinetic characterization of LevB<sub>1</sub>SacB

Considering the advantages of a LevB<sub>1</sub>SacB equimolar ratio for an adequate and efficient L-FOS synthesis process, we decided to simplify the production and application of the bi-enzymatic process designing a

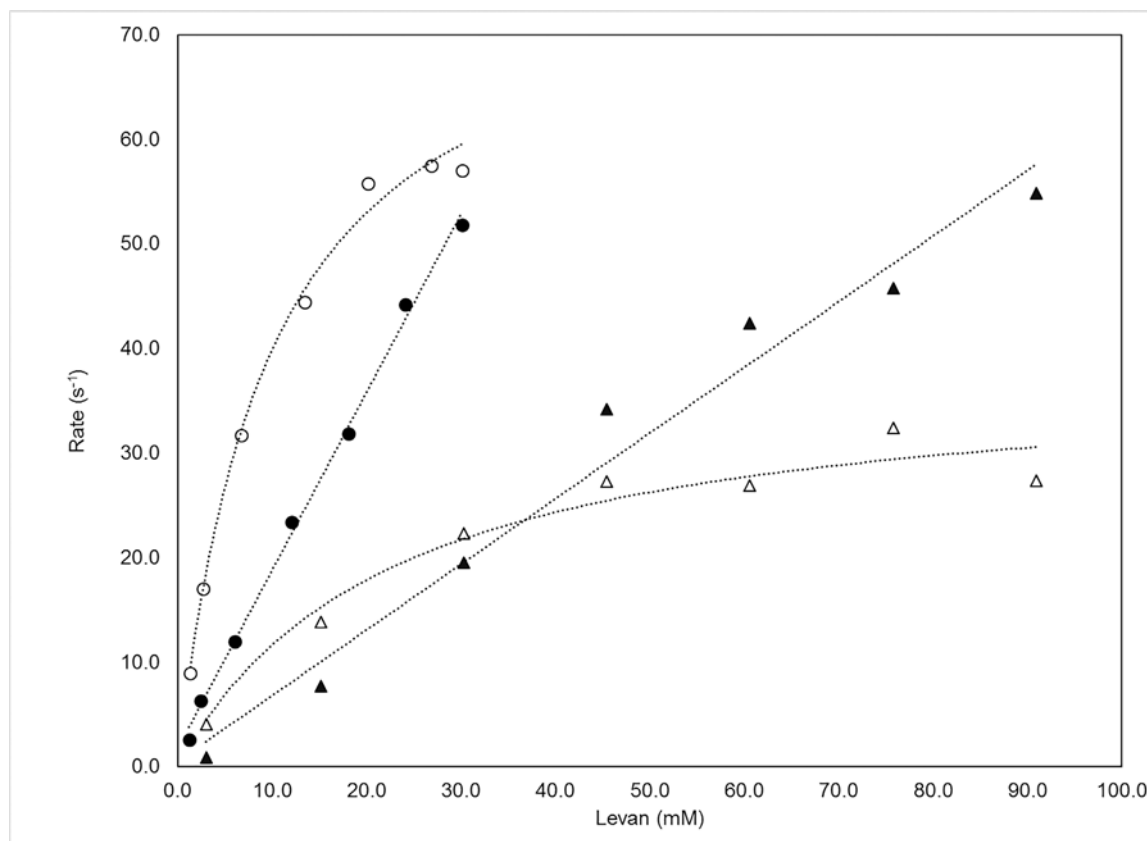


Fig. 3. Comparative kinetic behavior of endolevanase (LevB<sub>1</sub>) with 7.6 kDa Mw levan (closed circles) and 3.3 kDa levan (closed triangles) as substrate, and the endolevanase activity in LevB<sub>1</sub>SacB, also with 7.6 kDa Mw levan (open circles) and 3.3 kDa levan (open triangles) as substrate.

fusion enzyme. For this purpose, the genes coding for LevB<sub>1</sub> and SacB were included in a single construction linked with a short sequence, equivalent to the hexapeptide: GGSGGS. Two possibilities were considered: LevB<sub>1</sub>-GGSGGS-SacB and SacB-GGSGGS-LevB<sub>1</sub>. The former was selected as in this construction the two active sites are placed relatively far from each other and separated by the endolevanase  $\beta$ -sandwich domain which may act as an additional levan binding domain. This is the case of exolevanase from *B. subtilis* (SacC), where the  $\beta$ -sandwich domain (BsCBM66) was fully characterized as a levan binding domain (Cuskin et al., 2012).

The intrinsic individual kinetic properties of both levansucrase and endolevanase in the bifunctional protein were characterized as described in M & M, following the procedure used to measure the individual enzyme activities. This is possible, as the endolevanase activity does not affect the measurement of levansucrase activity during the initial rate. On the other hand, and as previously reported, endolevanase is not capable to hydrolyze sucrose, and although SacB has an intrinsic exo-levanase activity, high levansucrase concentrations ( $\geq 2.5 \mu\text{M}$ ) are required to affect the measurement of LevB<sub>1</sub> activity (Yamamoto, Iizuka, Tanaka, & Yanamoto, 1984). Free fructose was not observed in the HPAEC-PAD chromatograms of samples taken from the endolevanase activity assays. LevB<sub>1</sub> is therefore a *bona fide* endolevanase, the single activity observed when acting on levan (supplementary material 3).

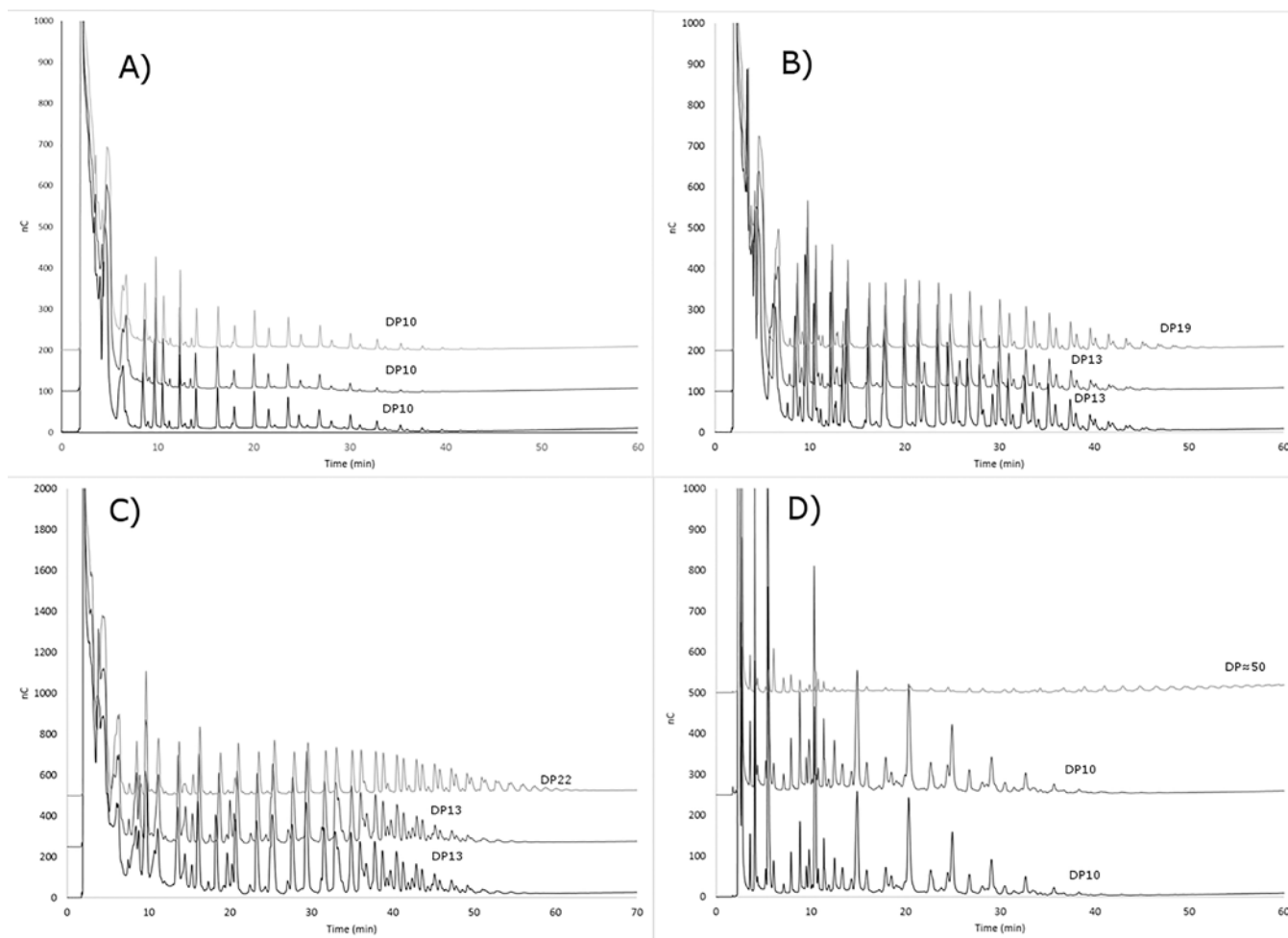
For both activities, the specific rate data obtained with LevB<sub>1</sub>SacB is referred to the molar concentration of the single enzyme, this in order to compare LevB<sub>1</sub> and SacB kinetic parameters in both cases: free and in the fusion protein.

It was found that although SacB follows Michaelis-Menten type kinetics both free or in LevB<sub>1</sub>SacB, a 5-fold reduction in affinity is produced as a consequence of the fusion to LevB<sub>1</sub>, as measured by the K<sub>m</sub> value for sucrose, while the turnover number (k<sub>cat</sub>) is reduced to

$108 \text{ s}^{-1}$ , two third the activity of the single enzyme ( $164 \text{ s}^{-1}$ ). On the other hand, the endolevanase behavior of LevB<sub>1</sub> free or fused in LevB<sub>1</sub>SacB is shown in Fig. 3. As previously reported, the kinetic behavior of LevB<sub>1</sub> is described by a first order model, with a specific rate constant of  $1.73 \text{ s}^{-1}$ , in contrast to the recently reported endolevanase BT1760 from *Bacteroides thetaiotaomicron* which reaches saturation and has a much higher specific activity towards a wide variety of levans with k<sub>cat</sub> as high as  $901 \text{ s}^{-1}$  for thimoty grass levan (Mardo et al., 2017). The kinetic behavior of LevB<sub>1</sub> in the fusion enzyme LevB<sub>1</sub>SacB follows Michaelis-Menten type kinetics, as shown in Fig. 3. Structural regions in SacB additional to the LevB<sub>1</sub>  $\beta$ -sandwich domain may explain this behavior, as they both may contribute to a higher affinity through levan binding to the fusion enzyme, resulting in a higher levan accessibility to LevB<sub>1</sub> active site. This was actually the case when the fusion of the carbohydrate binding domain (CBM66) to *Bacteroides thetaiotaomicron* exolevanase (BT382) decreased the K<sub>m</sub> values from 0.94 to 0.026 mM in levan hydrolysis (Cuskin et al., 2012). On the other hand, Kim, Ko, Kang, and Kim (2009) in a fusion protein combining dextransucrase and dextransucrase activities, found a 150% increase in specific activity of the endodextranase activity. In the latter case, dextransucrase provides additional carbohydrate binding domains to the fusion enzyme.

The stability of the fusion enzyme was studied by two different strategies. A direct evaluation of SacB and LevB<sub>1</sub> activities was carried out during storage at 37 °C of the fusion protein LevB<sub>1</sub>SacB. It was found that levansucrase was still 100% active after 48 h, while the endolevanase activity was reduced following a first order decay model with a half-life time of 121.6 h (supplementary material 4). According to previous reports, LevB<sub>1</sub> is fully stable at 37 °C (Porras-Domínguez et al., 2014), so that, while the presence in the same structure of LevB<sub>1</sub> favours SacB stability, this is not the case for LevB<sub>1</sub>, which became less stable. Nevertheless, the fusion enzyme is sufficiently stable to perform





**Fig. 4.** L-FOS product profile during initial reaction conditions as observed by HPAEC-PAD obtained with levansucrase SacB (light gray), simultaneous SacB and LevB<sub>1</sub> (dark gray) and LevB<sub>1</sub>SacB (black). Reaction conditions: 600 g/l sucrose, 37 °C, pH 6.0, 50 mM acetate buffer. A) 10 min, B) 30 min and C) 50 min. D) 6 h. DP # represents the maximum degree of polymerization observed.

**Table 2**

Final yields of the main products obtained in the simultaneous LevB<sub>1</sub> and SacB and the fusion enzyme (LevB<sub>1</sub>SacB) reaction systems.

|                                | Yield (w/w) % | L-FOS (g/l) | Blastose (g/l) | Levanbiose (g/l) | Maximum DP |
|--------------------------------|---------------|-------------|----------------|------------------|------------|
| LevB <sub>1</sub> : SacB (1:1) | 39.6          | 235.2 ± 7.6 | 16.39 ± 4.3    | 57.01 ± 4.8      | 10         |
| LevB <sub>1</sub> SacB         | 41.1          | 245.7 ± 9.3 | 11.04 ± 2.7    | 48.90 ± 5.2      | 10         |

the L-FOS synthesis process. In this context, LevB<sub>1</sub> stability is the limiting factor defining reaction conditions for an efficient synthesis. LevB<sub>1</sub>SacB stability was also studied through experiments where the L-FOS profile was analyzed by HPAEC-PAD after 2 h reactions from sucrose using the fusion enzyme previously incubated at 50 °C during 0, 10, 20, and 30 min (Supplementary material 5). The loss of LevB<sub>1</sub> activity may be observed after incubation at 50 °C as the amount of high molecular weight levan – FOS increases, including the presence of residual levan among the reaction products. The reduction of sucrose consumption is also a measure of SacB activity loss under the same incubation conditions.

### 3.2 l-FOS production by LevB<sub>1</sub>SacB

The evolution of the L-FOS profile synthesized in reactions with the fusion enzyme (10 U/ml of levansucrase activity in LevB<sub>1</sub>SacB), the simultaneous synthesis and hydrolysis reaction (1 μM of both Sac B and LevB<sub>1</sub>) and SacB (10 U/ml) as control reaction observed by HPAEC-PAD, are compared in Fig. 4, where it may be observed that during the first

30 min, the polymerization products accumulate as a result of SacB synthesis, with some evidence of endolevanase activity in the first two reactions. While in the SacB reaction the L-FOS DP reached around 19, in the presence of endolevanase activity the maximum DP reached is around 13, probably the minimum molecular weight required for LevB<sub>1</sub> recognition.

Although the overall kinetic behavior of the free endolevanase and the endolevanase in the fusion enzyme is different, their L-FOS product profile is identical. Actually, the differences in kinetic behavior are mainly found at high levan concentrations, a condition difficult to reach in the bi-enzymatic system. No differences in sucrose consumption rate in both systems are observed, neither in glucose or fructose release. In fact, the final product profile after 6 h of reaction, when sucrose consumption is around of 90%, is similar for both reaction systems, as shown in Fig. 4D. In conclusion, LevB<sub>1</sub>SacB is a fusion enzyme bearing two complementary enzymatic activities capable to synthesize levan-type FOS in the range of DP2 to DP10 containing 6-kestose, levanbiose and blastose among other oligosaccharides, which also include 1-kestose. The final product yields also result similar for both enzymatic strategies, as reported in Table 2.

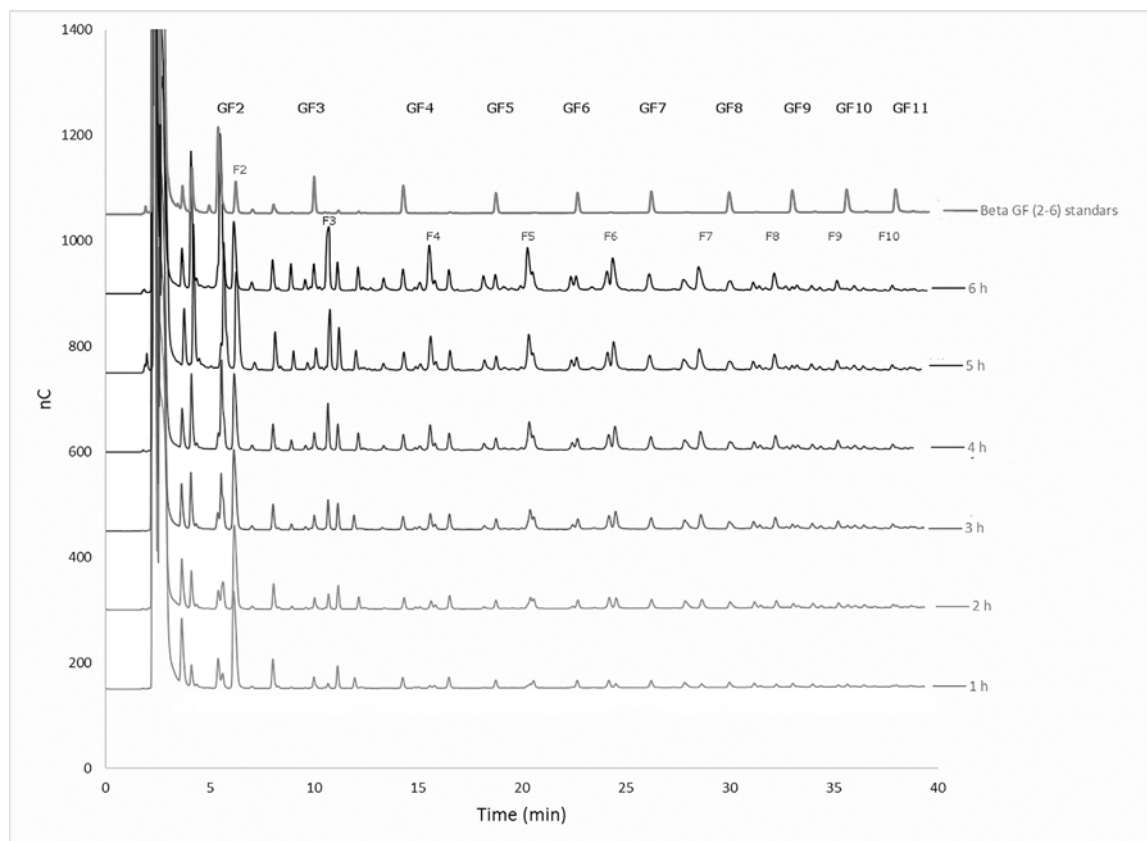


Fig. 5. Evolution of the L-FOS profile as observed by HPAEC-PAD in a 1.7 l reaction in samples taken during a 6 h synthesis from sucrose (600 g/L) in the presence of LevB<sub>1</sub>SacB at 37 °C, pH 6.0 50 mM sodium acetate buffer containing 1 μM CaCl<sub>2</sub>.

Table 3

Scale up yields and product concentration in reactions carried out at different reactor volume.

| Reaction Volumen (L) | Fructose (M) | Glucose (M) | L-FOS (M) | Yield (%) |
|----------------------|--------------|-------------|-----------|-----------|
| 0.6                  | 0.376        | 1.613       | 1.169     | 33.0      |
| 1                    | 0.354        | 1.656       | 1.172     | 34.5      |
| 1.7                  | 0.454        | 1.631       | 1.158     | 32.5      |

### 3.2.1 l- FOS production by LevB<sub>1</sub>SacB in a 2L reactor

Finally, in order to define reaction conditions susceptible to scale up the L-FOS synthesis process, the reaction was carried out in a 2 l reactor with 0.6, 1 and 1.7 l using 7.5 U/ml of LevB<sub>1</sub>SacB, 1.7 M sucrose at pH 6 at 37 °C. The agitation was fixed at 300 rpm (equivalent to a Reynolds number of 12.5), were the reaction media was homogeneously mixed. The reactions were sampled every hour and glucose, fructose and residual sucrose analyzed by HPLC, while the evolution of the L-FOS profile by HPAEC-PAD (Fig. 5). A similar L-FOS profile was observed both in the 1.7 l reaction and in 1 ml reactions (Fig. 4D), reaching 82–87% sucrose conversion with a L-FOS yield of 35% (Table 3).

## 4. Conclusions

As already shown, L-FOS are an emerging type of prebiotics that may soon contribute to human and animal health. A fusion enzyme LevB<sub>1</sub>SacB containing both, a transferase activity for levan synthesis and an endolevanase activity to produce L-FOS from levan, both in a single protein was designed. Two alternative procedures to obtain levan-type prebiotics are here described, involving either the individual enzymes (SacB and LevB<sub>1</sub>) in a single one-pot reaction containing equimolar concentrations of both enzymes, or the fusion enzyme LevB<sub>1</sub>SacB containing both activities. As demonstrated, a very similar

reaction evolution, product profile and reaction yield are observed in both systems. The construction of the fusion protein does not significantly affect the individual activities in the L-FOS synthesis so that the main advantage in using the LevB<sub>1</sub>SacB alternative is that production, purification and application procedures for SacB and LevB<sub>1</sub>, reduce to a single biocatalyst production process. The advantages would increase if the enzyme is immobilized and continuously used. The process is readily scaled with a similar kinetic behavior observed in 1 ml assay tubes and 2 l agitated reactions.

## Acknowledgments

We acknowledge Drs. Clarita Olvera and Ruben Paul Gaytan Colin from the Instituto de Biotecnología UNAM for their advice in the design of the fusion enzyme. We also thank Fernando Gonzalez for technical support, as well as Mario Trejo and Martin Patiño for the advice in intellectual property rights and administrative procedures. Finally, we thank DGAPA-UNAM for the financial support of project PAPIIT No. IT200316 and CONACYT C0013-2015-06, project 267620.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.040>.

## References

- Cuskin, F., Flint, J. E., Gloster, T. M., Morland, C., Baslé, A., Henrissat, B., et al. (2012). How nature can exploit nonspecific catalytic and carbohydrate binding modules to create enzymatic specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(51), 20889–20894. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1212034109>.
- Gomez, E., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Klinder, A., & Costabile (2010). In vitro

- evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 2114–2121. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04617.x>.
- Goulas, A. K., Cooper, J. M., Grandison, A. S., & Rastall, R. (2004). Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans in a recycle membrane bioreactor by the combined use of dextranase and dextranase. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(6), 778–787. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20257>.
- Goulas, A. K., Fisher, D. A., Grimble, G. K., Grandison, A. S., & Rastall, R. (2004). Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextranase and dextranase. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(4), 327–338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.05.008>.
- Homann, A., Biedendieck, R., Götze, S., Jahn, D., & Seibel, J. (2007). Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: Mutagenesis and mechanistic studies of a novel bifidogenic trisaccharide, neokestose, on the human colonic microbiota. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 637–644.
- Kilian, S., Kritzinger, S., Rycroft, C., Gibson, G., & Preez, J. (2002). The effects of the novel bifidogenic trisaccharide, neokestose, on the human colonic microbiota. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 637–644.
- Kim, Y.-M., Ko, E.-A., Kang, H.-K., & Kim, D. (2009). Construction, expression and characterization of fusion enzyme from *Arthrobacter oxydans* dextranase and *Klebsiella pneumoniae* amylase. *Biotechnology Letters*, 31(7), 1019–1024. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-009-9967-7>.
- Kim, Y.-M., Seo, M.-Y., Kang, H.-K., Atsuo, K., & Kim, D. (2009). Construction of a fusion enzyme of dextranase and dextranase: Application for one-step synthesis of isomaltoligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(3), 159–164. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.10.007>.
- Kolida, S., Tuohy, K., & Gibson, G. R. (2007). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S193. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN/2002537>.
- Li, M., Seo, S., & Karboune, S. (2015). *Bacillus amyloliquefaciens* levansucrase-catalyzed the synthesis of fructooligosaccharides, oligolevan and levan in maple syrup-based reaction systems. *Carbohydrate Polymers*, 133, 203–212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.010>.
- Mardo, K., Visnapuu, T., Vija, H., Aasamets, A., Viigand, K., & Alamäe, T. (2017). A highly active endo-levanase BT1760 of a dominant mammalian gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* cleaves not only various bacterial levans, but also levan of timothy grass. *PLoS One*, 12(1), 1–25. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0169989>.
- Marx, S. P., Winkler, S., & Hartmeier, W. (2000). Metabolization of B-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 182, 163–169.
- Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Miranda-Molina, A., Castillo, E., & Lopez Munguia, A. (2017). A novel two-step enzymatic synthesis of blastose, a  $\beta$ -D-fructofuranosyl-(2 $\leftrightarrow$ 6)-D-glucopyranose sucrose analogue. *Food Chemistry*, 227, 202–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.094>.
- Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñera, E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, 21(10), 589–595. <http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzn036>.
- Ortiz-Soto, M. E., Rudiño-Piñera, E., Rodríguez-Alegria, M. E., & Munguia, A. L. (2009). Evaluation of cross-linked aggregates from purified *Bacillus subtilis* levansucrase mutants for transfructosylation reactions. *BMC Biotechnology*, 9, 68. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-9-68>.
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Rodríguez-Alegria, M. E., Miranda-Molina, A., Escalante, A., González-Cervantes, R., et al. (2014). Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochemistry*, 49(5), 783–790. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.02.005>.
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Miranda-Molina, A., Rodríguez-Alegria, M. E., & Munguía, A. L. (2015). *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 132(October), 338–344. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.056>.
- Ravenscroft, N., Cescutti, P., Hearshaw, M. A., Ramsout, R., Rizzo, R., & Timme, E. M. (2009). Structural analysis of fructans from *Agave americana* grown in South Africa for spirit production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 3995–4003. <http://dx.doi.org/10.1021/jf8039389>.
- Recherches, L. D., & Ranguel, C. S. D. (1997). Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*, 32(3), 237–243.
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2005). Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 16(10), 442–457. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2005.05.003>.
- Strube, C. P., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J., & Heinz, D. W. (2011). Polysaccharide synthesis of the levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* is controlled by distinct surface motifs. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 17593–17600. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.203166>.
- Tanaka, T., Oi, S., & Yamamoto, T. (1980). The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase. *Journal of Biochemistry*, 87(1), 297–303.
- Tian, F., Karboune, S., & Hill, A. (2014). Synthesis of fructooligosaccharides and oligolevans by the combined use of levansucrase and endo-inulinase in one-step bi-enzymatic system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 22, 230–238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.12.004>.
- Visnapuu, T., Mardo, K., Mosoarca, C., Zamfir, A. D., Viganis, A., & Alamäe, T. (2011). Levansucrases from *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *P. chlororaphis* subsp. aurantiaca: Substrate specificity, polymerizing properties and usage of different acceptors for fructosylation. *Journal of Biotechnology*, 155(3), 338–349. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.026>.
- Yamamoto, S., Iizuka, M., Tanaka, T., & Yamamoto, T. (1984). The mode of synthesis of levan by *Bacillus subtilis* Levansucrase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 2, 343–349.





Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI

Sello  
Folio de entrada

Fecha y hora de recepción

Solicitud Expediente: MX/a/2017/002339  
Fecha: 22/FEB/2017 Hora: 11:35:14  
Folio: MX/E/2017/013460 918591



Solicitud de Patente  
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:  
 Modelo Industrial  Dibujo Industrial

Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

**DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)**

I El solicitante es el inventor  El solicitante es el causahabiente   
1) Nombre (s): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.  
2) Nacionalidad (es): MEXICANA  
3) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: 9° PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510  
Población, Estado y País: COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO.  
4) Teléfono (clave): (55) 56 22 63 29 AL 31 5) Fax (clave): (55) 56 65 46 44

**DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)**

II 6) Nombre (s): JAIME RICARDO PORRAS DOMÍNGUEZ, ÁNGELA ÁVILA FERNÁNDEZ, MARÍA ELENA RODRÍGUEZ ALEGRIA y AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA CANALES.  
7) Nacionalidad (es): MEXICANAS.  
8) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: NUEVA SUIZA 25, COLONIA REFORMA, C.P. 62260.  
Población, Estado y País: CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO.  
9) Teléfono (clave): 10) Fax (clave):

**DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)**

III 11) Nombre (s): DANIEL OJESTO MARTÍNEZ PORCAYO y MARTHA FIGUEROA PÉREZ 12) RGP-DDAJ-14782  
13) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: 3er PISO DEL EDIFICIO "B" DE LAS OFICINAS ADMINISTRATIVAS EXTERIORES DE LA ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, C.P. 04510.  
Población, Estado y País: COYOACÁN, CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO. 14) Teléfono (clave): (55) 56 22 63 29 AL 31 15) Fax (clave): (55) 56 65 46 44  
16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:  
ROCIO JUÁREZ VÁZQUEZ y RUBÉN GONZÁLEZ GALINDO.

17) Denominación o Título de la Invención:

"MÉTODO ENZIMÁTICO PARA LA SÍNTESIS DE FOS TIPO LEVANAS USANDO LEVANSACARASA Y UNA ENDOLEVANASA LIBRES O FUSIONADAS"

18) Fecha de divulgación previa  
Día Mes Año  
19) Clasificación Internacional uso exclusivo del IMPI

20) Divisiva de la solicitud  
Número Figura jurídica  
21) Fecha de presentación  
Día Mes Año

22) Prioridad Reclamada:  
País Fecha de presentación No. de serie  
Día Mes Año

**Lista de verificación (uso interno)**

| No. Hojas |    | No. Hojas |  |
|-----------|----|-----------|--|
| X         | 1  | X         | 4  |
| X         | 40 |           | Documento de cesión de derechos                      |
| X         | 26 |           | Constancia de depósito de material biológico         |
| X         | 1  |           | Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa |
| X         | 1  |           | Documento (s) de prioridad                           |
| X         | 1  |           | Traducción   |
|           |    | 73        | TOTAL DE HOJAS                                       |

**Observaciones:**

Se anexa hoja de descuento y listado de secuencias de 27 Hojas.

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LIC DANIEL OJESTO MARTÍNEZ PORCAYO y LIC MARTHA FIGUEROA PÉREZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 17 DE FEBRERO DE 2017

Nombre y firma del solicitante o su apoderado

Lugar y fecha

Instituto de Biotecnología