



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Instituto de Biotecnología

Síntesis y purificación parcial de Levan FOS empleando la enzima bifuncional LevB₁SacB expresada en *Pichia pastoris* en un sistema de biocatálisis/fermentación

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

I.B.Q. Silvia Montiel Salgado

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Agustín López-Munguía Canales

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Ángela Ávila Fernández

[Centro de Investigación, DACS](#)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos, México. Enero, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 (UNAM), bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía Canales y la asesoría técnica de la M. en B. María Elena Rodríguez Alegría.

Para su realización se contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la beca No. 888576 y el apoyo económico otorgado por la UNAM a través del proyecto DGAPA/PAPIIT/UNAM IT200316. Se desarrolló también en el marco del proyecto de Ciencia Básica CONACYT A1-S-21209, sobre Funcionalidad de Glicosiltransferasas.

A Dios.

A la memoria de mis padres.

A mis hermanos Alejandra, Margarita, Ma. Inés, Juan Carlos y Lucia por su apoyo
incondicional.

A mis sobrinos Valeria, Axel, Hugo, Nicole y Mateo por ser mi mayor motivación.

Agradecimientos

Al Dr. **Agustín López-Munguía Canales** por aceptarme en su equipo de investigación y por la confianza otorgada en la realización de este proyecto.

A la M. en B. **María Elena Rodríguez Alegría** por ser mi mas gran apoyo durante este proceso, porque nunca deje de creen en mí.

A los miembros del comité tutorial: Dra. **Ángela Ávila Fernández** y Dr. **Luis Caspeta Guadarrama** por todas las aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A los integrantes del jurado: Dr. **Alfredo Martínez Jiménez**, Dra. **Isabel Gómez Gómez**, Dra. **María del Refugio Trejo Hernández**, Dra. **Carmina Montiel Pacheco** y Dra. **Marcela Ayala Aceves** por todas las aportaciones y comentarios enriquecedores en el presente trabajo.

Al **Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP)** por el apoyo económico para asistir al “XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería”.

A la M. C. **Luz Cristina Vallejo García** por su disposición para compartir sus conocimientos, por siempre estar dispuesta a escucharme y apoyarme.

A la Q.F.B **Citlali Melissa Chino de la Cruz** por brindarme su amistad y apoyo incondicional.

Al Dr. **Jaime Ricardo Porras Domínguez** por su valiosa ayuda en el laboratorio.

A la T. L **Aurelia Ocampo** por su valiosa ayuda en el laboratorio y por su valiosa amistad.

A la Biol. **Larisa Campos** y A el Lic. **Antonio Guillen** por todo el apoyo administrativo.

A mis compañeros de generación **Luis Alberto, Raúl Alejandro, Diana Nahyeli, Yaice Berenice** y **Sara Gloria** por brindarme su valiosa ayuda y amistad.

A todos ustedes **Gracias...**

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Fructanas	3
2.2. Enzima de fusión LevB ₁ SacB	8
2.3. <i>P. pastoris</i> como un sistema de producción de proteínas recombinantes	13
2.4. <i>P. pastoris</i> como método biológico de purificación de FOS	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS.....	17
5. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos particulares.....	18
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS	20
7.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo	20
7.1.1. Cepas comerciales.....	20
7.1.2. Vectores de expresión	20
7.1.3. Medios de cultivo.....	20
7.2. Evaluación de los sistemas de expresión inducible y constitutivo de <i>P. pastoris</i> para la producción de la enzima de fusión LevB ₁ SacB	21
7.2.1. Transformación de células de <i>P. pastoris</i>	21
7.2.2. Preservación de cepas de <i>P. pastoris</i> transformadas	21
7.2.3. Expresión de la enzima de fusión LevB ₁ SacB en <i>P. pastoris</i>	21
7.3. Caracterización enzimática de LevB ₁ SacB	22
7.3.1. Ensayo de actividad enzimática	22
7.3.2. Cuantificación de proteína	23
7.4. Análisis de proteínas	23
7.4.1. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).....	23
7.4.2. Zimogramas	23

7.5.	Evaluación de la prueba de concepto empleando el sistema de expresión constitutivo de <i>P. pastoris</i>	24
7.5.1.	Evaluación a nivel matraz.....	24
7.5.2.	Evaluación a nivel biorreactor.....	25
7.6.	Métodos analíticos.....	26
7.6.1.	Cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa.....	26
7.6.2.	Análisis de levanas.....	26
7.6.3.	Análisis del perfil de L-FOS.....	26
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
8.1.	Construcción de cepas recombinantes.....	27
8.1.1.	Linearización de vectores de expresión.....	27
8.1.2.	Transformación de células de <i>P. pastoris</i>	27
8.1.2.1.	Determinación del fenotipo Mut y Lev+.....	29
8.1.3.	Selección de transformantes para la expresión de LevB ₁ SacB.....	32
8.1.4.	Selección del sistema de expresión en <i>P. pastoris</i>	35
8.1.4.1.	Estabilidad de LevB ₁ a diferentes valores de pH's.....	41
8.1.4.2.	Glicosilación de la enzima de fusión LevB ₁ SacB.....	43
8.1.4.3.	Análisis de proteólisis en el sistema de expresión <i>P. pastoris</i>	47
8.2.	Prueba de concepto a nivel matraz y biorreactor: Cultivo alimentado de la cepa constitutiva.....	54
9.	CONCLUSIONES.....	74
10.	PERSPECTIVAS.....	75
11.	PRODUCTOS.....	76
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de diversas fructanas. La sacarosa se encuentra señalada en círculo y se muestra la enzima que en plantas forma cada tipo de enlace. Las fructanas esquematizadas son: (a) inulina, (b) levana y (c) fructana mezclada (Ritsema & Smeekens, 2003) 3
- Figura 2.** Biosíntesis de fructanas en plantas. Las moléculas base para iniciar la elongación de las diferentes series de fructanas vegetales se encuentran señaladas en los recuadros grises y se muestran las FTFs responsables de la síntesis de los diferentes fructanas (Vijn & Smeekens, 1999)..... 4
- Figura 3.** Biosíntesis de fructanas microbiana. Las FTFs empleadas en la síntesis de las fructanas se encuentran señaladas en círculo. (a) Transferencia del grupo fructosil a sacarosa y/o polímero en crecimiento e (b) hidrólisis de la sacarosa 5
- Figura 4.** Diagrama que describe las etapas principales de los procesos industriales para la producción de I- FOS. (a) Mediante hidrólisis de inulina y (b) síntesis a partir de sacarosa (Porrás-Domínguez, 2012) 6
- Figura 5.** Diagrama que describe las etapas principales de los procesos propuestos para la producción de L-FOS. (a) Sistema secuencial, (b) sistema simultáneo y (c) biocatalizador de fusión (Porrás-Domínguez et al., 2017)..... 7
- Figura 6.** Estructura de la levansacarasa SacB de *B. subtilis*. Se muestra el dominio β -propela que compone a la levansacarasa (Porrás-Domínguez, 2018) 9
- Figura 7.** Modelo de la endolevanasa LevB₁ de *B. licheniformis*, creado por homología empleando el servidor ITASSER, a partir de alineamientos con enzimas de la familia GH32, minimizadas con el servidor YASARA. Se muestra los dominios que conforman la endolevanasa (Porrás-Domínguez, 2018)..... 10
- Figura 8.** Evolución del perfil de L-FOS producidos durante la síntesis con LevB₁SacB (7.5 U/mL), empleando 600 g/L de sacarosa a pH 6, 37 °C y 300 rpm, en un volumen de

reacción de 1.7 L. Los L-FOS se analizaron mediante HPAEC-PAD (Porrás-Domínguez et al., 2017)..... 11

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 0.5X de las digestiones de vectores recombinantes. (a) Control negativo vectores sin inserto; 1: marcador de peso molecular (pb), 2: pPICZ α A sin digerir 3: pPICZ α A + Sac I, 4: pGAPZ α A sin digerir y 5: pGAPZ α A + Avr II y (b) vectores con el gen *LevB₁SacB*; 1: marcador de peso molecular (pb), 2: pPICZ α A-*LevB₁SacB* sin digerir 3: pPICZ α A-*LevB₁SacB* + Sac I, 4: pGAPZ α A-*LevB₁SacB* sin digerir y 5: pGAPZ α A-*LevB₁SacB* + Avr II 28

Figura 10. Selección de clonas de *P. pastoris* X-33 recombinante en placas de agar YPDS con zeocina 100 μ g/mL. (a) Clonas X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB* (sistema inducible); 1: 200 μ L de X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB*, 2: 50 μ L de X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB*, 3: 10 μ L de X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB* y (b) clonas X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB* (sistema constitutivo) ; 1: 200 μ L de X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB*, 2: 50 μ L de X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB*, 3: 10 μ L de X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB* 29

Figura 11. Determinación fenotípica Mut de los clones X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB* (sistema inducible). (a) Placas de agar MD glucosa 2% (p/v) con zeocina 100 μ g/mL y (b) placas de agar MM metanol 0.5 % (v/v) con zeocina 100 μ g/mL 31

Figura 12. Determinación fenotípica Lev⁺ de los clones X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB* (sistema inducible). (a) Placas de agar MM metanol 0.5 % (v/v) con zeocina 100 μ g/mL y (b) placas de agar MM metanol 0.5 % (v/v) con zeocina 100 μ g/ mL adicionado con 29.24 mM de sacarosa 31

Figura 13. Expresión de la enzima de fusión *LevB₁SacB* en X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB* (sistema inducible) en medio BM-Y metanol 0.5 % (v/v): (a) cinética de crecimiento, (c) actividad volumétrica de *LevB₁SacB* medida como levansacarasa y (e) proteína soluble y expresión de la enzima de fusión *LevB₁SacB* en X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB* (sistema constitutivo) en medio BM-Y glucosa 2 % (p/v): (b) cinética de crecimiento, (d) actividad volumétrica de *LevB₁SacB* medida como levansacarasa y (f) proteína soluble 34

- Figura 14.** Expresión de la enzima de fusión LevB₁SacB en X-33/pPICZαA-LevB₁SacB (sistema inducible) en medio BM-Y metanol 0.5 % (v/v). (a) Cinética de crecimiento, (b) actividad volumétrica de LevB₁SacB medida como levansacarasa y endolevanasa y (c) proteína soluble..... 36
- Figura 15.** SDS-PAGE de los sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos de cultivo para X-33/pPICZαA-LevB₁SacB (sistema inducible) en medio BM-Y metanol 0.5 % (v/v). 1) Marcador de peso molecular (kDa), 2) 5 μg/0 h de cultivo, 3) 5 μg/24 h de cultivo, 4) 5 μg/48 h de cultivo, 5) 5 μg/72 h de cultivo, 6) 5 μg /96 h de cultivo, 7) 5 μg /120 h de cultivo y 8) cepa X-33/pPICZαA transformada con el vector sin el inserto *LevB₁SacB* 120 h de cultivo 37
- Figura 16.** Expresión de la enzima de fusión LevB₁SacB en X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB (sistema constitutivo) en medio BM-Y glucosa 2 % (p/v). (a) Cinética de crecimiento, (b) actividad volumétrica de LevB₁SacB medida como levansacarasa y endolevanasa y (c) proteína soluble..... 38
- Figura 17.** SDS-PAGE de los sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos de cultivo para X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB (sistema constitutivo) en medio BM-Y glucosa 2 % (p/v). 1) Marcador de peso molecular (kDa), 2) 2.5 μg /0 h de cultivo, 3) 3.5 μg /24 h de cultivo, 4) 4 μg/48 h de cultivo, 5) 3.5 μg/72 h de cultivo, 6) 4.5 μg/ 96 h de cultivo, 7) 4 μg/ 120 h de cultivo y 8) cepa X-33/pGAPZαA transformada con el vector sin inserto *LevB₁SacB* 120 h de cultivo 39
- Figura 18.** Estudio de la estabilidad de LevB₁ en la enzima de fusión LevB₁SacB a pH 5.5, 6.0 y 6.5 a la temperatura de 28 °C 42
- Figura 19.** SDS-PAGE y tinción con el reactivo de Schiff de muestras obtenidas de sobrenadantes de cultivo de la expresión de LevB₁SacB en *P. pastoris* X-33. (a) Sistema inducible (X-33/pPICZαA-LevB₁SacB): 1) marcador de peso molecular (kDa), 2) y 6) clona X-33/pPICZαA-LevB₁SacB 120 h de cultivo, 3) y 7) clona X-33/pPICZαA-LevB₁SacB 120 h de cultivo purificada por cromatografía de afinidad a níquel, 4) y 8) clona X-

33/pPICZ α A transformada con el vector sin inserto *LevB₁SacB* 120 h de cultivo, 5) y 9) *LevB₁SacB* expresada en *E. coli* Rosetta 2 purificada por cromatografía de afinidad a níquel y (b) sistema constitutivo (X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB*): 1) marcador de peso molecular (kDa), 2) y 6) clona X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB* 120 h de cultivo, 3) y 7) clona X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB* 120 h de cultivo purificada por cromatografía de afinidad a níquel, 4) y 8) clona X-33/pGAPZ α A transformada con el vector sin inserto *LevB₁SacB* 120 h de cultivo, 5) y 9) *LevB₁SacB* expresada en *E. coli* Rosetta 2 purificada por cromatografía de afinidad a níquel..... 45

Figura 20. SDS-PAGE de sobrenadantes obtenidos a 120 h de inducción para el sistema X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB* (sistema inducible) en medio BM-Y metanol 0.5 % (v/v). 1) Marcador de peso molecular (kDa), 2) *LevB₁SacB* producida por *P. pastoris* X-33 y 3) *LevB₁SacB* producida por *P. pastoris* X-33 + PNGasa F..... 46

Figura 21. Producción inducible de *LevB₁SacB*. Identificación de las actividades mediante SDS-PAGE y zimograma. (a) Sistema de expresión X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB* para observar la actividad levansacarasa y (b) sistema de expresión X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB* para observar la actividad endolevanasa. 1) Marcador de peso molecular (kDa), 2) y 6) X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB* 120 h de cultivo, 3) y 7) X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB* 120 h de cultivo purificada por afinidad a níquel, 4) y 8) clona X-33/pPICZ α A transformada con el vector sin inserto *LevB₁SacB* 120 h de cultivo, 5) y 9) *LevB₁SacB* expresada en *E. coli* Rosetta 2 purificada por cromatografía de afinidad a níquel 49

Figura 22. Producción constitutiva de *LevB₁SacB*. Identificación de las actividades mediante SDS-PAGE y zimograma. (a) Sistema de expresión X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB* para observar la actividad levansacarasa y (b) sistema de expresión X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB* para observar la actividad endolevanasa. 1) Marcador de peso molecular (kDa), 2) y 6) X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB* 120 h de cultivo, 3) y 7) X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB* 120 h de cultivo purificada por afinidad a níquel, 4) y 8) clona X-33/pGAPZ α A transformada con el vector sin inserto *LevB₁SacB* 120 h de cultivo, 5) y 9)

LevB ₁ SacB expresada en <i>E. coli</i> Rosetta 2 purificada por cromatografía de afinidad a níquel	49
Figura 23. Curvas de DNS. (a) Control y (b) medio BM-Y	51
Figura 24. Diagrama que describe las etapas del sistema PEREEM en la producción L-FOS ...	56
Figura 25. Cinéticas de crecimiento de <i>P. pastoris</i> y de control de pH en el sistema X-33/pGAPZαA-LevB ₁ SacB en medio BM-Y en el proceso de PEREEM en tres etapas, con adiciones de sacarosa (ver detalles en el texto y en M&M). (a) Evolución de la biomasa de <i>P. pastoris</i> y (b) comportamiento de pH	58
Figura 26. Evolución del perfil de L-FOS producidos durante la síntesis con LevB ₁ SacB, en un sistema de PEREEM, llevado a cabo por etapas, para una concentración global de 300 g/L de sacarosa. El proceso se desarrolló a 28 °C y 200 rpm, en un volumen de reacción de 0.1 L.....	59
Figura 27. Evolución en la producción de levanas durante la síntesis con LevB ₁ SacB, en un sistema de PEREEM, llevado a cabo por etapas, para una concentración global de 300 g/L de sacarosa. El proceso se desarrolló a 28 °C y 200 rpm, en un volumen de reacción de 0.1 L. (a) 1 ^{ra} etapa, (b) 2 ^{da} etapa y (c) 3 ^{ra} etapa en el sistema descrito	61
Figura 28. Evolución de la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa durante el proceso de PEREEM para la síntesis de L-FOS con la enzima LevB ₁ SacB empleando una concentración global de 300 g/L de sacarosa suministrada en tres etapas. El proceso se desarrolló a 28 °C y 200 rpm, en un volumen de reacción de 0.1 L	62
Figura 29. Cinética de crecimiento de <i>P. pastoris</i> en el sistema X-33/pGAPZαA-LevB ₁ SacB en medio BM-Y en el proceso de PEREEM en dos etapas, con adiciones de sacarosa (ver detalles en el texto y en M&M).....	65

- Figura 30.** Evolución de las actividades levansacarasa y endolevanasa en el sistema X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB en medio BM-Y en el proceso de PEREEM en dos etapas, con adiciones de sacarosa (ver detalles en el texto y en M&M) 66
- Figura 31.** Evolución del perfil de L-FOS producidos durante la síntesis con LevB₁SacB, en un sistema de PEREEM, llevado a cabo por etapas, para una concentración global de 200 g/L de sacarosa. El proceso se desarrolló a 28 °C y 200-1200 rpm, en un volumen de reacción de 0.8 L. 67
- Figura 32.** Evolución en la producción de levanas durante la síntesis con LevB₁SacB, en un sistema de PEREEM, llevado a cabo por etapas, para una concentración global de 200 g/L. El proceso se llevó a cabo a 28 °C y 200-1200 rpm, en un volumen de reacción de 0.8 L. (a) 1^{ra} etapa, (b) 2^{da} etapa del sistema descrito..... 68
- Figura 33.** Evolución de la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa durante el proceso de PEREEM para la síntesis de L-FOS con la enzima LevB₁SacB empleando una concentración global de 200 g/L de sacarosa suministrada en dos etapas. El proceso se desarrolló a 28 °C y 200-1200 rpm, en un volumen de reacción de 0.8 L..... 69
- Figura 34.** Perfil de L-FOS obtenido en los sistemas propuestos para la síntesis de L-FOS empleando el biocatalizador de fusión. (a) Sistema de PEREEM a nivel matraz, (b) sistema de PEREEM a nivel fermentador y (c) biocatalizador de fusión expresado en *E. coli* Rosetta 2 72
- Figura 35.** Perfil de levana obtenido en los sistemas propuestos para la síntesis de L-FOS empleando el biocatalizador de fusión. (a) Sistema de PEREEM a nivel matraz y (b) sistema de PEREEM a nivel biorreactor 73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de actividad específica de LevB ₁ SacB del sobrenadante de cultivo de X-33/pPICZαA-LevB ₁ SacB (sistema inducible) en BM-Y metanol 0.5 % (v/v) y de X-33/pGAPZαA-LevB ₁ SacB (sistema constitutivo) en BM-Y glucosa 2 % (p/v) a diferentes tiempos, en relación con la actividad específica de LevB ₁ SacB expresada en <i>E. coli</i> Rosetta 2	41
Tabla 2. Evaluación de los componentes del medio BM-Y en la medición de poder reductor mediante la técnica de DNS	52
Tabla 3. Evaluación por etapas para el sistema de PEREEM desarrollado a nivel matraz empleando el sistema de expresión y consumo de monosacáridos de <i>P. pastoris</i> X-33	63
Tabla 4. Evaluación por etapas para el sistema de PEREEM desarrollado a nivel biorreactor empleando el sistema de expresión y consumo de monosacáridos de <i>P. pastoris</i> X-33	70
Tabla 5. Balance de los componentes presentes en el sobrenadante de cultivo para la clona X-33/pGAPZαA-LevB ₁ SacB en relación con los componentes de reacción obtenidos para LevB ₁ SacB expresada en <i>E. coli</i> Rosseta 2 (Porrás-Domínguez, 2017)	71

RESUMEN

Se desarrolló un proceso simultáneo de producción de enzima de fusión LevB₁SacB, de síntesis de fructooligosacáridos (FOS) tipo levana (L-FOS) a partir de sacarosa y de la eliminación de azúcares no deseados, en el medio de producción, empleando la levadura *Pichia pastoris*.

En una primera etapa se estudió la expresión de la enzima de fusión LevB₁SacB en *P. pastoris* usando dos sistemas de expresión: uno inducible con metanol bajo el control del promotor de la enzima alcohol oxidasa 1 (pAOX1) y otro constitutivo bajo el control del promotor de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (pGAP) y usando glucosa como fuente de carbono. Ambas construcciones incluyen al factor de apareamiento tipo α (α -MF) de *Saccharomyces cerevisiae*, lo cual permite la excreción del producto. Para ello se llevaron a cabo cinéticas a nivel matraz a 28 °C y 200 rpm (sin control de pH). Con ambos sistemas de expresión la enzima de fusión LevB₁SacB fue secretada al medio de cultivo. Los valores alcanzados después de 120 h de inducción, en el sistema inducible, fueron: 41,347 U/L de actividad levansacarasa y 899 U/L de endolevanasa (con una relación SacB/LevB₁=46), mientras que en el sistema constitutivo se alcanzaron: 4,048 U/L de actividad levansacarasa y 112 U/L de endolevanasa después de 72 h de cultivo (SacB/LevB₁=36). En ambos sistemas los niveles de actividad endolevanasa fueron bajos, tomando en consideración que se deseaba obtener una relación SacB/LevB₁ cercana a 1.39. Dicha relación, reportada previamente con el sistema de *Escherichia coli*, permite generar un perfil de L-FOS con un grado de polimerización (GP) pequeño de entre 2 y 10 unidades de fructosa.

Para evaluar el sistema simultáneo de producción de enzima, de reacción enzimática y de eliminación de monosacáridos (PEREEM) a nivel matraz y biorreactor se seleccionó el sistema constitutivo. Este sistema no requiere el uso del metanol (compuesto tóxico en el ámbito alimentario) para inducir la expresión de la enzima y además permite el diseño de una estrategia de cultivo semicontinuo (expresión-reacción). A nivel matraz, el proceso tuvo una duración de 288 h y se llevó a cabo con tres adiciones secuenciales de 100 g/L de sacarosa a un cultivo de 0.1 L de *P. pastoris* a 28 °C y 200 rpm (sin control de pH). En esta evaluación se produjeron 8.62 g de L-FOS libres de monosacáridos (glucosa y fructosa) y sacarosa a partir de 30 g de sacarosa (rendimiento de 28.7 %, p/p). A nivel biorreactor, el proceso se desarrolló con dos adiciones

secuenciales de sacarosa (también de 100 g/L) al cultivo de *P. pastoris* a 28 °C, 200-1200 rpm, 0.5-1.0 vvm de aireación y con control de pH (6.0), en un volumen de reacción de 0.8 L. Como resultado, se obtuvieron 72.9 g de L-FOS, también libre de monosacáridos, a partir de 160 g de sacarosa llevado a cabo en 2 adiciones, en un tiempo total de 59 h (rendimiento de 45.5 %, p/p). El rendimiento fue 1.59 veces mayor en el sistema desarrollado a nivel biorreactor y se propone que esto se debió al control que se tuvo sobre el pH y mayor oxígeno transferido en el biorreactor. En cuanto al perfil de L-FOS, a nivel matraz se logró obtener un GP menor a 20 unidades de fructosa, mientras que a nivel biorreactor se sintetizaron oligosacáridos más pequeños con un GP menor a 10. Esta diferencia en el perfil es el resultado de una menor actividad endolevanasa en LevB₁SacB obtenida a nivel matraz.

1. INTRODUCCIÓN

Los FOS son fructanas con $GP \leq 10$ ampliamente utilizados en la elaboración de alimentos funcionales, debido a sus propiedades prebióticas comprobadas para aquellos cuyas moléculas de fructosa se encuentran unidas mediante enlaces β -2,1 (FOS tipo inulina o I-FOS) (Ávila-Fernández et al., 2011; Franck, 2002; Lafraya et al., 2011). Actualmente los I-FOS son producidos por síntesis enzimática a partir de sacarosa empleando fructosiltransferasas (FTFs) de origen fungal o mediante hidrólisis enzimática parcial de inulina de origen vegetal usando endoinulinasas (Ávila-Fernández et al., 2011; Bali et al., 2015; Franck, 2002; Ganaie et al., 2014; Ko et al., 2019; Lafraya et al., 2011; Nobre et al., 2018; Singh et al., 2016). Cuando la síntesis se realiza vía enzimática, se obtiene como subproducto una molécula de glucosa por cada molécula de fructosa transferida a partir del sustrato sacarosa. Otra parte de la sacarosa puede ser hidrolizada, agregando fructosa, además de glucosa a los subproductos de reacción. Para su aplicación como prebióticos, estas mezclas de reacción requieren un proceso de purificación por ultra- o nano-filtración con membranas o por cromatografía para remover los monosacáridos libres (glucosa, fructosa) y eventualmente la sacarosa residual de la reacción (Ávila-Fernández et al., 2011; Nobre et al., 2018; Porras-Domínguez et al., 2019; Singh et al., 2016; Yang et al., 2008).

Una alternativa a los prebióticos tipo inulina son los FOS de tipo levana (L-FOS), en los que las moléculas de fructosa se unen mediante enlaces β -2,6, para cuya síntesis directa a partir de sacarosa, hasta la fecha no se ha logrado identificar en la naturaleza una enzima eficiente. Tampoco se ha logrado modificar vía ingeniería de proteínas, la especificidad de enzimas del tipo levansacarasas (FTFs con capacidad de sintetizar el polímero levana) (Ortiz-Soto et al., 2008). En el laboratorio de Biocatálisis y Tecnología de Enzimas del Instituto de Biotecnología de la UNAM se logró establecer un sistema de síntesis de L-FOS análogo al proceso industrial de producción de I-FOS de origen vegetal, vía hidrólisis de la levana. El procedimiento consiste en sintetizar levana de bajo peso molecular mediante la enzima levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis*, seguida de un proceso de hidrólisis parcial con la endolevanasa LevB₁ de *Bacillus licheniformis* (Porras-Domínguez et al., 2014). Porras-Domínguez, 2018 en su tesis de doctorado, planteó varias estrategias para emplear estas enzimas en la síntesis de L-FOS con el objetivo de hacer el proceso más eficiente. En primer lugar, propuso un sistema de síntesis a partir de sacarosa mediante el uso

simultáneo de ambas enzimas en solución. Para ello definió las condiciones más adecuadas en términos tanto de la actividad de cada una de las dos enzimas, como de la proporción molar de las mismas, de tal forma que se obtuviera un perfil adecuado de L-FOS en tiempos razonables para una adecuada productividad. Fue afortunado el encontrar que el uso de una proporción equimolecular de las enzimas resultaba óptimo para la síntesis. Esto permitió pensar en el diseño de un biocatalizador fusionando ambos genes para dar lugar a una enzima bifuncional. Se diseñó la enzima de fusión LevB₁SacB y se observó que es capaz de producir L-FOS a partir de sacarosa realizando la síntesis de levana y su hidrólisis parcial de forma simultánea.

Una de las desventajas de este proceso, como se señaló con anterioridad, es la presencia de glucosa y fructosa, así como de sacarosa residual como productos secundarios de la reacción, ya que no son deseables en un producto cuya característica es que contenga azúcares complejos (L-FOS) destinados a la dieta. Adicionalmente, al ser un producto destinado al consumo humano es deseable que su síntesis se realice por enzimas producidas por microorganismos GRAS (Generally Recognized As Safe) (Spohner et al., 2015).

Por otro lado, existen antecedentes en la literatura y en el propio laboratorio de Biocatálisis, del uso de la levadura *P. pastoris* para la eliminación de monosacáridos a partir de una mezcla que contiene oligosacáridos (Ávila-Fernández et al., 2011; Meulenbeld et al., 1999; Yang et al., 2008). El proceso permite eliminar estos azúcares mediante su consumo por la levadura para aumentar la biomasa, evitando el consumo de los FOS debido a que *P. pastoris* no posee las enzimas para degradarlos.

Con base en estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo es desarrollar un proceso centrado en la levadura *P. pastoris* tanto como sistema de expresión de proteínas recombinantes, como sistema celular de purificación, de tal forma que incluya: la producción de la enzima de fusión LevB₁SacB, la síntesis de L-FOS mediante la enzima de fusión empleando sacarosa y el consumo de monosacáridos generados durante la reacción, utilizándolos para el crecimiento de *P. pastoris* todo en un solo reactor.

2. ANTECEDENTES

2.1. Fructanas

Las fructanas son polímeros u oligómeros compuestos por unidades de fructosa sintetizados a partir de sacarosa. Estas se clasifican con base en su tipo de enlace en: inulinas, cuando las fructosas se unen mediante enlaces β -2,1; levanas, si se unen mediante enlaces β -2,6 y fructanas mezcladas, aquellas que contienen ambos tipo de enlace (Muñoz-Gutiérrez et al., 2009; Ritsema & Smeekens, 2003; Velázquez-Hernández et al., 2009) (Figura 1). También pueden ser clasificadas de acuerdo al GP que presentan en: polímeros de fructanas, como la inulina o la levana, y FOS si su estructura cuenta de entre 2 y 10 unidades de fructosa (Ko et al., 2019; Porrás-Domínguez et al., 2014).

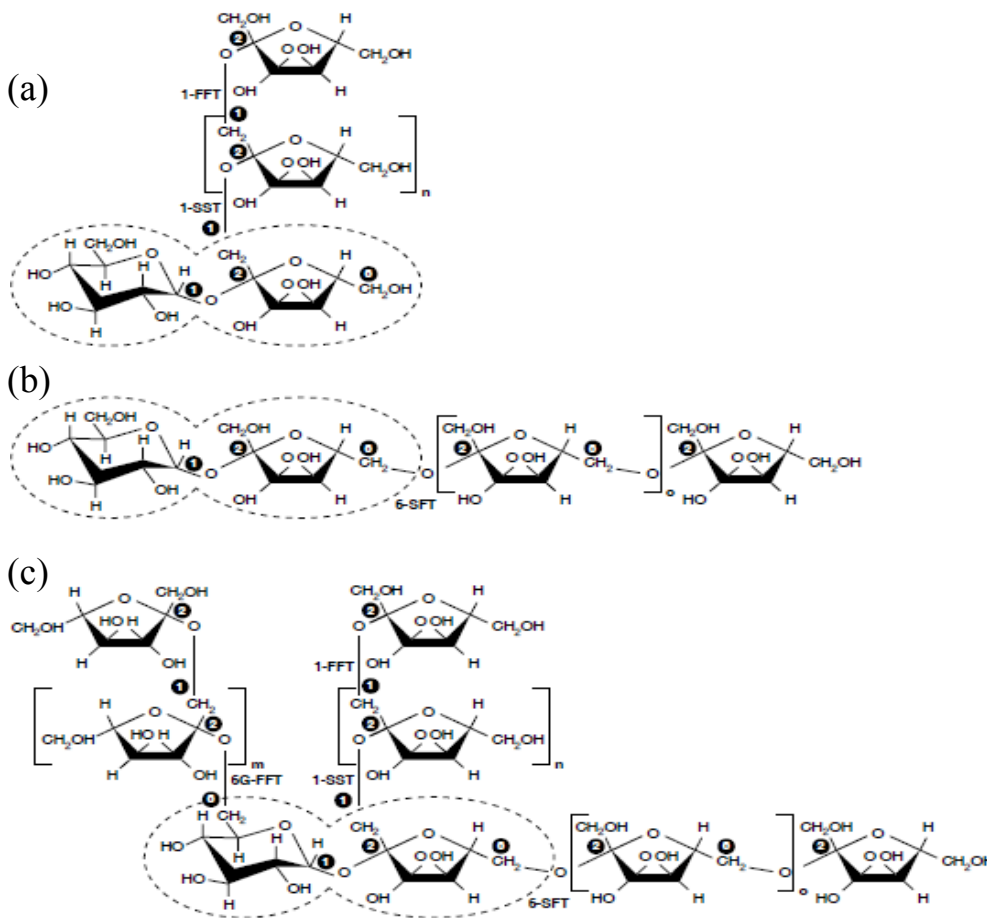


Figura 1. Estructura de diversas fructanas. La sacarosa se encuentra señalada en círculo y se muestra la enzima que en plantas forma cada tipo de enlace. Las fructanas esquematizadas son: (a) inulina, (b) levana y (c) fructana mezclada (Ritsema & Smeekens, 2003)

Estos polímeros son producidos por enzimas denominadas FTFs, presentes en un amplio espectro de bacterias de diferentes géneros, un número limitado de hongos y por aproximadamente el 15 % de especies de plantas (Ávila-Fernández et al., 2007; Franck, 2002; Muñoz-Gutiérrez et al., 2009).

La síntesis de fructanas en plantas se lleva a cabo mediante la acción concertada sobre sacarosa de al menos dos enzimas. En una primera etapa se requiere sintetizar una molécula base a partir de la cual procede la elongación del polímero. La molécula base puede ser 1-kestosa, 6-kestosa, neokestosa o bifurcosa, que en una segunda etapa, mediante la acción de un segundo grupo de enzimas del tipo FTFs se elongan dando lugar a la formación de las diferentes series de fructanas (Vijn & Smeekens, 1999) (Figura 2).

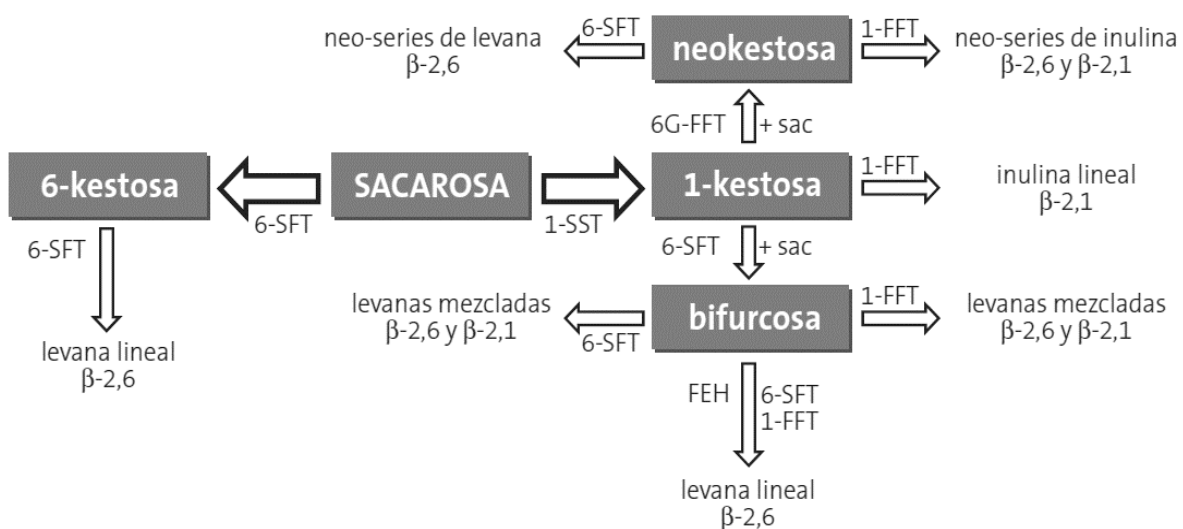


Figura 2. Biosíntesis de fructanas en plantas. Las moléculas base para iniciar la elongación de las diferentes series de fructanas vegetales se encuentran señaladas en los recuadros grises y se muestran las FTFs responsables de la síntesis de los diferentes fructanas (Vijn & Smeekens, 1999)

Contrario a lo que sucede en plantas, en la síntesis de fructanas en microorganismos interviene generalmente una sola enzima de tipo fructosiltransferasa (FTF) que cataliza la transferencia de un grupo fructosil de una molécula donadora (sacarosa) a la fructosa de una molécula aceptora (sacarosa o polímero en crecimiento). Para iniciar la síntesis, la propia sacarosa actúa como

aceptor, siendo elongada sucesivamente vía la transferencia de grupos fructosilo de sacarosas donadoras para dar lugar a la formación de las fructanas. Cabe mencionar que el agua también puede actuar como aceptor del grupo fructosilo, por lo que una fracción de la sacarosa puede ser hidrolizada. Las principales enzimas responsables en bacterias de este proceso son la inulosacarasa y la levansacarasa que sintetizan inulina y levana respectivamente (Porrás-Domínguez, 2012) (Figura 3).

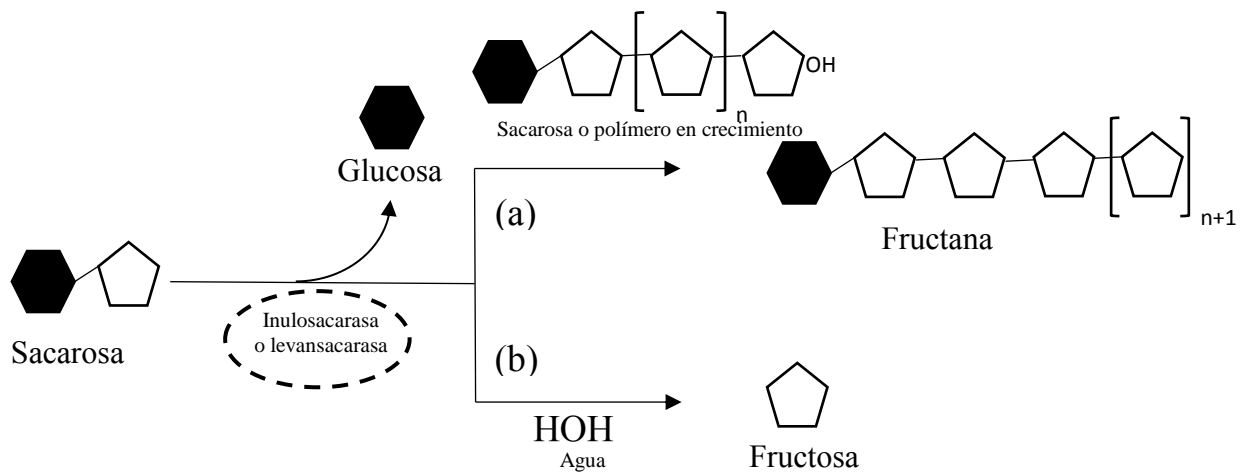


Figura 3. Biosíntesis de fructanas microbiana. Las FTFs empleadas en la síntesis de las fructanas se encuentran señaladas en círculo. (a) Transferencia del grupo fructosil a sacarosa y/o polímero en crecimiento e (b) hidrólisis de la sacarosa

En lo que se refiere a la producción de oligosacáridos, actualmente existen dos procesos para la obtención de I-FOS. El primero se basa en la hidrólisis de inulina de bajo peso molecular extraída de las raíces de achicoria, mediante el uso de enzimas denominadas endoinulinasas que realizan hidrólisis al interior de la cadena de fructana generando I-FOS con un GP de entre 2-9. El segundo método es a través de FTFs de origen fúngico de géneros como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Aureobasidium* que sintetizan directamente I-FOS a partir de sacarosa (Ávila-Fernández et al., 2011; Bali et al., 2015; Franck, 2002; Ganaie et al., 2014; Ko et al., 2019; Lafraya et al., 2011; Nobre et al., 2018; Singh et al., 2016) (Figura 4).

Las fructanas y los I-FOS son ingredientes utilizados en la formulación de alimentos funcionales, particularmente por sus propiedades prebióticas (Ávila-Fernández et al., 2011; Franck, 2002; Lafraya et al., 2011). Estos polímeros u oligómeros no pueden ser hidrolizados por las enzimas del sistema digestivo y llegan hasta el colon donde favorecen selectivamente el crecimiento de bacterias benéficas para el hospedero (*Bifidobacterias* y *Lactobacillus*) (Ávila-Fernández et al., 2011; Gibson et al., 2004; Lafraya et al., 2011; Nobre et al., 2018). Numerosos estudios han demostrado los efectos benéficos que ejercen sobre las funciones gastrointestinales, por ejemplo: prevención de infecciones gastrointestinales, la mejora en la absorción de minerales, la modulación de la secreción de péptidos gastrointestinales o la disminución en la incidencia de cáncer colon-rectal, entre otros (Roberfroid, 2007).

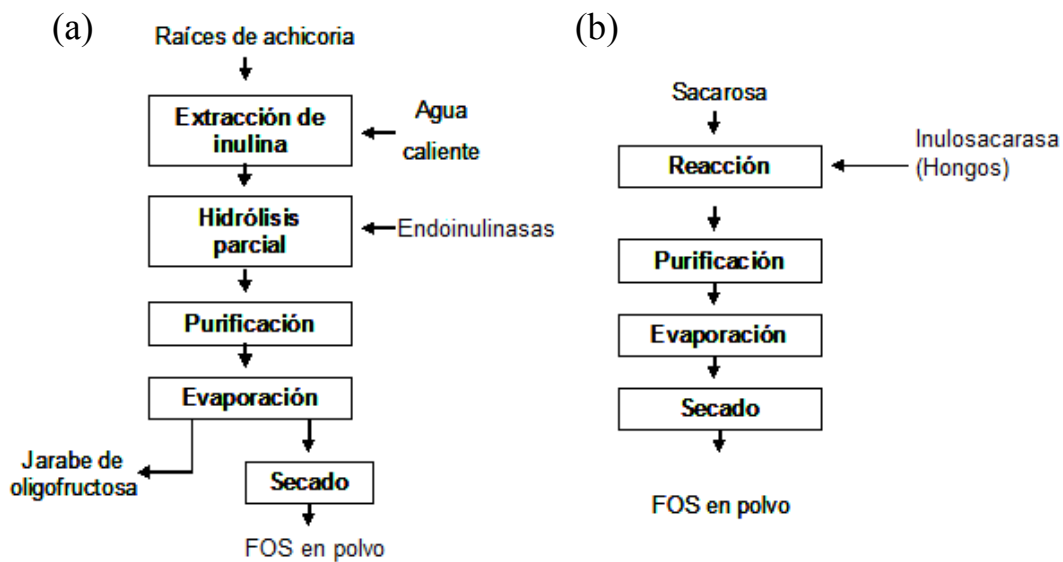


Figura 4. Diagrama que describe las etapas principales de los procesos industriales para la producción de I- FOS. (a) Mediante hidrólisis de inulina y (b) síntesis a partir de sacarosa (Porras-Domínguez, 2012)

Existe otro tipo de FOS en los que las fructosas se encuentran unidas mediante enlaces tipo β -2,6 (L-FOS). Solo hasta años recientes se ha demostrado que los L-FOS también tienen propiedades prebióticas (Porras-Domínguez et al., 2014). Sin embargo, no se ha reportado ninguna enzima del

tipo FTFs capaz de sintetizarlos directamente como lo hacen las FTFs fungales con los I-FOS. Tampoco se ha logrado modificar la especificidad de las levansacarosas mediante mutagénesis sitio dirigida para lograr este fin, aunque se han reportado diversos esfuerzos en esta dirección (Ortiz-Soto et al., 2008). Una alternativa para la producción de este tipo de compuestos es contar con un proceso análogo a la producción de I-FOS, es decir, mediante hidrólisis del polímero (levana) empleando enzimas de tipo endo. En 2014, Porras-Domínguez et al., reportaron un proceso secuencial de producción de L-FOS que implicaba primeramente la síntesis de levana de bajo peso molecular mediante el uso de la levansacarasa SacB de *B. subtilis*, su recuperación por precipitación con etanol y su posterior hidrólisis empleando la endolevanasa LevB₁ de *B. licheniformis* y finalmente, la recuperación de los L-FOS sintetizados en el medio de reacción (Figura 5).

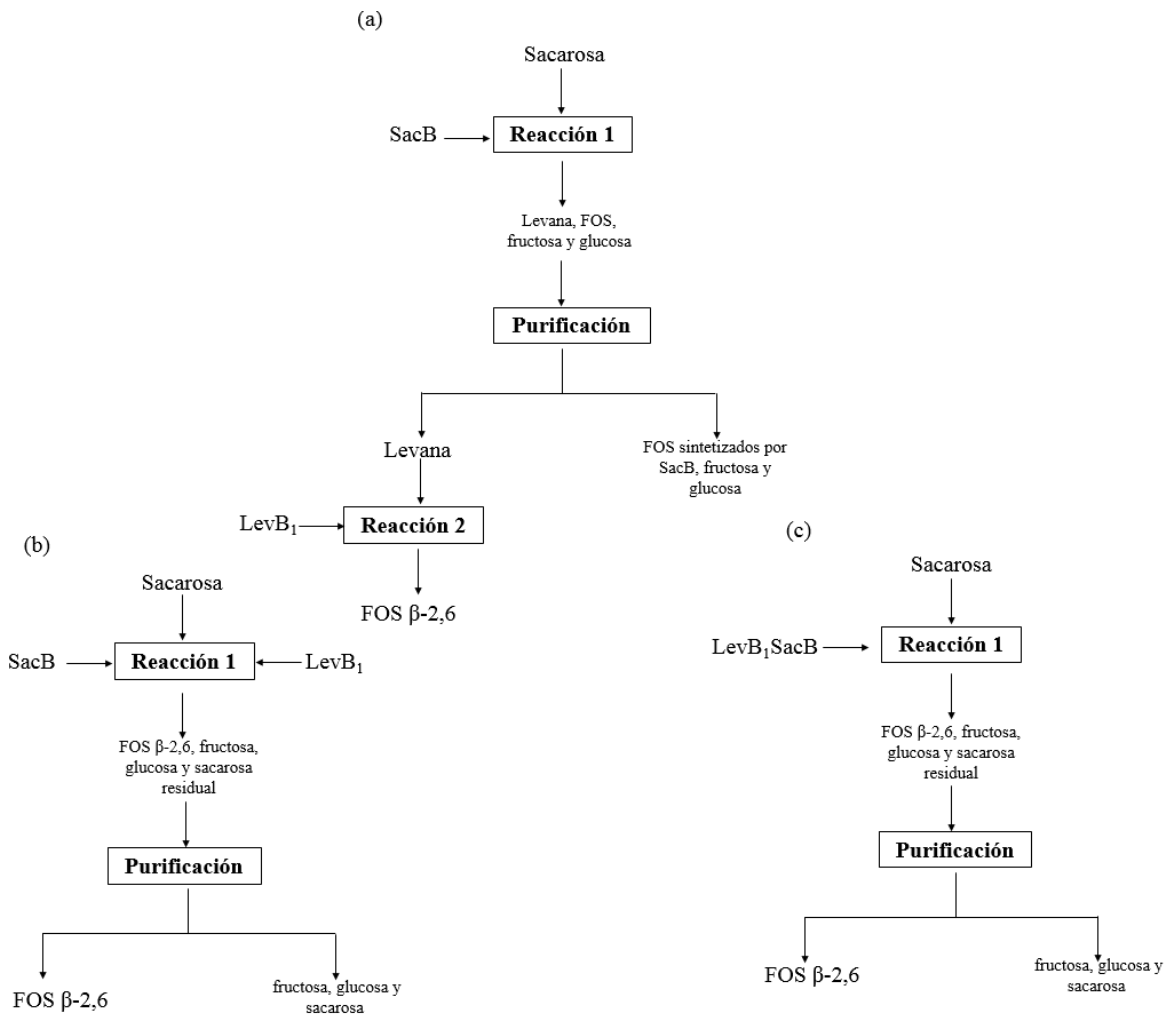


Figura 5. Diagrama que describe las etapas principales de los procesos propuestos para la producción de L-FOS. (a) Sistema secuencial, (b) sistema simultáneo y (c) biocatalizador de fusión (Porras-Domínguez et al., 2017)

Con el objetivo de contar con un proceso más eficiente, estos autores estudiaron la posibilidad de realizar las dos reacciones de manera simultánea, es decir, llevar a cabo una síntesis bi-enzimática de L-FOS a partir de sacarosa (Figura 5). Se encontró que utilizando concentraciones equi-molares (1 μ M) de ambas enzimas, se logra la síntesis de L-FOS con un GP menor a 10, obteniendo 235 g/L de este tipo de compuestos a partir de 600 g/L de sacarosa en 6 h. Dentro del perfil de los L-FOS producidos destacan los disacáridos levanobiosa y la blastosa como principales productos. Para dar continuidad a este estudio, se realizaron ensayos de inmovilización de ambas enzimas, encontrando diversas dificultades para inmovilizar la endolevanasa LevB₁, ya que resulta ser inestable desactivándose al emplear los métodos clásicos de inmovilización covalente o iónica. Por esta razón, se decidió explorar el diseño de un biocatalizador fusionando ambas enzimas (LevB₁SacB), opción que resultó ser muy ventajosa, ya que da lugar a un perfil de L-FOS muy similar al obtenido en el sistema simultáneo con las enzimas independientes, con valores idénticos en la cantidad de producto, de alrededor de 246 g/L y los mismos disacáridos (levanobiosa y la blastosa) como principales productos de reacción. La única desventaja de emplear el biocatalizador bifuncional LevB₁SacB, es la necesidad de realizar la síntesis directa a partir de sacarosa, generando los azúcares reductores correspondientes como subproductos (Porras-Domínguez et al., 2017) (Figura 5).

2.2. Enzima de fusión LevB₁SacB

La enzima de fusión LevB₁SacB está formada por la levansacarasa SacB de *B. subtilis* y la endolevanasa LevB₁ de *B. licheniformis* unidas mediante un *linker* (péptido de unión) de 6 aminoácidos (Porras-Domínguez et al., 2017).

La levansacarasa SacB de *B. subtilis*, es una enzima unidominio clasificada dentro de la familia 68 de las glicosilhidrolasas (GH68). La estructura cristalográfica de esta proteína muestra un plegamiento tipo β -propela de cinco hojas que adoptan una topología en “ ω ” de 4 hebras antiparalelas, que se encuentran circundando una cavidad central en forma de embudo donde se une el sustrato (Figura 6). El sitio catalítico lo conforman dos ácidos aspárticos (D86 y D247) y un ácido glutámico (E342) que participan directamente en el mecanismo de reacción descrito como

Ping-Pong y que involucra la participación de un intermediario covalente fructosil-enzima (Meng & Fütterer, 2003)

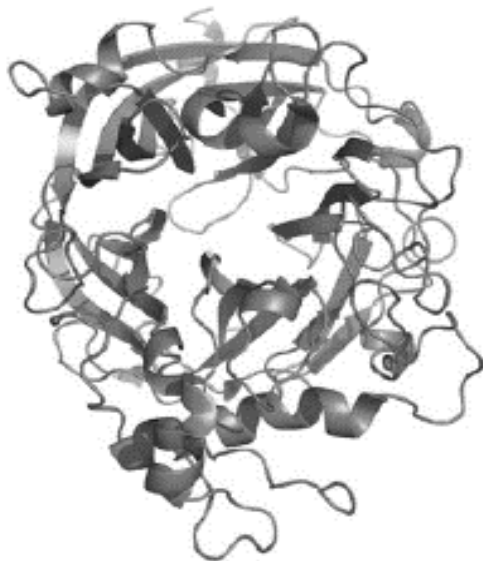


Figura 6. Estructura de la levansacarasa SacB de *B. subtilis*. Se muestra el dominio β -propela que compone a la levansacarasa (Porrás-Domínguez, 2018)

Por otro lado, la endolevanasa LevB₁ de *B. licheniformis*, es una enzima multi-dominio clasificada dentro de la familia 32 de las glicosilhidrolasas (GH32). Esta enzima posee una estructura compuesta por 2 dominios: un primer dominio localizado en el extremo N-terminal, que consta de un plegamiento tipo β -propela compuesto por 5 hojas, las cuales poseen 4 hojas β -antiparalelas y un segundo dominio localizado en el extremo C-terminal que consta de un plegamiento β -sándwich, formado por dos arreglos de seis hojas β -antiparalelas (Porrás-Domínguez, 2018) (Figura 7). El sitio catalítico se localiza en el dominio β -propela, y al igual que la levansacarasa SacB de *B. subtilis*, contiene 3 aminoácidos en este sitio catalítico, dos ácidos aspárticos y un ácido glutámico que están involucrados directamente en el mecanismo de reacción.

En el diseño propuesto por Porrás-Domínguez et al., 2017, se interpuso el dominio no catalítico de LevB₁ (β -sándwich) entre los dominios β -propela, que son los catalíticos de las dos enzimas,

generando una nueva proteína de fusión denominada LevB₁SacB. El gen que codifica para la enzima fue sintetizado por GenScript USA Inn, clonado en el plásmido pET22b (+) entre los sitios de restricción NdeI y Xho y expresados en cepas de *E. coli* Rosetta 2. LevB₁SacB fue purificada mediante cromatografía de intercambio catiónico y empleada para llevar a cabo estudios enzimáticos de síntesis de L-FOS a partir de sacarosa.

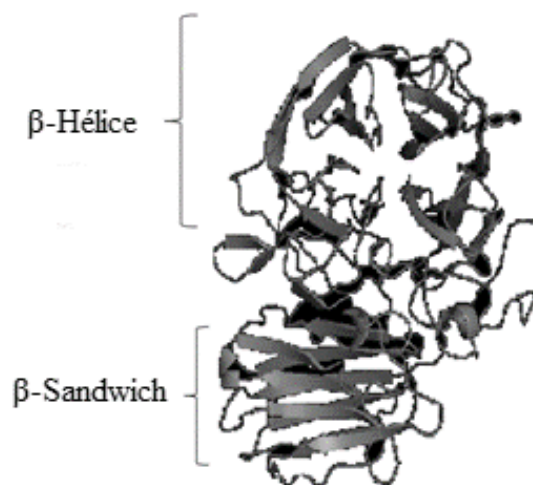


Figura 7. Modelo de la endolevanasa LevB₁ de *B. licheniformis*, creado por homología empleando el servidor ITASSER, a partir de alineamientos con enzimas de la familia GH32, minimizadas con el servidor YASARA. Se muestra los dominios que conforman la endolevanasa (Porrás-Domínguez, 2018)

Después de explorar diversas condiciones de reacción, se encontró que una forma eficiente de producir los L-FOS consiste en realizar reacciones empleando 600 g/L de sacarosa, 10 U/mL de LevB₁SacB medidas como levansacarasa a 37 °C y pH 6 (condiciones óptimas de actividad de ambas enzimas). En esas condiciones, después de 6 h de reacción se alcanza un rendimiento de 41 % que corresponde a 246 g/L de producto, acompañado de sus respectivos subproductos de reacción: glucosa (234 g/L), fructosa (54 g/L) y sacarosa (65 g/L). En este proceso de síntesis de L-FOS es importante mencionar dos aspectos de suma importancia: a) la conversión de sacarosa es de aproximadamente 90 % debido a una inhibición de la actividad de la enzima por la

concentración de glucosa generada durante la síntesis de L-FOS y b) a tiempos de reacción por arriba de las 6 h con esta actividad enzimática, se observa el inicio de una etapa de hidrólisis de los L-FOS, lo que repercute en el perfil de los productos, elemento fundamental para su función como prebiótico.

En lo que al perfil de L-FOS se refiere, se demostró que está compuesto de oligosacáridos pequeños (GP de entre 2 y 10) en el que predominan los disacáridos levanobiosa y blastosa. En la Figura 8 se muestra cómo evoluciona la síntesis de estos oligosacáridos durante la síntesis. En el laboratorio Biocatálisis y Tecnología de Enzimas del Instituto de Biotecnología de la UNAM se han producido ya varios lotes de L-FOS para su evaluación prebiótica en simuladores del sistema gastro-intestinal (colaboración con el CIATEJ). Sin embargo, se requiere de un proceso de purificación para remover monosacáridos libres (glucosa, fructosa), así como sacarosa residual, que afectan el carácter prebiótico y por lo tanto la calidad de los L-FOS.

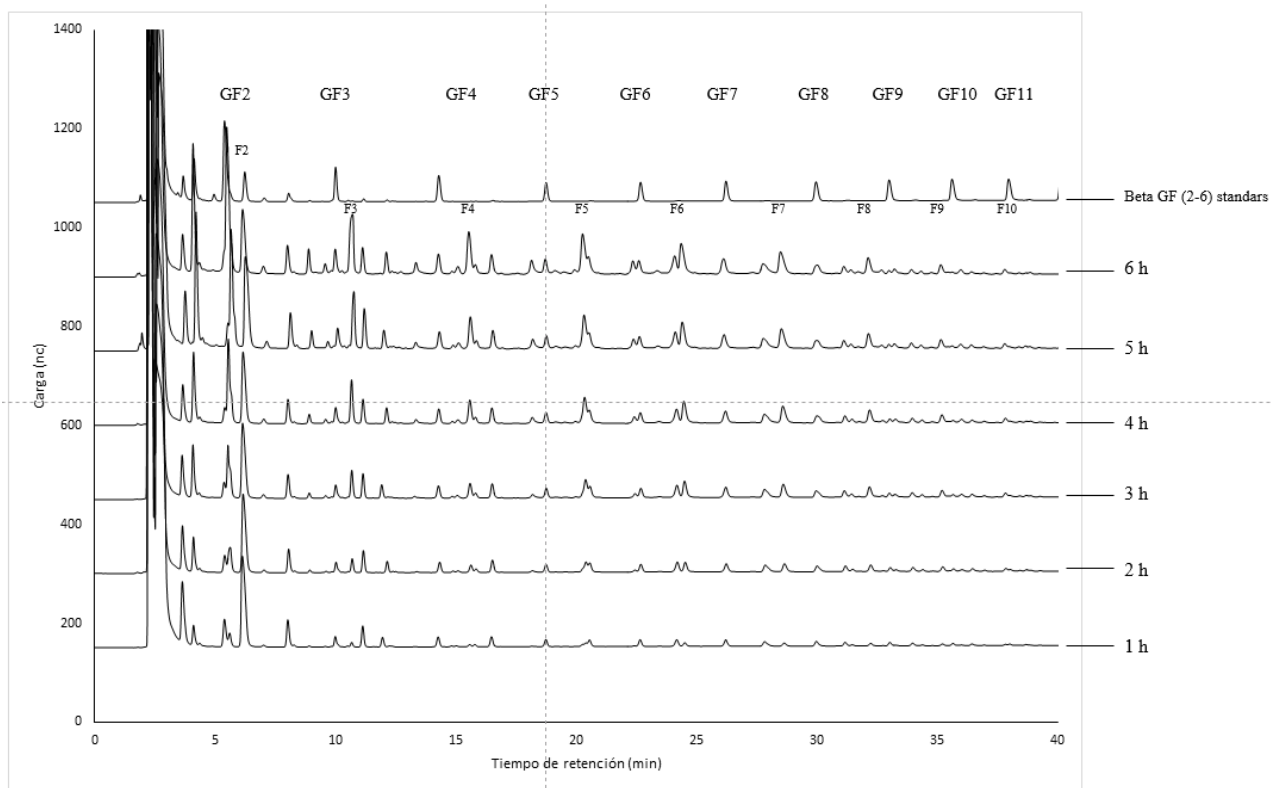


Figura 8. Evolución del perfil de L-FOS producidos durante la síntesis con LevB₁SacB (7.5 U/mL), empleando 600 g/L de sacarosa a pH 6, 37 °C y 300 rpm, en un volumen de reacción de 1.7 L. Los L-FOS se analizaron mediante HPAEC-PAD (Porrás-Domínguez et al., 2017)

Existen métodos para separar FOS de mezclas que contienen monosacáridos basados principalmente en procesos de ultra- o nano-filtración con membranas o mediante cromatografía empleando resinas de intercambio catiónico (Ávila-Fernández et al., 2011; Nobre et al., 2018; Porras-Domínguez et al., 2019; Singh et al., 2016; Yang et al., 2008). Recientemente, en el grupo de trabajo, se reportó un proceso de purificación de L-FOS, empleando un método químico, que consiste, en eliminar glucosa y fructosa en su forma β -piranosa formando complejos con el ácido fenil borónico seguido de una extracción de los complejos con acetato de etilo (Porras-Domínguez et al., 2019). Este método, aunque eficiente trae consigo muchas desventajas, debido a que es un proceso químico que implica el uso de compuestos poco aceptados en la industria alimentaria.

Una alternativa a los métodos de purificación de FOS antes descritos, es el uso de métodos biológicos, que prometen ser más fácilmente aceptadas en el ámbito regulatorio. En efecto, existen varias propuestas basadas en el uso de microorganismos que lleven a cabo un consumo selectivo de los azúcares contaminantes de un determinado producto sin afectarlo. Se trataría entonces de llevar a cabo un cultivo, que sería al mismo tiempo una purificación, una vez retirada la biomasa y consumidos los azúcares contaminantes (Ávila-Fernández et al., 2011; Nobre et al., 2018; Yang et al., 2008). En este sentido, una opción es emplear métodos simultáneos de producción (síntesis enzimática) y purificación de los FOS sintetizados mediante el cultivo de las células apropiadas.

Tal es el caso de síntesis de inulin-FOS a partir de sacarosa mediante FTFs de origen fungal y eliminación de la glucosa producida mediante oxidación con la enzima glucosa oxidasa o mediante su consumo con sistemas celulares (principalmente levaduras, como *S. cerevisiae*, con mutaciones en el gen que codifica para la enzima invertasa) (Ko et al., 2019; Nobre et al., 2016, 2018). Un estudio más reciente demostró que es posible emplear una levadura recombinante que secreta la FTFs al medio de reacción, para que lleve a cabo la síntesis de I-FOS a partir de sacarosa, al mismo tiempo que el microorganismo disminuya los niveles de glucosa generada como subproducto de reacción (Ko et al., 2019). Se empleó para ello a *S. cerevisiae* deficiente en la enzima invertasa (2805 Δ gal80 Δ suc2) para expresar y secretar constitutivamente a la inulosacarasa de *Lactobacillus reuteri* (LrInu Δ NC, 166-699 aminoácidos) empleando el vector YGaT que se encuentra bajo el control del promotor GAL10 y que contiene el péptido señal pre-pro α -MF de *S. cerevisiae*. Las condiciones óptimas de producción de I-FOS a nivel biorreactor se lograron empleando 300 g/L

de sacarosa en un volumen de reacción de 2.5 L. Con esta concentración de sustrato se produjo 128.4 g/L de I-FOS con un GP de entre 2 y 20 y con una pequeña cantidad de glucosa (5.9 g/L), fructosa (13.2 g/L) y sacarosa residual (11.3 g/L) después de transcurridas 36 h de cultivo. Comparando la producción microbiana de I-FOS empleando la levadura recombinante con la síntesis enzimática utilizando LrInu Δ NC pura, se puede destacar que en el primer sistema no se acumula una alta concentración de glucosa en el medio de cultivo, mientras que en el segundo sistema toda la glucosa liberada alcanza alrededor de 140 g/L. Con este estudio los autores concluyeron que la producción microbiana de I-FOS empleando la levadura recombinante puede consumir eficientemente la mayor parte de la glucosa generada durante la reacción, mejorando el rendimiento y pureza del producto.

2.3. *P. pastoris* como un sistema de producción de proteínas recombinantes

P. pastoris es una levadura metilotrófica que se desarrolló como un sistema de producción de proteínas recombinantes en los años ochenta. Constituye un excelente modelo para la expresión de proteínas heterólogas, por que posee muchas ventajas respecto a otros sistemas de expresión (Ahmad et al., 2014; Cereghino & Cregg, 2000; Macauley-Patrick et al., 2005; Spohner et al., 2015). Dos de las características principales por las que se ha empleado esta levadura como un buen modelo biológico son la disponibilidad de promotores fuertes (constitutivos e inducibles) (Ahmad et al., 2014; Cereghino & Cregg, 2000; Cregg et al., 2000) y la fuerte preferencia por crecimiento respiratorio, un rasgo fisiológico clave que facilita en gran medida su cultivo a altas densidades celulares (Cereghino & Cregg, 2000; Cregg et al., 2000). Además, *P. pastoris* posee otros componentes que se suman a los ya mencionados:

(1) la capacidad de secretar las proteínas recombinantes ya procesadas al medio de cultivo (Ahmad et al., 2014; Damasceno et al., 2012; Spohner et al., 2015);

(2) los bajos niveles de secreción al medio de cultivo de proteínas endógenas (Cregg et al., 2000; Macauley-Patrick et al., 2005);

(3) el no producir endotoxinas y poder considerarse como un microorganismo seguro (GRAS) (Ahmad et al., 2014; Damasceno et al., 2012; Spohner et al., 2015);

(4) el permitir un mejor plegamiento de proteínas (Cereghino & Cregg, 2000; Macauley-Patrick et al., 2005);

(5) el realizar modificaciones postraduccionales simples (Cereghino & Cregg, 2000; Macauley-Patrick et al., 2005).

Dentro de la gran cantidad de proteínas que se han expresado en este hospedero, pocos son los ejemplos de enzimas recombinantes similares a las que se emplean en esta propuesta. Destacan sin embargo, las levansacarasas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Trujillo et al., 2001), de *Leuconostoc mesenteroides* (Kang et al., 2011) y exolevanasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Menéndez et al., 2004), que se resumen a continuación. Para la expresión de la levansacarasa LsdA de *G. diazotrophicus* se utilizó la cepa *P. pastoris* GS115 (*his4*) y el vector de integración pHIL-SI que se encuentra bajo el control del promotor inducible pAOX1 que además contiene el péptido señal de la fosfatasa ácida de *P. pastoris* (PHO1) para secretar la proteína al medio de cultivo. Después del proceso de fermentación a nivel biorreactor, se detectó LsdA activa tanto en la fracción periplasmática, alrededor de 81 % (3500 U/L), como en el sobrenadante de cultivo, el 18 % restante, equivalente a 740 U/L. Estos resultados corresponden a la integración de una sola copia en el genoma de la levadura. Otro aspecto importante a mencionar es que *P. pastoris* realiza modificaciones postraduccionales, por lo que también se revisó esta posibilidad, encontrando que LsdA posee 3 sitios potenciales de N-glicosilación de acuerdo con la secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr (N-X-S/T), donde Xaa no es prolina. Se llevó cabo una desglicosilación *in vitro* empleando la enzima endoglicosidasa H, para comprobar que efectivamente se trataba de una glicosilación de tipo N, demostrando que la LsdA producida se glicosila. Por otro lado, para la expresión de la levansacarasa M1FT de *L. mesenteroides* se utilizó la cepa *P. pastoris* GS115 (*his 4*) y el vector de integración pPIC9K que se emplea para generar transformantes multicopia bajo el promotor inducible por metanol (pAOX1) fusionado al péptido señal pre-pro α -MF de *S. cerevisiae*. PM1FT-5 resultó ser la clona seleccionada, reportándose una acumulación de proteína dentro de las células equivalente a 22,000 U/L, mientras que el rendimiento máximo en el sobrenadante de cultivo fue de 14,400 U/L. Al igual que en el caso anterior, la M1FT fue glicosilada en sus dos sitios potenciales de N-glicosilación.

Finalmente, un ejemplo más cercano a la propuesta de este proyecto es la producción de la exolevanasa LsdB de *G. diazotrophicus*, para cuyo estudio se empleó la cepa *P. pastoris* X-33 y los vectores de integración pPICZ α C y pGAPZ α C, que se encuentran bajo el control del promotor pAOX1 y el promotor constitutivo pGAP, respectivamente. Ambos vectores comparten una serie de elementos similares: poseen una señal de secreción en el extremo 5' del gen de interés, al factor α -MF de *S. cerevisiae*, tienen un marcador de selección basado en el gen *Shble* (Zeo^R) de *Streptoalloteichus hindustanus*, el cual le confiere resistencia al antibiótico zeocina y en el extremo 3' contiene la secuencia nucleotídica que codifica para una etiqueta de 6 histidinas. Los niveles de producción de LsdB usando el promotor pGAP fueron similares a los obtenidos por el promotor pAOX1. La actividad levanasas reportada usando cada uno de estos promotores fue de 26.6 U/mL para el promotor pGAP y 21.1 U/mL para el promotor pAOX1, mientras que la productividad fue de 682 y 220 U/L.h respectivamente. Esto indica que la producción de la enzima ocurrió más eficientemente para el sistema de expresión constitutivo que el sistema de expresión inducible en el presente sistema. Además, se logró determinar que aproximadamente el 95 % de la LsdB producida fue secretada al sobrenadante de cultivo. En cuanto a las modificaciones postraduccionales que puede sufrir la proteína, en este caso, a pesar de existir los sitios potenciales de N-glicosilación en la secuencia de aminoácidos, la proteína no fue glicosilada.

2.4. *P. pastoris* como método biológico de purificación de FOS

La levadura *P. pastoris* ha sido utilizada para eliminar monosacáridos en presencia de sacarosa dada su capacidad de emplear glucosa y fructosa como fuente de carbono, pero no sacarosa dada la ausencia de actividad invertasa (Ávila-Fernández et al., 2011). Meulenbeld et al., 1999, emplearon a *P. pastoris* adicionada al medio de reacción para eliminar fructosa y evitar la inhibición de la actividad transglicosilasa de la glucosiltransferasa de *Streptococcus mutans*. Por otro lado, Yang et al., 2008, emplearon a *P. pastoris* como un tratamiento biológico en la purificación de FOS, diseñando un proceso de síntesis de FOS a partir de sacarosa empleando una β -fructofuranosidasa de *Aspergillus japonicus* en un medio de reacción al que adicionaron células de *P. pastoris* para consumir selectivamente glucosa y minimizar la inhibición de la enzima por este sustrato durante la síntesis de FOS. En nuestro grupo de trabajo, Ávila-Fernández et al. 2011,

usaron *P. pastoris* para eliminar los monosacáridos subproductos de la hidrólisis ácida de fructanas de agave, demostrando que esta levadura es capaz de consumir fructosa y glucosa, sin modificar o consumir sacarosa o FOS como fuente de carbono.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de FOS para la producción de alimentos funcionales ha ido en aumento debido principalmente a las propiedades prebióticas que poseen. Estas propiedades se ven afectada por la presencia de monosacáridos (glucosa y fructosa) y sacarosa que se originan durante los procesos de obtención, ya sea por hidrólisis de polisacáridos o por síntesis con glicosiltransferasas a partir de sacarosa. Por esta razón diversos grupos de investigación han explorado estrategias para separar los FOS de estos coproductos. El presente proyecto explora una propuesta de producción y purificación parcial de L-FOS en un solo reactor, empleando un microorganismo recombinante que permita por un lado la expresión y secreción de la enzima responsable de la síntesis y, por otro lado, el consumo de los subproductos derivados de la actividad enzimática

4. HIPÓTESIS

Es posible desarrollar un sistema de cultivo de *P. pastoris* en el que simultáneamente se induzca la expresión y secreción de la enzima de fusión LevB₁SacB, se lleve a cabo la reacción de síntesis de L-FOS a partir de sacarosa y se consuman los monosacáridos coproductos de reacción.

5. OBJETIVOS

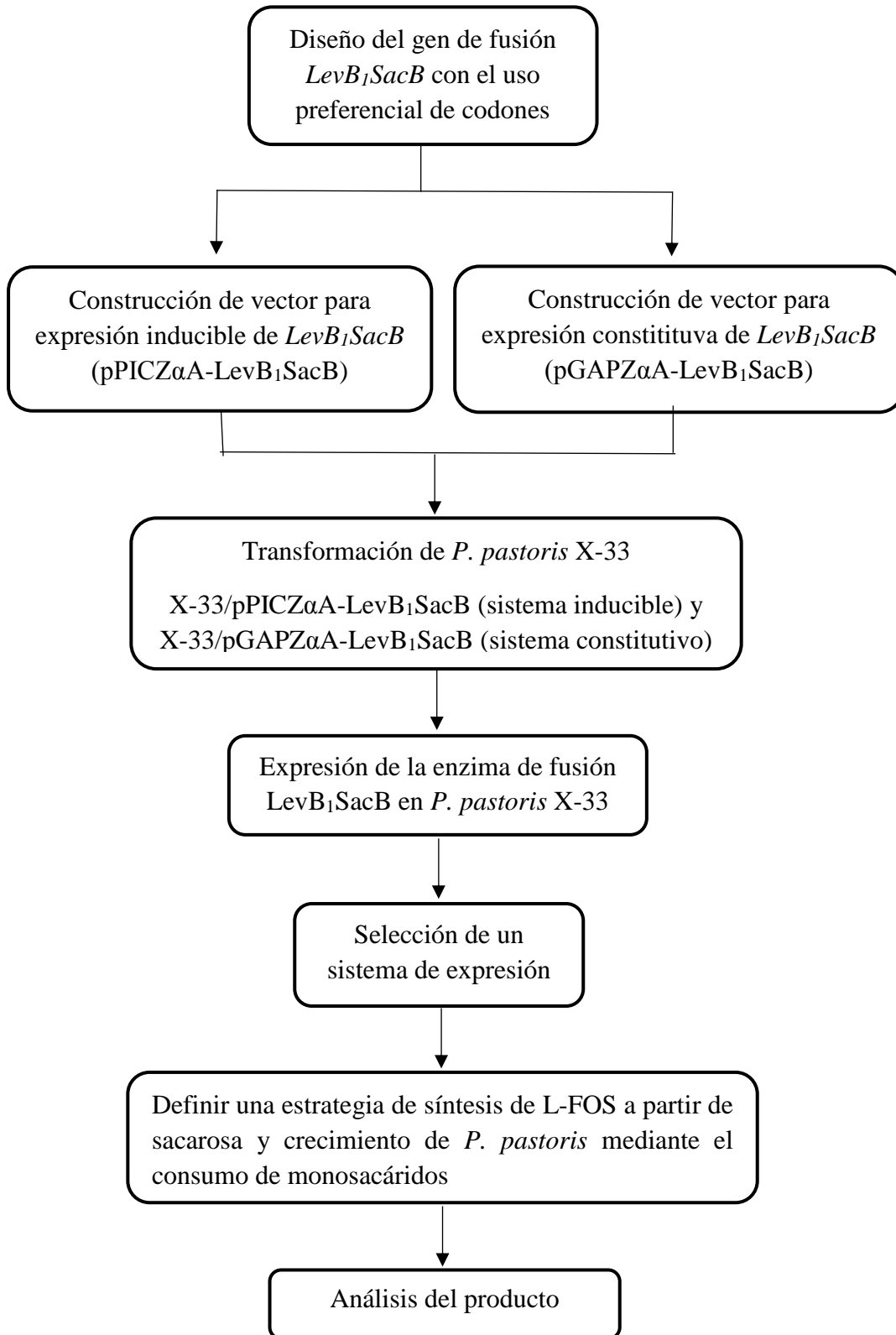
5.1. Objetivo general

Estudiar la factibilidad de llevar a cabo simultáneamente la expresión y secreción al medio de cultivo de la enzima LevB₁SacB, la producción de L-FOS en el mismo medio a partir de sacarosa y la eliminación de los monosacáridos coproducidos por la actividad enzimática empleando la levadura *P. pastoris*.

5.2. Objetivos particulares

- Diseñar y sintetizar el gen *LevB₁SacB* con el uso preferencial de codones de *P. pastoris*.
- Construir los vectores pPICZ α A-LevB₁SacB y pGAPZ α A-LevB₁SacB, el primero bajo el control del promotor inducible pAOX1 y el segundo bajo el control del promotor constitutivo pGAP
- Realizar ensayos de expresión para seleccionar las mejores clonas productoras de la enzima de fusión LevB₁SacB.
- A nivel matraz y biorreactor de 1 L, estudiar la factibilidad de producir L-FOS a partir de sacarosa mediante el empleo de la enzima LevB₁SacB expresada y secretada por *P. pastoris* y simultáneamente eliminar monosacáridos no deseados mediante su consumo por la misma levadura.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo

7.1.1. Cepas comerciales

La cepa *E. coli* Top 10 (Invitrogen, CA, USA) se utilizó como cepa de mantenimiento y propagación de los vectores pPICZ α A, pGAPZ α A (Invitrogen, CA, USA), pPICZ α A-LevB₁SacB y pGAPZ α A-LevB₁SacB.

P. pastoris X-33 (Invitrogen, CA, USA) se empleó como huésped de expresión de los vectores pPICZ α A, pGAPZ α A, pPICZ α A-LevB₁SacB y pGAPZ α A-LevB₁SacB.

7.1.2. Vectores de expresión

Los vectores pPICZ α A, pGAPZ α A fueron utilizados para elaborar las cepas control. Los vectores pPICZ α A-LevB₁SacB y pGAPZ α A-LevB₁SacB que contienen la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína de fusión LevB₁SacB reportada por Porras-Domínguez, 2017 fueron sintetizados por GenScript USA Inc con el uso preferencial de codones de *P. pastoris*.

7.1.3. Medios de cultivo

YPDS agar: El medio YPDS es un medio complejo que contiene 10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 20 g/L glucosa, 182 g/L sorbitol y 20 g/L agar.

YPD agar: El medio YPD es un medio complejo que contiene 10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 20 g/L glucosa y 20 g/L agar.

MM agar: El medio MM es un medio mínimo que contiene 13.4 g/L de base nitrogenada para levadura con sulfato de amonio y aminoácidos (YNB), 20 g/L de agar, 5 mL/L de metanol y biotina 4×10^{-4} g/L.

MD agar: El medio MM es un medio mínimo que contiene 13.4 g/L de YNB, 20 g/L de agar, 20 g/L glucosa y biotina 4×10^{-4} g/L.

BM-Y: El medio BM-Y es un medio complejo amortiguado compuesto por 10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 13.4 g/L de YNB, biotina 4×10^{-4} g/L y 0.1 M de amortiguador de fosfatos, pH 6.

7.2. Evaluación de los sistemas de expresión inducible y constitutivo de *P. pastoris* para la producción de la enzima de fusión LevB₁SacB

7.2.1. Transformación de células de *P. pastoris*

Los vectores pPICZ α A-LevB₁SacB y pGAPZ α A-LevB₁SacB se linearizaron con las enzimas de restricción, Sac I y Avr II, respectivamente. Se introdujeron por electroporación en 80 μ L de células electrocompetentes de *P. pastoris* X-33. Las células se recuperaron en sorbitol 1 M y se incubaron durante 2 h a 28 °C sin agitación. Las transformantes se seleccionaron por resistencia a zeocina en placas de agar YPDS con zeocina 100 μ g/mL. Una vez crecidas las colonias, se transfirieron por estrías a placas de YPD con zeocina 100 μ g/mL.

7.2.2. Preservación de cepas de *P. pastoris* transformadas

Se seleccionó una colonia de *P. pastoris* recién transformada X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB y X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB para inocular 3 mL de medio YPD con zeocina 100 μ g/mL en un tubo de cultivo de 20 mL y se incubó 24 h a 28 °C y 200 rpm. Transcurrido el tiempo se tomó un pequeño volumen del cultivo como inóculo para 5 mL de medio YPD con zeocina 100 μ g/mL e iniciar a una OD₆₀₀ de 0.01 en un matraz de 125 mL, este cultivo se incubó bajo las condiciones ya descritas. Se hicieron alícuotas del cultivo en glicerol al 40 % (v/v) para mantenerlas y resguardarlas a -70 °C.

7.2.3. Expresión de la enzima de fusión LevB₁SacB en *P. pastoris*

Se preparó un pre-inóculo por siembra en agar YPD con zeocina 100 μ g/mL a partir de un resguardo congelado para las clonas X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB y X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB y se incubó durante 96 h a 28 °C. Posteriormente se inoculó con una colonia un tubo de 20 mL con 3 mL de medio YPD con zeocina 100 μ g/mL y se incubó 24 h a 28 °C y 200 rpm. Para la clona X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB se tomó un pequeño volumen del cultivo para inocular un

matraz de 125 mL con 25 mL de medio BM-Y glicerol 1 % (v/v) e iniciar con una OD₆₀₀ de 0.1, se incubó a 28 °C y 200 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 2. Las células se cosecharon por centrifugación a temperatura ambiente y 4925 rpm durante 5 min y se lavaron dos veces en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 6. El botón celular se resuspendió en 50 mL del medio de inducción BM-Y metanol 0.5 % (v/v) para iniciar con una OD₆₀₀ de 1, en un matraz de 250 mL. La incubación se continuó a las mismas condiciones durante 120 h, añadiendo metanol cada 24 h a una concentración final de 0.5 % (v/v). Por otro lado, para la clona X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB se tomó un pequeño volumen del cultivo como inóculo para 50 mL de medio BM-Y glucosa 2 % (p/v) e iniciar con una OD₆₀₀ de 0.1, en un matraz de 250 mL, este cultivo se incubó a 28 °C y 200 rpm durante 120 h. En ambas fermentaciones se midió diariamente el crecimiento (OD₆₀₀), pH y la actividad enzimática (levansacarasa y endolevanasa).

7.3. Caracterización enzimática de LevB₁SacB

7.3.1. Ensayo de actividad enzimática

Se midió la velocidad inicial de liberación de poder reductor del sustrato hidrolizado mediante la técnica de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) (Miller, 1959). La actividad levansacarasa SacB de la enzima de fusión LevB₁SacB se determinó a condiciones de saturación de la enzima (100 g/L de sacarosa) a pH 6 en amortiguador de acetato de sodio 50 mM con 1 mM CaCl₂ a 37 °C y 500 rpm, en un volumen de reacción de 600 µL. Una unidad de actividad levansacarasa se define como la cantidad de enzima requerida para obtener un µmol de fructosa y glucosa por minuto. Por otro lado, la actividad endolevanasa LevB₁ se determinó empleando 10 g/L de levana SacB de bajo peso molecular (8.3 kDa), producida por el método descrito por Porras-Domínguez et al., 2015 a pH 6 en amortiguador de acetato de sodio 50 mM a 37 °C y 500 rpm, en un volumen de reacción de 500 µL. Una unidad de actividad endolevanasa se define como la cantidad de enzima requerida para obtener un µmol de equivalentes fructosa por minuto.

7.3.2. Cuantificación de proteína

Se cuantificó la proteína soluble mediante el sistema Protein Assay (Bio-Rad) basado en el método de Bradford, 1976. La proteína soluble presente en las muestras analizadas se determinó en un volumen final 500 μL a partir de la interacción entre 100 μL del reactivo Bio-Rad Protein Assay Dye y 400 μL de muestras en dilución (medidas de DO_{595} de entre 0.1 y 0.9). Para calcular la concentración de proteína se empleó una curva de calibración de albúmina bovina (BSA) de 0 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

7.4. Análisis de proteínas

7.4.1. Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Las proteínas presentes en el medio de cultivo, en el extracto intracelular y restos celulares para las transformantes X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB y X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en geles de acrilamida al 10 %. Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga sin β -mercaptoetanol, calentando a ebullición durante 5 min. La electroforesis se desarrolló a 10 mA durante aproximadamente 5 h. Los geles se tiñeron con el reactivo Gel Blue Stain Reagent (Thermo Scientific) durante 18 h y se destiñeron con agua destilada.

7.4.2. Zimogramas

Con el objetivo de observar la actividad levansacarasa y endolevanasa de la enzima de fusión (LevB₁SacB) en geles de poliacrilamida, se prepararon geles al 10 %, como se menciona en la sección anterior. En el caso de la actividad endolevanasa se adicionó levana SacB de bajo peso molecular (8.3 kDa) a una concentración final de 1 % (p/v). Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga sin β -mercaptoetanol, la electroforesis se desarrolló aproximadamente durante 5 h. Se recuperan los geles y con el objetivo de renaturalizar las enzimas se incubaron en una solución de Tween 80 al 1 % (v/v) en amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 6, este procedimiento se realiza 3 veces con duración de 30 min. Para observar la actividad levansacarasa, el gel se incubó en una solución de sacarosa al 10 % (p/v) en amortiguador de acetato de sodio 50

mM pH 6 durante 18 h a temperatura ambiente. Para la actividad endolevanasa el gel adicionado con levana se incubo en amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 6 durante 24 h. Concluido el tiempo de incubación, se sometió a un tratamiento con una solución de etanol:agua (75/25) durante 30 min, para posteriormente ponerlo en contacto con una solución de ácido peryódico 0.7 % (p/v) y ácido acético 5% (v/v) durante 1 h. Transcurrido este tiempo se realizan lavados con una solución de bisulfito de sodio 0.2 % (p/v) y ácido acético 5 % (v/v) hasta observar el gel transparente. Finalmente se adiciona el reactivo de Schiff para observar una ligera coloración purpura en las zonas donde hay carbohidratos, el gel se destiño en agua destilada durante 4 h. Todos los ensayos se compararon con las muestras corridas en geles de poliacrilamida sin tratamiento.

7.5. Evaluación de la prueba de concepto empleando el sistema de expresión constitutivo de *P. pastoris*

La evaluación del sistema simultáneo PEREEM se realizó en dos sistemas de reacción: en matraces Erlenmeyer de 250 mL y en un biorreactor Applikon de 1 L.

7.5.1. Evaluación a nivel matraz

Se preparó un pre-inóculo por siembra en agar YPD con zeocina 100 µg/mL a partir de un resguardo congelado para la clona X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB y se incubó durante 96 h a 28 °C. Posteriormente se inocularon con una colonia 3 mL de medio YPD con zeocina 100 µg/mL en un tubo de ensayo de 20 mL que se incubó por 24 h a 28 °C y 200 rpm.

- *1ª etapa: crecimiento en glucosa y expresión de la enzima.* Se tomó un pequeño volumen del cultivo antes descrito como inóculo para 50 mL de medio BM-Y glucosa 2 % (p/v) en un matraz de 250 mL, iniciando con una OD₆₀₀ de 0.1 a 28 °C y 200 rpm.
- *Primera reacción-fermentación.* Después de 72 h de cultivo, se adicionaron 50 mL de medio BM-Y conteniendo 200 g/L de sacarosa para llegar a 100 mL de medio de cultivo.

- *Segunda reacción-fermentación.* Después de 48 h de cultivo en las mismas condiciones, se retiraron 50 mL de cultivo y se realizó una segunda adición de 50 mL de medio de cultivo con 200 g/L de sacarosa.
- *Tercera reacción-fermentación.* Después de otras 48 h se retiraron nuevamente 50 mL de cultivo y se realizó una tercera adición de 50 mL de medio de cultivo con 200 g/L de sacarosa. La tercera reacción-fermentación se monitoreo durante 120 h más.

7.5.2. Evaluación a nivel biorreactor

Esta etapa del proyecto se llevó a cabo en un equipo con control de pH mediante la adición de KOH 4 M y con control de agitación y aireación hasta 1200 rpm y 1.0 vvm.

- *1ª etapa: crecimiento en glucosa y expresión de la enzima.* Se partió de un cultivo con la misma cepa con la que se inocularon 400 mL de medio BM-Y glucosa 2 % (p/v) para iniciar con una OD₆₀₀ de 0.1, en un biorreactor de 1 L. El cultivo se llevó a cabo a 28 °C, 330 rpm, con una aireación de 0.5 vvm. Para evitar que el cultivo quedara limitado por oxígeno, se aumentó la velocidad de agitación hasta un máximo de 1200 rpm, vía el control automático del equipo.
- *Primera reacción-fermentación.* Transcurridas 35 h de cultivo en glucosa se adicionaron 400 mL de medio BM-Y conteniendo 200 g/L de sacarosa para alcanzar un volumen final de 800 mL, que se incubaron a 28 °C, 1200 rpm, durante 18 h. Para controlar la concentración de oxígeno disuelto, fue necesario aumenta la aireación a 1.0 vvm.
- *Segunda reacción-fermentación.* A las 18 h se retiraron 400 mL del medio de reacción-fermentación y se realizó una segunda adición de 400 mL de medio BM-Y conteniendo 200 g/L de sacarosa. Esta última etapa se monitoreo 6 h más.

Todas las etapas se monitorearon midiendo glucosa, fructosa, sacarosa residual, perfil de levana, concentración y perfil de L-FOS, así como la biomasa y la actividad enzimática producida.

7.6. Métodos analíticos

7.6.1. Cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa

La cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en el sobrenadante de cultivo se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se utilizó un cromatógrafo Ultimate 3000 Dionex equipado con un detector de índice de refracción (RefractoMax 520) y una columna Gold Amino (4.6 x 250 mm). La columna se mantuvo a 30 °C con un flujo de 1 mL/min de acetonitrilo:agua (75:25). Para determinar la concentración de los azúcares en las muestras se construyó una curva estándar de fructosa, glucosa y sacarosa de 0 a 120 mg.

7.6.2. Análisis de levanas

El análisis de producción de polímero en el sobrenadante de cultivo se llevó a cabo mediante cromatografía de permeación en gel (GPC), en un cromatógrafo Ultimate 3000 Dionex equipado con un detector de índice de refracción (RefractoMax 520) y una columna Ultrahydrogel™ Linear (7.8 x 300 mm). La columna se mantuvo a 35 °C con un flujo de 0.8 mL/min de nitrato de sodio 0.1 M. Para determinar la presencia de polímero en las muestras, se utilizó como estándar levana SacB de alto y bajo peso molecular producidas por el método descrito por Porrás-Domínguez et al., 2015.

7.6.3. Análisis del perfil de L-FOS

El análisis de L-FOS en el sobrenadante de cultivo se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta eficiencia con detección de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) en un equipo Dionex equipado con un detector electroquímico (ED50 Dionex) y una columna CarboPac PA-200 (2 X 250 mm). La columna se equilibró a 30 °C con 0.1 M de NaOH a un flujo de 0.5 mL/min y las fructanas se eluyeron 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 90 min). Para identificar algunos productos en las muestras, se utilizó un estándar de I-FOS (Raftilosa P95 de Orafti) con un GP de 2 a 7.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Construcción de cepas recombinantes

Se propuso construir dos cepas recombinantes de *P. pastoris* X-33, una inducible por metanol y otra constitutiva. Para ello se utilizaron los vectores pPICZ α A-LevB₁SacB y pGAPZ α A-LevB₁SacB el primero bajo el control del promotor inducible pAOX1 y el segundo bajo el control del promotor constitutivo pGAP. Estas construcciones serán evaluadas con el objetivo de seleccionar un sistema (inducible o constitutivo) para desarrollar el proyecto con el sistema que mejor convenga. En este primer apartado se describen los pasos que se siguieron para seleccionar la cepa recombinante.

8.1.1. Linearización de vectores de expresión

Para llevar a cabo la transformación de células de *P. pastoris* X-33 los vectores pPICZ α A-LevB₁SacB y pGAPZ α A-LevB₁SacB fueron linearizados con las enzimas de restricción Sac I y Avr II, respectivamente. Una vez linearizados ambos vectores, se elaboró un gel de agarosa para corroborar que efectivamente se había logrado la linearización. En la Figura 9b se puede observar en el carril 3 una sola banda cuyo tamaño corresponde a la suma del tamaño de nuestro gen insertado con el vector pPICZ α A, de aproximadamente 6431 pb (3600 pb del vector y 2831 pb del gen) y en el carril 5 a nuestro gen insertado con el vector pGAPZ α A de 5931 pb (3100 pb del vector y 2831 pb del gen).

Los vectores linearizados sin el gen de interés que se utilizaron como control se muestran en la Figura 9a.

8.1.2. Transformación de células de *P. pastoris*

Una vez linearizados los vectores recombinantes pPICZ α A-LevB₁SacB y pGAPZ α A-LevB₁SacB, se transformó *P. pastoris* X-33, obteniendo 238 clonas resistentes a zeocina para el primer caso (Figura 10a, 1-3) y 59 para el segundo (Figura 10b, 1-3). Con esto se determinó que la eficiencia de transformación con pPICZ α A-LevB₁SacB es 4.0 veces mayor a la correspondiente con el vector pGAPZ α A-LevB₁SacB. Cabe destacar que para ambos sistemas la eficiencia de transformación

fue muy baja, comparado con lo reportado en la literatura, en la que se reporta la obtención de 1000-10,000 clonas por μg de DNA (Invitrogen, CA, USA).

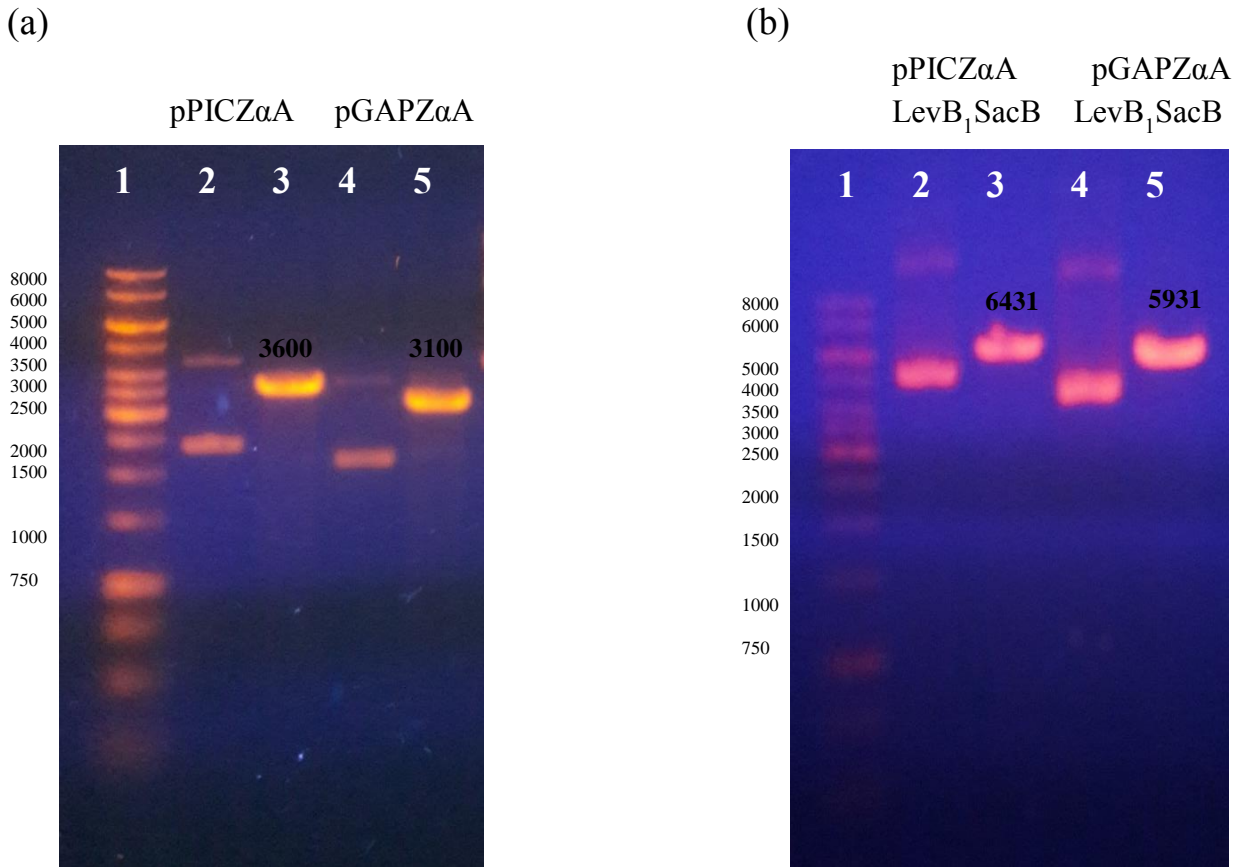
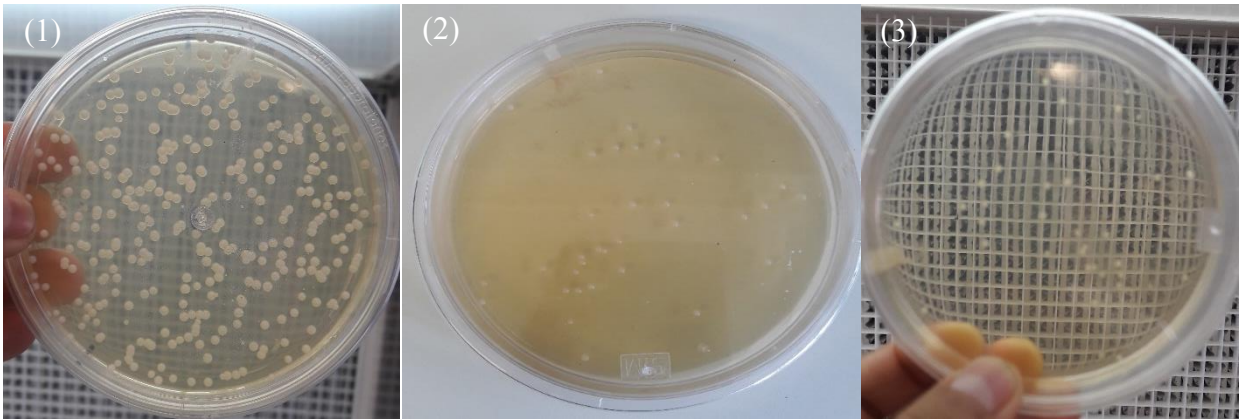


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 0.5X de las digestiones de vectores recombinantes. (a) Control negativo vectores sin inserto; 1: marcador de peso molecular (pb), 2: pPICZ α A sin digerir 3: pPICZ α A + Sac I, 4: pGAPZ α A sin digerir y 5: pGAPZ α A + Avr II y (b) vectores con el gen *LevB₁SacB*; 1: marcador de peso molecular (pb), 2: pPICZ α A-*LevB₁SacB* sin digerir 3: pPICZ α A-*LevB₁SacB* + Sac I, 4: pGAPZ α A-*LevB₁SacB* sin digerir y 5: pGAPZ α A-*LevB₁SacB* + Avr II

A continuación, se seleccionaron 20 colonias de la construcción X-33/pPICZ α A-*LevB₁SacB* (sistema inducible) y 5 para la construcción X-33/pGAPZ α A-*LevB₁SacB* (sistema constitutivo) todas con un diámetro de entre 1 y 1.15 mm (colonias que crecieron primero en placa YPDS con zeocina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Estas transformantes se transfirieron a placas de agar YPD con zeocina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con el objetivo de analizarlas posteriormente.

(a)



(b)

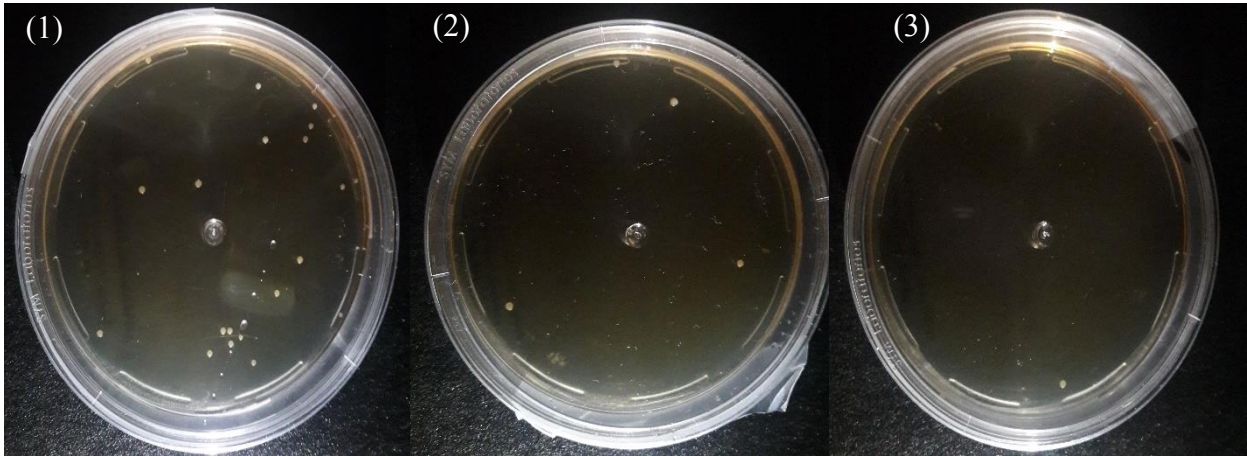


Figura 10. Selección de clonas de *P. pastoris* X-33 recombinante en placas de agar YPDS con zeocina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (a) Clonas X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB (sistema inducible); 1: 200 μL de X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB, 2: 50 μL de X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB, 3: 10 μL de X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB y (b) clonas X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB (sistema constitutivo) ; 1: 200 μL de X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB, 2: 50 μL de X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB, 3: 10 μL de X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB

8.1.2.1. Determinación del fenotipo Mut y Lev+

Las 20 transformantes X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB seleccionadas se resembraron según el protocolo Easy Select™ *Pichia* Expression Kit (Invitrogen, CA, USA) para determinar el fenotipo Mut. Este fenotipo puede ser de dos tipos Mut⁺ o Mut^s, dependiendo de la técnica de integración del vector de expresión. Para obtener el fenotipo Mut⁺ la integración del vector en el cromosoma

no reemplaza o inactiva el gen de la enzima alcohol oxidasa 1 (AOX1). Así, la transformante mantendrá la capacidad de emplear el metanol de la misma forma que la cepa silvestre haciendo uso de dos de las principales enzimas empleadas en el metabolismo del metanol, es decir AOX1 y la alcohol oxidasa 2 (AOX2). Por otro lado, en el fenotipo Mut^s, se reemplaza el gen AOX1 por lo que la cepa obtenida tendrá disminuida la capacidad de utilizar el metanol al conservar únicamente el gen AOX2.

Para la evaluación del fenotipo, se elaboraron placas con medio MD que contienen glucosa 2 % (p/v) y con medio MM que contiene metanol 0.5 % (v/v) que se muestran en la Figura 11 (a y b). En dichas placas se observa que las 20 transformantes son capaces de crecer en ambos medios, cuya única diferencia es la fuente de carbono empleada. Debido a la capacidad de crecimiento observada principalmente en placas con medio MM que contiene metanol, se concluyó que estas transformantes poseen un fenotipo Mut⁺ porque su capacidad de metabolizar el metanol es normal. Resultados semejantes están reportados en la literatura, ya que con frecuencia la linearización empleando la enzima Sac I, genera cepas con el fenotipo Mut⁺ en la cepa de *P. pastoris* X-33, debido a que se favorece la inserción génica en el locus AOX1 del genoma de la levadura, sin presentarse delección de los genes AOX1 y AOX2, lo que permite a *P. pastoris* X-33 metabolizar eficientemente el metanol como fuente de carbono (Clare et al., 1991; Kang et al., 2011; Werten et al., 1999).

Por otro lado, para determinar el fenotipo Lev⁺ (mucoide) se comparó el crecimiento de las transformantes tanto en medio MM que contiene metanol 0.5 % (v/v), como en medio MM con metanol 0.5 % (v/v) adicionado con 29.24 mM de sacarosa. De esta forma, las transformantes X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB que expresen y secreten la enzima de fusión LevB₁SacB presentarán la formación de polímero levana en la placa MM metanol 0.5 % (v/v) con sacarosa, debido a que la sacarosa es sustrato de la enzima clonada y puede llevarse a cabo la síntesis del polímero (Figura 12b). Se realizó un experimento control donde se estriaron las mismas 20 transformantes en medio MM con metanol, sin que se observara la formación de levana (Figura 12a).

Considerando la caracterización fenotípica antes mencionada, se tomó la decisión de seleccionar 5 transformantes para la continuación del trabajo. Se decidió tomar 3 transformantes que mostraron una mayor formación de polímero y 2 que mostraron un fenotipo contrario. Asumiendo la hipótesis

de que al haber una mayor formación de levana habrá una mayor producción de enzima LevB₁SacB durante el cultivo, se espera obtener resultados diferentes en los dos grupos de clonas seleccionadas. La clasificación descrita anteriormente agrupó a las transformantes 1, 19 y 20 dentro del primer grupo y las transformantes 2 y 8 en ese último.

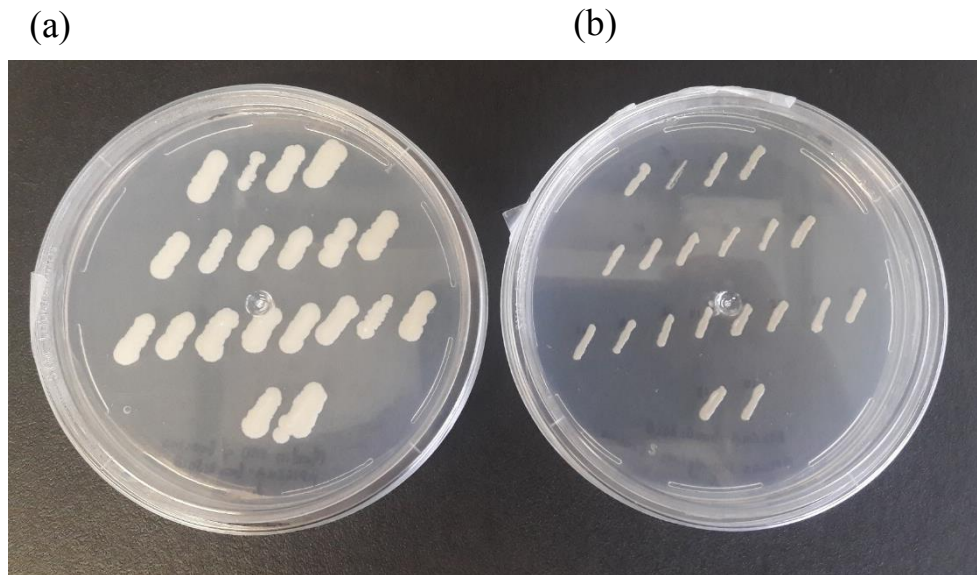


Figura 11. Determinación fenotípica Mut de los clones X-33/pPICZαA-LevB₁SacB (sistema inducible). (a) Placas de agar MD glucosa 2% (p/v) con zeocina 100 µg/mL y (b) placas de agar MM metanol 0.5% (v/v) con zeocina 100 µg/mL

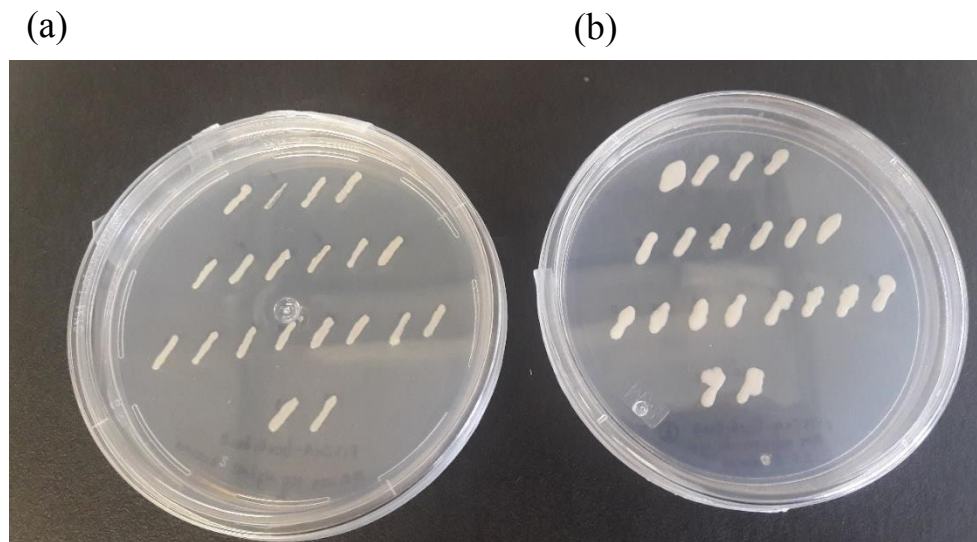


Figura 12. Determinación fenotípica Lev⁺ de los clones X-33/pPICZαA-LevB₁SacB (sistema inducible). (a) Placas de agar MM metanol 0.5% (v/v) con zeocina 100 µg/mL y (b) placas de agar MM metanol 0.5% (v/v) con zeocina 100 µg/mL adicionado con 29.24 mM de sacarosa

8.1.3. Selección de transformantes para la expresión de LevB₁SacB

Con el objetivo de seleccionar una clona inducible y otra constitutiva de las 5 transformantes seleccionadas en cada sistema, se llevaron a cabo cinéticas de fermentación en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo, a las cuales se les midió crecimiento celular, pH, actividad enzimática medida como levansacarasa y proteína soluble.

Para el sistema inducible se tomaron las muestras cada 24 h durante la fase de inducción con metanol. En la Figura 13a, se observa que las curvas de crecimiento son similares para las 5 transformantes, mientras que la biomasa alcanzó valores finales de entre 20 y 21 DO medidas a 600 nm, ubicándose dentro de la fase de crecimiento exponencial. El pH inicial del cultivo fue de 6 ± 0.1 y se modificó a valores de 6.5 al final de la fermentación.

Por otro lado, para el sistema constitutivo se observa un comportamiento similar en cuanto a crecimiento para las 5 transformantes alcanzando valores de entre 22 y 24 DO_{600nm}, pero disminuyendo el pH hasta 5.5 al final de las fermentaciones, una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento (Figura 13b). Una primera conclusión es entonces que los cambios en pH, no afectan el crecimiento de la levadura recombinante, para cuyo crecimiento se ha reportado un rango de pH de 3 a 7 (Macauley-Patrick et al., 2005).

Posteriormente se determinó la actividad enzimática en los sobrenadantes de todos los cultivos de ambos sistemas. En el sistema de expresión inducible las 5 transformantes (1) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB, (2) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB, (8) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB, (19) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB y (20) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB mostraron actividad después de 24 h de inducción con metanol, actividad que sigue incrementándose a lo largo del tiempo para la clona (1) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB y para la clona (8) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB, alcanzando valores de actividad enzimática levansacarasa de 23,826 y 12,890 U/L de fermentación al final de la fase de inducción. Por el contrario, para las clonas (2) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB, (19) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB y (20) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB, si bien la actividad aumenta después de 24 h, se obtuvieron valores de actividad enzimática inferiores, a saber: 1,516, 2,222 y 2,869 U/L, respectivamente (Figura 13c). Los altos valores de actividad encontrados para las transformantes (1 y 8) podrían ser el resultado de más de una inserción del gen en el genoma de la levadura, como ha sucedido en varios otros reportes en la literatura (Cereghino & Cregg, 2000;

Clare et al., 1991; Daly & Hearn, 2005; Macauley-Patrick et al., 2005; Vassileva et al., 2001). Por otro lado, es importante mencionar que a pesar de que las clonas analizadas, fueron seleccionadas por el fenotipo Lev⁺ (polímero observado en placa), solo en la clona 1 la actividad enzimática cuantificada resultó proporcional a la cantidad de polímero observada. Por otro lado, para las transformantes del sistema constitutivo (1) X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB, (2) X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB, (3) X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB, (4) X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB y (5) X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB, la actividad enzimática comenzó a detectarse solo después de 48 h de fermentación, como resultado de no poder utilizar adecuadamente la técnica de DNS debido a la alta concentración de azúcar reductor (glucosa) presente en el medio de cultivo. Todas las transformantes mostraron un comportamiento similar alcanzando valores de actividad levansacarasa entre 2,700 y 3,076 U/L, después de 120 h de cultivo (Figura 13d). Estos valores de actividad son considerablemente más bajos que los obtenidos en las clonas 1 y 8 del sistema inducible con metanol, lo que podría deberse entre otras causas a que la proteína no esté siendo procesada correctamente y no puede ser secretada. Es importante mencionar que en ambos sistemas, el pH no sufrió cambios que comprometieran la actividad levansacarasa, de acuerdo con los estudios de estabilidad reportados por Ortiz Soto et al., 2008.

Se cuantificó la concentración de proteína soluble en el sobrenadante de cultivo a lo largo de las 120 h de cultivo. En la Figura 13e se observa claramente que las proteínas expresadas para la clona (1) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB y (8) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB mostraron un incremento gradual a lo largo del tiempo, alcanzando valores de 405 y 208 mg/L de proteína, respectivamente, superiores a los alcanzados en el resto de las transformantes. Por otro lado, en la Figura 13f se puede observar que el incremento de la proteína secretada al medio de cultivo en el sistema constitutivo es muy bajo, alcanzando valores en el intervalo de 122-131 mg/L. Estos resultados son congruentes con los niveles de actividad enzimática medidos (Figura 13 c y d).

De las 5 clonas analizadas se seleccionó una transformante de cada sistema, en el caso del sistema inducible se seleccionó la transformante (1) X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB, dado que mostró la mayor actividad LevB₁SacB. Por otro lado, para el sistema constitutivo, debido a que las 5 cepas estudiadas mostraron el mismo comportamiento en biomasa, actividad enzimática y proteína soluble, la selección fue indistinta, seleccionado también la cepa (1) X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB.

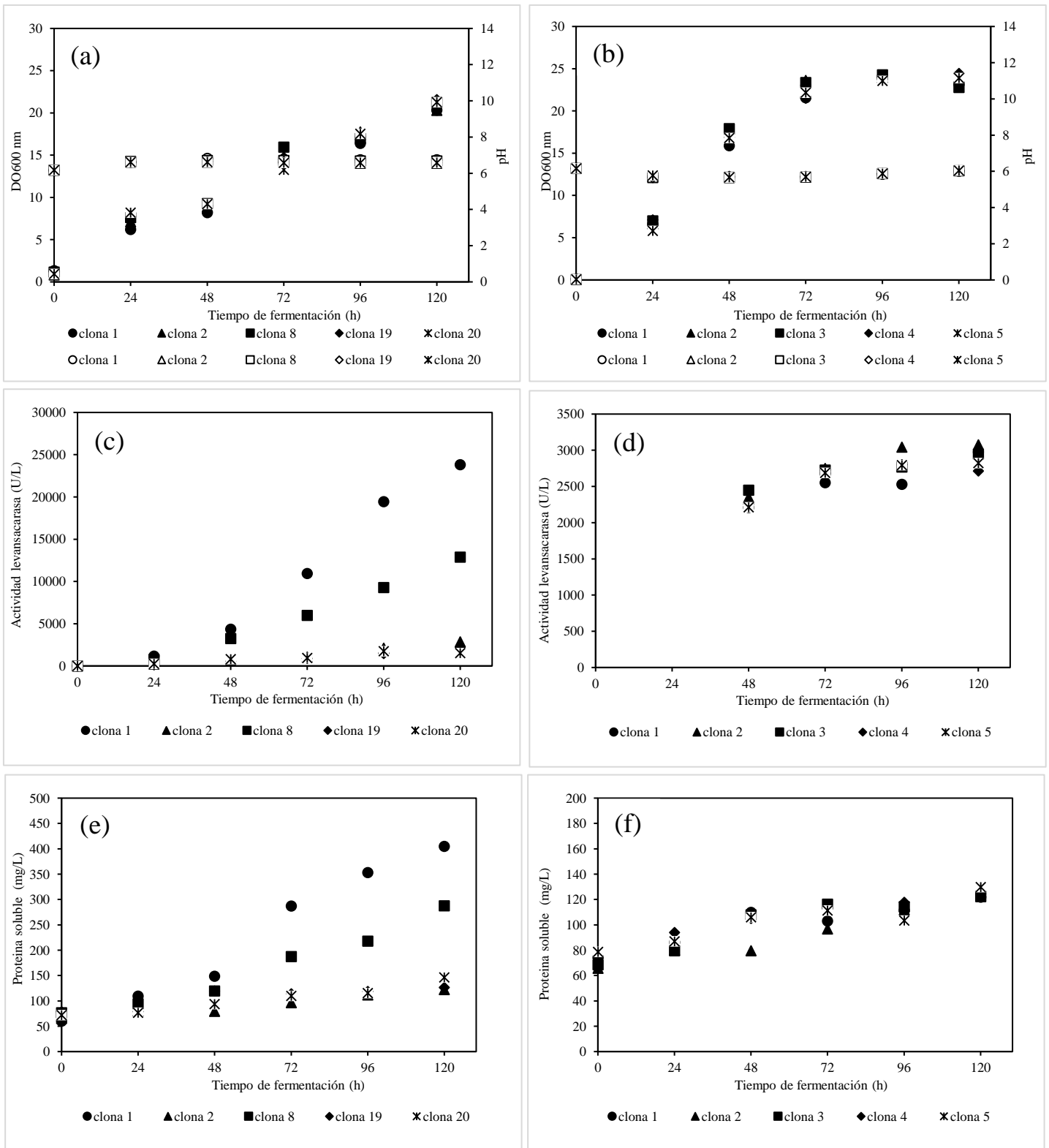


Figura 13. Expresión de la enzima de fusión LevB₁SacB en X-33/pPICZαA-LevB₁SacB (sistema inducible) en medio BM-Y metanol 0.5 % (v/v): (a) cinética de crecimiento, (c) actividad volumétrica de LevB₁SacB medida como levansaccharasa y (e) proteína soluble y expresión de la enzima de fusión LevB₁SacB en X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB (sistema constitutivo) en medio BM-Y glucosa 2 % (p/v): (b) cinética de crecimiento, (d) actividad volumétrica de LevB₁SacB medida como levansaccharasa y (f) proteína soluble.

8.1.4. Selección del sistema de expresión en *P. pastoris*

Con el fin de elegir uno de los dos sistemas de expresión para proseguir con el desarrollo del proyecto, se realizó una caracterización detallada de cada una de las clonas seleccionadas analizando cinéticas de fermentación a nivel matraz. En estos experimentos se midieron las actividades levansacarasa y endolevanasa de la enzima de fusión LevB₁SacB, la proteína total soluble, el pH y la biomasa a lo largo de las 120 h de cultivo.

Sistema inducible

Para el sistema inducible, los cultivos se analizaron solo durante la etapa de inducción con metanol. Los resultados se muestran en la Figura 14, en la que se observa que las actividades volumétricas levansacarasa y endolevanasa de LevB₁SacB y la proteína medida en el sobrenadante de cultivo, así como la biomasa se incrementan con el tiempo de fermentación. Los mejores resultados se registraron a las 120 h de inducción, tiempo en el cual se alcanzaron 2.86 gDCW/L de biomasa, 41,347 U/L de actividad levansacarasa, 899 U/L de actividad endolevanasa y 0.7 g/L de proteína soluble.

Con el fin de observar el perfil electroforético de la enzima de fusión durante el cultivo se realizó un análisis por SDS-PAGE que se muestra en la Figura 15. Este análisis reveló la presencia de 2 bandas de 72 y 130 kDa que incrementan su intensidad con el tiempo de inducción. El peso molecular de la enzima de fusión LevB₁SacB es de 107 kDa, por lo que la banda de 130 kDa, podría corresponder a LevB₁SacB con alguna modificación postraduccional (N y/o O-glicosilación), como ha sido reportado para otras proteínas expresadas en este hospedero (Cereghino & Cregg, 2000; Cregg et al., 2000; Daly & Hearn, 2005; Macauley-Patrick et al., 2005). Por otro lado, la banda de 72 kDa podría corresponder a una proteína extracelular propia de levadura, puesto que esta banda también se alcanza a distinguir ligeramente en la muestra que contiene el sobrenadante de *P. pastoris* transformada con el vector vacío (X-33/pPICZαA), como se observa en el control en el carril 8 de la misma figura.

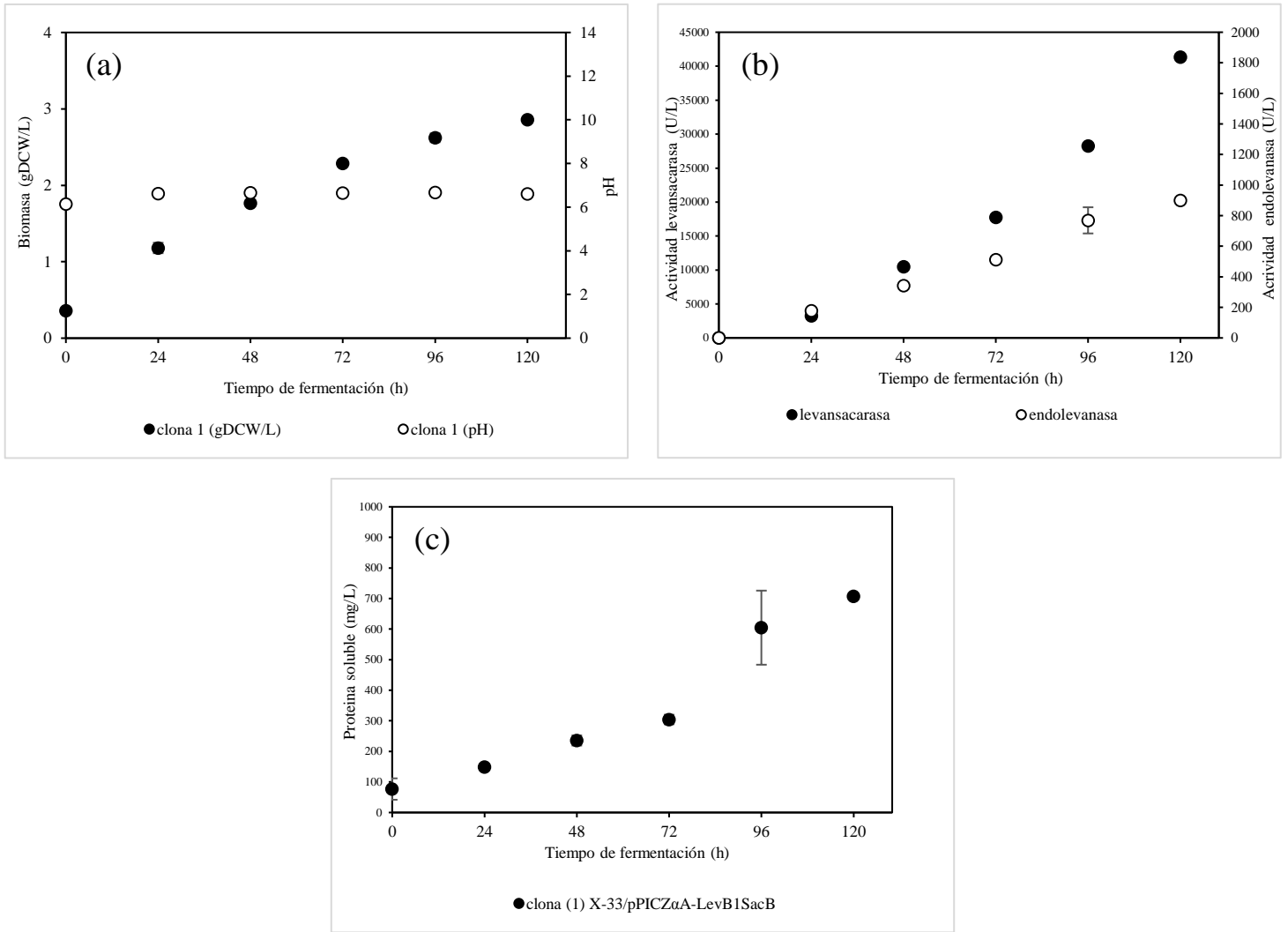


Figura 14. Expresión de la enzima de fusión LevB₁SacB en X-33/pPICZαA-LevB₁SacB (sistema inducible) en medio BM-Y metanol 0.5 % (v/v). (a) Cinética de crecimiento, (b) actividad volumétrica de LevB₁SacB medida como levansacarasa y endolevanasa y (c) proteína soluble

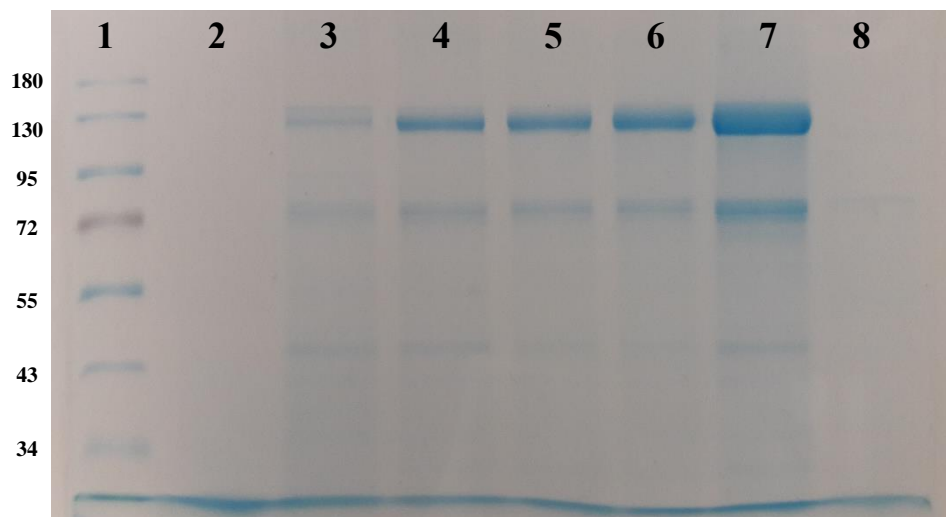


Figura 15. SDS-PAGE de los sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos de cultivo para X-33/pPICZ α A-LevB₁SacB (sistema inducible) en medio BM-Y metanol 0.5 % (v/v). 1) Marcador de peso molecular (kDa), 2) 5 μ g/0 h de cultivo, 3) 5 μ g/24 h de cultivo, 4) 5 μ g/48 h de cultivo, 5) 5 μ g/72 h de cultivo, 6) 5 μ g /96 h de cultivo, 7) 5 μ g /120 h de cultivo y 8) cepa X-33/pPICZ α A transformada con el vector sin el inserto *LevB₁SacB* 120 h de cultivo

Sistema constitutivo

Los resultados de la cinética del cultivo empleando la cepa constitutiva se muestran en la Figura 16. En dicha figura se puede constatar que la biomasa aumenta a lo largo del tiempo de fermentación, al igual que las actividades enzimáticas y la proteína, hasta las 72 h de cultivo, después de las cuales ya no se observaron cambios sustanciales en estos parámetros que fueron seguidos hasta las 120 h de fermentación. Los valores alcanzados en estos parámetros fueron de 4.77 a 6.62 gDCW/L de biomasa, 3,644 a 4,256 U/L de actividad levansacarasa, mientras que la actividad endolevanasa se encontró de entre 141 a 176 U/L y la proteína de 0.057-0.065 g/L. Estos resultados son muy inferiores a los obtenidos en el sistema inducible, probablemente debido a problemas en el procesamiento de la proteína y a una deficiente secreción de la enzima.

El análisis del perfil electroforético se reporta en la Figura 17, en el que, al igual que en el sistema inducible, se distingue una banda de 130 kDa, que se presume podría ser la enzima de fusión (en este caso más tenue) a partir de la hora 72 y hasta las 120 h de cultivo, la cual no se detecta en el

control negativo (un extracto de *P. pastoris* X-33 transformada con pGAPZ α A vacío preparado de la misma forma). Como es de esperarse por los niveles cuantificados de ambas actividades enzimáticas, no se observa sobreexpresión de la proteína.

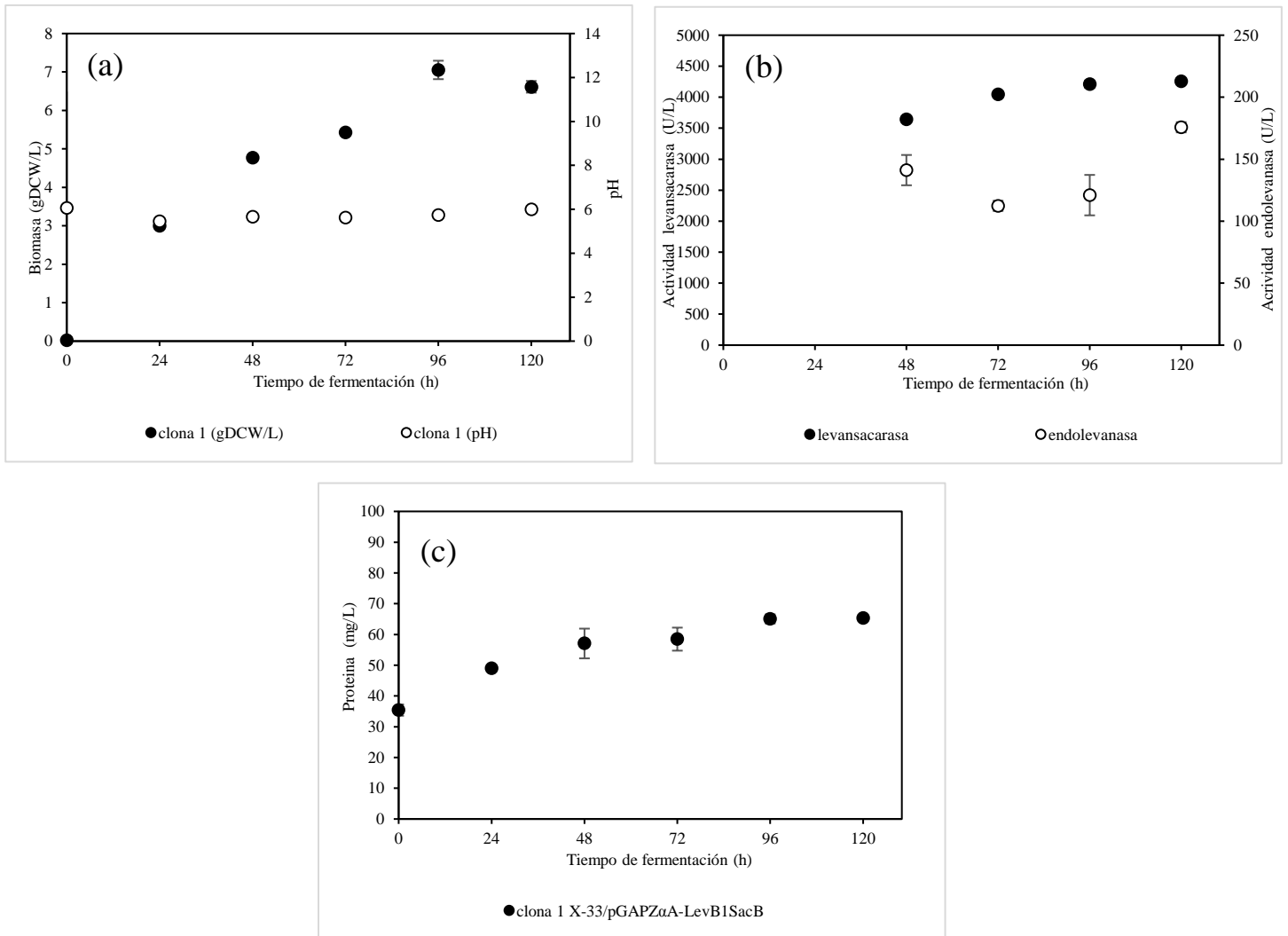


Figura 16. Expresión de la enzima de fusión LevB₁SacB en X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB (sistema constitutivo) en medio BM-Y glucosa 2 % (p/v). (a) Cinética de crecimiento, (b) actividad volumétrica de LevB₁SacB medida como levansacarasa y endolevanasa y (c) proteína soluble

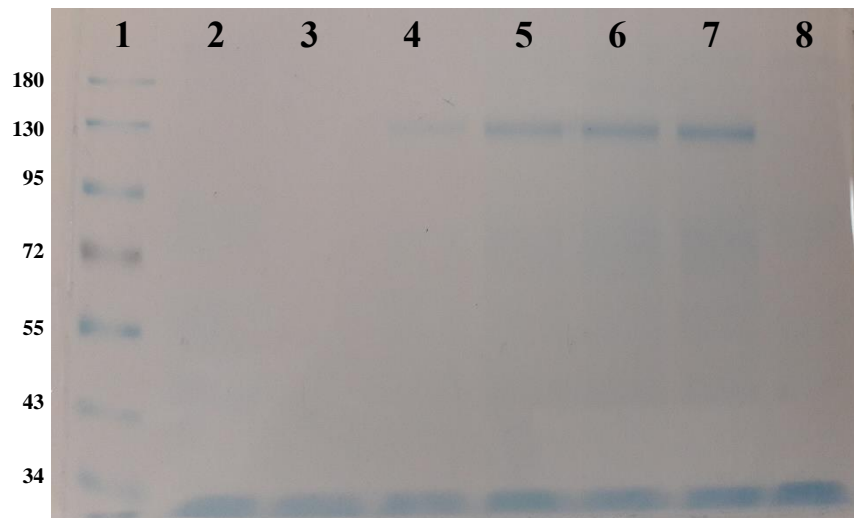


Figura 17. SDS-PAGE de los sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos de cultivo para X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB (sistema constitutivo) en medio BM-Y glucosa 2 % (p/v). 1) Marcador de peso molecular (kDa), 2) 2.5 μ g /0 h de cultivo, 3) 3.5 μ g /24 h de cultivo, 4) 4 μ g/48 h de cultivo, 5) 3.5 μ g/72 h de cultivo, 6) 4.5 μ g/ 96 h de cultivo, 7) 4 μ g/ 120 h de cultivo y 8) cepa X-33/pGAPZ α A transformada con el vector sin inserto *LevB₁SacB* 120 h de cultivo

Comparando ambos sistemas, es claro que los niveles de actividad en el sistema constitutivo están muy por debajo de los correspondientes al sistema inducible. Como ya fue señalado, las diferencias podrían deberse a una deficiente secreción de la enzima o bien a que esta se encontrara formando cuerpos de inclusión intracelulares. Para tratar de encontrar una explicación a estos resultados, se analizaron por electroforesis los extractos intracelulares y los restos celulares a los tiempos en los que se observó actividad enzimática en los sobrenadantes de cultivo. Se constató que en ninguno de los casos existe una banda de proteína correspondiente a la enzima de fusión. Estos resultados sugieren que la causa de este fenómeno está asociada a una pobre expresión del sistema y no a un problema de secreción de proteína.

Se llevaron a cabo evaluaciones adicionales para comparar las actividades de la enzima LevB₁SacB sintetizada por los sistemas de expresión inducible y constitutivo en *P. pastoris* con la enzima sintetizada por el sistema de expresión de *E. coli* reportado por Porras-Domínguez, 2018. Para la eficiencia del sistema de reacción bifuncional (síntesis/hidrólisis) un parámetro de suma importancia es la relación levansacarasa/endolevanasa, ya que de la relación de actividades dependerá el perfil de L-FOS deseado con el tiempo, como se muestra en la Figura 5. Los resultados obtenidos con respecto a este parámetro en el cultivo se reportan en la Tabla 1, donde se puede constatar que, para nuestra sorpresa, la relación de las actividades levansacarasa/endolevanasa a lo largo de la fermentación en los sistemas inducible y constitutivo son claramente diferentes a los que se producen cuando el gen se expresa en el sistema *E. coli*. En efecto, en *E. coli* la enzima de fusión expresa 1.39 unidades de actividad levansacarasa (SacB) por cada unidad endolevanasa (LevB₁). Sin embargo, en el sistema inducible en *P. pastoris* al inicio de la fermentación esta relación tuvo un valor de 18 y se incrementó hasta llegar a 46 al final de la fermentación. Un comportamiento similar se presenta para el sistema constitutivo, aunque con valores de entre 25 y 36 U SacB/U LevB₁, durante el cultivo. Estos resultados solo pueden ser consecuencia de una disminución de la actividad endolevanasa de la proteína sintetizada en el cultivo. Es decir, mientras que la actividad levansacarasa se mantiene a los niveles que permite el cultivo de *P. pastoris*, la actividad endolevanasa disminuye a lo largo de la fermentación, incrementándose la relación U SacB/U LevB₁. Dado que la proteína que contiene la actividad SacB debe contener también la actividad LevB₁, la baja actividad puede deberse a causas tales como: a) efecto adverso de las condiciones de cultivo (por ejemplo, el cambio de pH durante la fermentación) exclusivamente en la estabilidad de la endolevanasa, b) pérdida de actividad y/o efecto negativo de posibles glicosilaciones en la estabilidad de la endolevanasa, c) degradación proteolítica de la proteína de fusión en el sobrenadante de cultivo y/o e) plegamiento incorrecto de la endolevanasa.

Tabla 1. Valores de actividad específica de LevB₁SacB del sobrenadante de cultivo de X-33/pPICZαA-LevB₁SacB (sistema inducible) en BM-Y metanol 0.5 % (v/v) y de X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB (sistema constitutivo) en BM-Y glucosa 2 % (p/v) a diferentes tiempos, en relación con la actividad específica de LevB₁SacB expresada en *E. coli* Rosetta 2

	Tiempo (h)	Biomasa (gDCW/L)	pH	Actividad volumétrica SacB (U/L)	Actividad volumétrica LevB ₁ (U/L)	Actividad específica SacB (U/mg)	Actividad específica LevB ₁ (U/mg)	SacB/LevB ₁
X-33/pPICZαA LevB ₁ SacB Sistema inducible	0	0.36±0.01	6.1	0	0	0	0	
	24	1.18±0.07	6.6	3274 ± 5	179 ± 0	22± 1	1.2 ± 0	18.29
	48	1.17±0.01	6.6	10466 ± 86	343 ± 4	45 ± 3	1.5 ± 0.1	30.51
	72	2.29±0.01	6.6	17769 ± 147	513 ± 0	58 ± 2	1.7± 0.1	34.64
	96	2.26±0.06	6.6	28244 ± 147	769 ± 86	48 ± 9	1.3 ± 0.4	36.73
	120	2.86	6.6	41347	899	58	1.3	46.00
X-33/pGAPZαA LevB ₁ SacB Sistema constitutivo	0	0.03±0.01	6.1					
	24	3.0 ± 0.1	5.5					
	48	4.8 ± 0.1	5.7	3644 ± 20	141 ± 12	64 ± 5.78	2.5	25.90
	72	5.4 ± 0.1	5.6	4048 ± 24	112 ± 4	69 ± 4.85	1.9	36.06
	96	7.1 ± 0.2	5.7	4211 ± 59	121 ± 16	65 ± 0.56	1.9 ± 0.3	35.15
	120	6.6 ± 0.2	6.0	4256 ± 5	176 ± 4	65 ± 0.08	2.7 ± 0.1	24.23
LevB ₁ SacB (<i>E. coli</i> Rosetta 2)	18	1.2	7.0	----	----	60.95	43.74	1.39

8.1.4.1. Estabilidad de LevB₁ a diferentes valores de pH's

Una de las hipótesis que explican la baja actividad endolevanasa en la enzima de fusión sintetizada por los sistemas inducible y constitutivo en *P. pastoris* X-33, podría ser su estabilidad en las condiciones de fermentación. Por esta razón se decidió revisar la estabilidad de la endolevanasa LevB₁ sintetizada por el sistema *E. coli*, para lo cual fue necesario regresar al sistema previo con el fin de producir y purificar la enzima, siguiendo el protocolo descrito por Porras-Domínguez, 2012. Una vez contando con la enzima LevB₁SacB pura, se analizó la estabilidad de LevB₁ dentro de la enzima de fusión a valores de pH de 5.5, 6.0 y 6.5 y a la temperatura de 28 °C, condiciones a las que la enzima se somete en el cultivo de *P. pastoris*. Se encontró que en todos los casos LevB₁ es muy estable, perdiendo tan solo un 4 % de la actividad inicial después de haber sido incubada durante 24 h, y 12 % una vez transcurridas 48 h de incubación (Figura 18). Estos resultados coinciden con los reportados por Porras-Domínguez, 2012, para LevB₁ libre, es decir, no fusionada, ya que en este caso la estabilidad a pH 6.0 y a las temperaturas de 30 y 35 °C demuestra que LevB₁ es totalmente estable durante las primeras 24 h de incubación. Así, de tener una expresión normal en *P. pastoris*, LevB₁ en la enzima de fusión debería ser estable durante las primeras 24 h de cultivo, tanto en el sistema de expresión inducible como en el constitutivo. Por

lo tanto, el aumento en la relación SacB/LevB₁ no pudiendo atribuirse a una pobre estabilidad de LevB₁ puede estar asociada a algunas de las hipótesis alternas planteadas con anterioridad, muy particularmente a fenómenos asociados o atribuibles a las glicosilaciones.

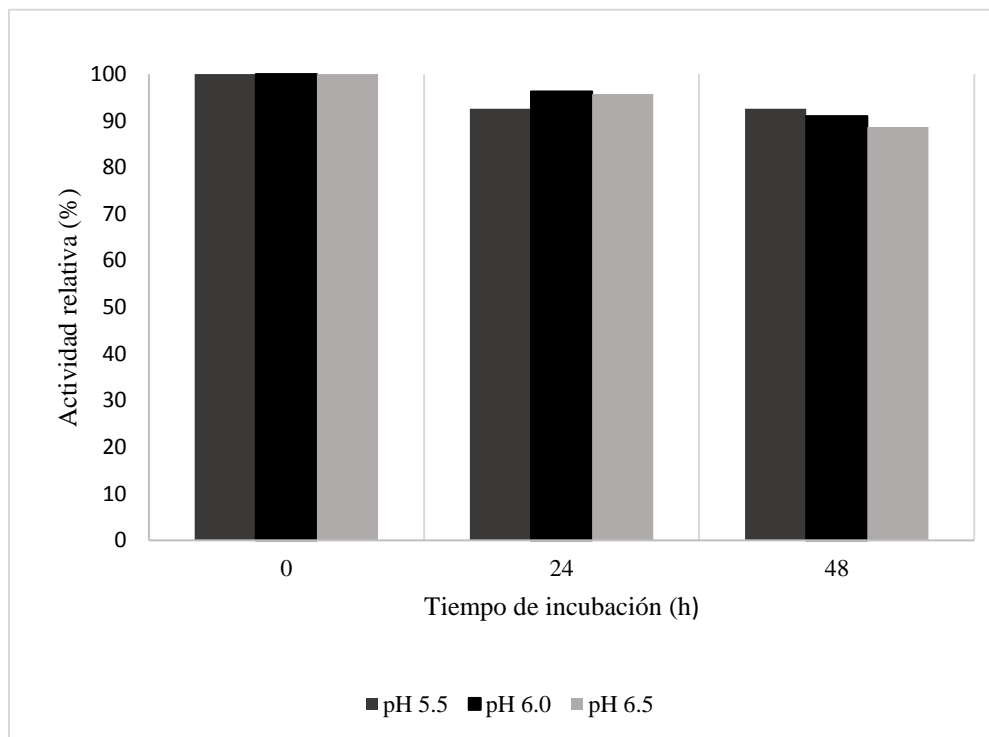


Figura 18. Estudio de la estabilidad de LevB₁ en la enzima de fusión LevB₁SacB a pH 5.5, 6.0 y 6.5 a la temperatura de 28 °C

8.1.4.2. Glicosilación de la enzima de fusión LevB₁SacB

De acuerdo con los resultados del estudio electroforético en geles SDS-PAGE de las muestras obtenidas de los sobrenadantes de cultivo para los sistemas de expresión inducible y constitutivo en *P. pastoris* X-33 (Figuras 15 y 17), en los que se observa una proteína recombinante de 130 kDa vs 107 kDa del tamaño esperado para LevB₁SacB, consideramos que este comportamiento solo puede explicarse si la enzima está glicosilada. Esta reportado en la literatura que *P. pastoris* lleva a cabo modificaciones postraduccionales, particularmente N y/o O-glicosilación (Macauley-Patrick et al., 2005), por lo que cabe la posibilidad que la proteína de fusión presente esta modificación. Igualmente, se cuenta con varios reportes de la literatura sobre cómo la glicosilación influye en la pérdida de actividad enzimática, situación que, podríamos suponer, justificaría los niveles reducidos de actividad endolevanasa en la enzima LevB₁SacB expresada en *P. pastoris*. El primero de ellos, está asociado con la posición de la cadena de oligosacáridos en la estructura de la proteína. Se demostró por ejemplo, que la antitrombina III producida de manera recombinante en *P. pastoris* presento O-glicosilaciones localizadas cerca del sitio activo lo que ocasionó que la proteína recombinante tuviera la mitad de actividad enzimática en comparación con la antitrombina III nativa (Mochizuki et al., 2001). El segundo de estos ejemplos está relacionado con la facilidad con la que *P. pastoris* glicosila la secuencia de reconocimiento N-X-T en lugar de N-X-S, donde X puede ser cualquier aminoácido, excepto prolina (Bause & Legler, 1981; Daly & Hearn, 2005; Holst et al., 1996). Un último ejemplo asociado al ejemplo anterior es el reporte de que las secuencias ubicadas cerca del amino terminal son más susceptibles a ser glicosiladas por estar expuestas un mayor tiempo a la maquinaria de glicosilación (Daly & Hearn, 2005).

Con el fin de revisar las propuestas antes mencionadas, se analizó primero la secuencia de aminoácidos de la proteína en busca de sitios potenciales de glicosilación, para lo que se emplearon herramientas bioinformáticas. NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), arrojó 8 sitios potenciales de N-glicosilación en LevB₁SacB, 5 de ellos localizados en la secuencia LevB₁ (posición 53-NGT, 302-NGT, 347-NGS, 459-NDT y 469-NGT) y 3 en la secuencia SacB (posiciones 664-NVS, 702-NYS y 858-NKT). Por otro lado, NetOGlyc 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), predijo dos sitios potenciales de O-glicosilación localizados en las posiciones 7-S (secuencia LevB₁) y 498-T (secuencia SacB). Una vez examinada la secuencia de aminoácidos y comprobado que LevB₁SacB es susceptible a ser glicosilada

mediante este análisis, se podría sugerir con base en la información reportada en la literatura, que la disminución de actividad endolevanasa en la enzima de fusión, se debe primeramente a que está localizada en el extremo N-terminal (Daly & Hearn, 2005) y por lo tanto la probabilidad de ser glicosilada es mayor con respecto a una eventual construcción inversa (SacBLevB₁), y en segundo término, a que la secuencia de LevB₁ contiene una buena cantidad de residuos N-X-T preferencialmente N-glicosilados en proteínas expresadas en *P. pastoris* (Bause & Legler, 1981; Daly & Hearn, 2005; Holst et al., 1996).

Para confirmar que efectivamente nos encontrábamos frente a una proteína glicosilada y atribuir la pérdida de actividad endolevanasa a fenómenos asociados a esta modificación postraduccional, la enzima de fusión expresada en *P. pastoris* y en *E. coli* se corrió en un gel de acrilamida. A estos geles se les dio un tratamiento con ácido peryódico para oxidar los grupos alcohol de los carbohidratos; los grupos aldehído resultantes se trataron con el reactivo de Schiff, que al reaccionar con estos genera una coloración purpura (Rydberg et al., 2008; You et al., 2004). De esta manera si la proteína está glicosilada, en los geles se observaría la banda de 130 kDa con esta coloración.

En la Figura 19, se muestran los resultados: en el panel (a) los correspondientes a los sobrenadantes de cultivo después de 120 h de cultivo del sistema inducible y en el panel (b) los del sistema constitutivo. En ambos geles se analizaron también como control, la enzima de fusión expresada por *E. coli* y el sobrenadante de cultivo de 120 h de fermentación de *P. pastoris* X-33 transformada con los vectores vacíos.

Al comparar los carriles 6 y 9 del panel (a), donde fueron colocadas las muestras de la enzima de fusión LevB₁SacB expresada en el sistema inducible en *P. pastoris* y de la enzima expresada en *E. coli* respectivamente, no se logra observar una diferencia clara en la tinción de la supuesta glicoproteína (carril 6), es decir, al no estar glicosilada la enzima expresada en *P. pastoris* no se aprecia coloración alrededor de los 130 kDa. Se descarta que la metodología aplicada haya presentado alguna falla, ya que en el carril 8, donde fue colocado el sobrenadante de cultivo de *P. pastoris* transformada con el vector vacío (X-33/pPICZαA), las proteínas extracelulares glicosiladas de *P. pastoris* X-33 se hacen claramente visibles.

Posteriormente, se analizó la proteína obtenida en el sistema de expresión constitutivo, donde tampoco se observó coloración en la hipotética proteína glicosilada. En efecto, en el carril 6 de la Figura 19 panel (b), no se observa la presencia de una banda con tinción que pudiera corresponder a la enzima de fusión LevB₁SacB glicosilada. Por otro lado, son evidentes las proteínas extracelulares glicosiladas de *P. pastoris* X-33 en el sobrenadante de cultivo (carril 8).

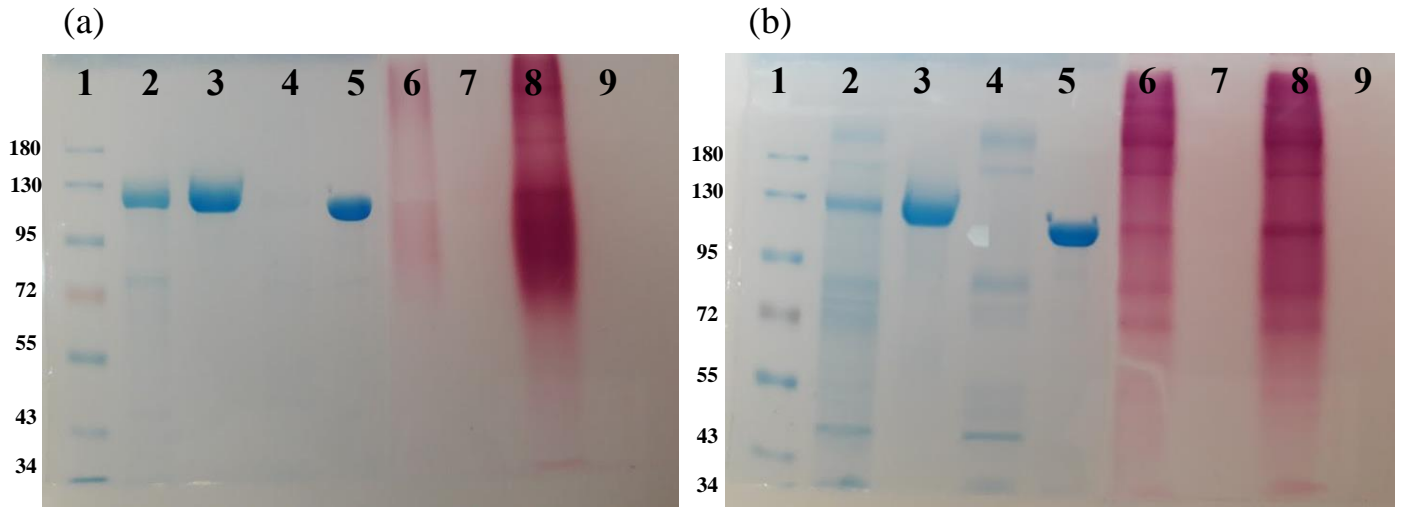


Figura 19. SDS-PAGE y tinción con el reactivo de Schiff de muestras obtenidas de sobrenadantes de cultivo de la expresión de LevB₁SacB en *P. pastoris* X-33. (a) Sistema inducible (X-33/pPICZαA-LevB₁SacB): 1) marcador de peso molecular (kDa), 2) y 6) clona X-33/pPICZαA-LevB₁SacB 120 h de cultivo, 3) y 7) clona X-33/pPICZαA-LevB₁SacB 120 h de cultivo purificada por cromatografía de afinidad a níquel, 4) y 8) clona X-33/pPICZαA transformada con el vector sin inserto *LevB₁SacB* 120 h de cultivo, 5) y 9) LevB₁SacB expresada en *E. coli* Rosetta 2 purificada por cromatografía de afinidad a níquel y (b) sistema constitutivo (X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB): 1) marcador de peso molecular (kDa), 2) y 6) clona X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB 120 h de cultivo, 3) y 7) clona X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB 120 h de cultivo purificada por cromatografía de afinidad a níquel, 4) y 8) clona X-33/pGAPZαA transformada con el vector sin inserto *LevB₁SacB* 120 h de cultivo, 5) y 9) LevB₁SacB expresada en *E. coli* Rosetta 2 purificada por cromatografía de afinidad a níquel

Los resultados obtenidos indican que la enzima de fusión expresada en *P. pastoris* en el sistema inducible y constitutivo no está glicosilada. Sin embargo, aún queda la interrogante del porque se expresa una proteína de un peso molecular de 130 kDa, un tamaño superior al esperado. En un último experimento, tendiente a confirmar los resultados obtenidos, se decidió realizar una desglicosilación *in vitro* de la enzima de fusión LevB₁SacB. Para este análisis la enzima de fusión desnaturalizada se sometió a una digestión con la enzima comercial PNGasa F, la enzima más efectiva reportada para la eliminación de oligosacáridos unidos vía N-glicosilación a las

glicoproteínas (alta manosa, híbridos y complejos) (Daly & Hearn, 2005; Doyon et al., 2002; Raemaekers et al., 1999; Wu et al., 2003; You et al., 2004). En la Figura 20 se muestra LevB₁SacB secretada por *P. pastoris* X-33 con un peso molecular promedio de 130 kDa (carril 2), mientras que en el carril 3, se muestra la misma LevB₁SacB después de ser tratada con PNGasa F, pudiendo constatar que su peso molecular no se modificó después del tratamiento con la enzima. Claramente se observa que no hay diferencia en la migración, lo que estaría indicando que los posibles sitios de N-glicosilación están libres. Un resultado muy parecido fue el reportado por Menéndez et al. 2004, en la expresión de la exolevanasa (LsdB) de *G. diazotrophicus* en *P. pastoris*, quienes al realizar un primer análisis de la secuencia de aminoácidos habían encontrado un posible sitio de N-glicosilación en la posición 89. Sin embargo, después de aplicar un tratamiento de desglicosilación enzimática, confirmaron que la proteína no estaba siendo glicosilada, concluyendo con este estudio, que la mera presencia de péptidos consenso no necesariamente conduce a su glicosilación.

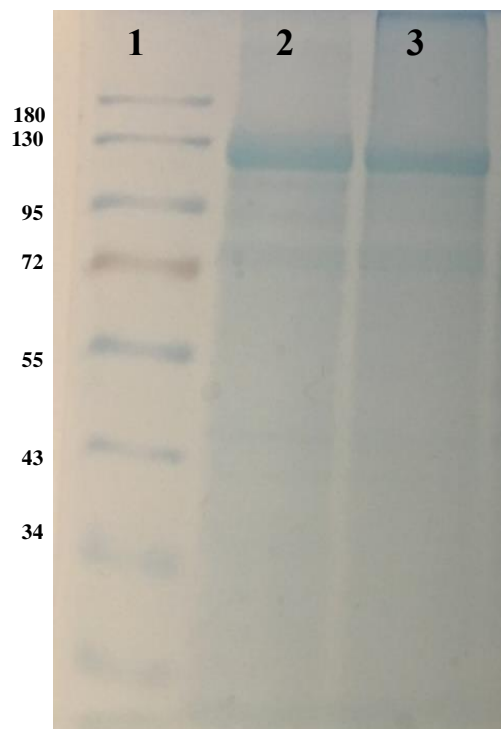


Figura 20. SDS-PAGE de sobrenadantes obtenidos a 120 h de inducción para el sistema X-33/pPICZαA-LevB₁SacB (sistema inducible) en medio BM-Y metanol 0.5 % (v/v). 1) Marcador de peso molecular (kDa), 2) LevB₁SacB producida por *P. pastoris* X-33 y 3) LevB₁SacB producida por *P. pastoris* X-33 + PNGasa F

Con los resultados hasta aquí obtenidos no fue posible demostrar que el mayor peso molecular observado para la enzima de fusión LevB₁SacB expresada en *P. pastoris* con respecto al que correspondería a la secuencia primaria para la que codifica el gen, se deba a una glicosilación, por lo que se descarta la posibilidad de que la disminución en la actividad endolevanasa se deba a esta modificación postraducciona.

8.1.4.3. Análisis de proteólisis en el sistema de expresión *P. pastoris*

Otro de los fenómenos asociados con una reducción en el rendimiento de proteínas recombinantes en el sistema de expresión de *P. pastoris*, es el relativo a la proteólisis de los polipéptidos secretados (Macauley-Patrick et al., 2005). Una de las estrategias a nivel cultivo más utilizadas para reducir este efecto es el empleo de medios que contengan componentes ricos en aminoácidos, como la peptona y el extracto de levadura (Ahmad et al., 2014; Cregg et al., 2000; Daly & Hearn, 2005; Macauley-Patrick et al., 2005; Zhou & Zhang, 2002). Se ha demostrado en la literatura, que aun empleando esta estrategia es evidente la presencia de proteasas en el medio de cultivo, como consecuencia principalmente de la lisis celular en combinación con elevadas densidades celulares (Cregg et al., 2000; Macauley-Patrick et al., 2005; Sinha et al., 2004). En el presente proyecto se recurrió a esta estrategia con la finalidad de brindarle al sistema todos los requerimientos para lograr una buena expresión de la enzima y evitar problemas de proteólisis. Para analizar el efecto de una posible proteólisis que explicara la baja actividad enzimática, principalmente de la endolevanasa LevB₁, se optó por realizar ensayos de zimografía. El objetivo fue observar las actividades levansacarasa y endolevanasa *in situ* en geles de acrilamida, teniendo como hipótesis que si la enzima se proteoliza se observarían varias bandas con actividad en regiones de menor peso molecular. Se corrieron geles de muestras obtenidas a las 120 h de cultivo, para el cual existe la posibilidad de una disminución en la cantidad de células viables (Daly & Hearn, 2005). Aunado a esto, existe una mayor probabilidad de que se favorezca la inducción de proteasas, dado el agotamiento de la fuente de nitrógeno (Macauley-Patrick et al., 2005). Para observar la actividad levansacarasa, una vez realizada la electroforesis, los geles se incuban con sacarosa en amortiguador de acetato pH 6, para observar la síntesis de polímero en la banda donde migra la enzima. Para el caso de la actividad endolevanasa los geles se preparan con levana, por lo que

después de correr el gel, este se incubó en amortiguador de acetato pH 6, haciendo que la actividad endolevanasa se observe como un halo de claridad en la banda donde migre la enzima a causa de la hidrólisis de la levana. Posteriormente los geles se tiñen con el reactivo de Schiff para la detección específica de carbohidratos. Los detalles de la técnica se encuentran en la sección de Materiales y Métodos (M&M). Para comparar los zimogramas con electroforesis normales, los geles se tiñen con azul de Commasie. En la Figura 21a se muestra el resultado de analizar la actividad levansacarasa para el sistema de expresión inducible, donde se observa claramente la actividad de la enzima obtenida directamente del sobrenadante de cultivo (carril 6) y de la enzima purificada (carril 7) ambas con un peso molecular de alrededor de 130 kDa. En el carril 9 se muestra la enzima de fusión expresada en *E. coli* Rosetta 2. Es importante señalar que en el carril 6 se aprecian bandas más pequeñas por debajo de la banda principal, que no aparecen en la enzima purificada (carril 7). Al comparar la muestra del carril 6 con un sobrenadante obtenido de *P. pastoris* X-33 transformada con el vector vacío (carril 8), en esta última no es evidente la banda de alrededor de 72 kDa, por lo que se considera que se trata de una proteólisis parcial de la enzima de fusión.

La actividad endolevanasa se describe en la Figura 21b. En el carril 6 se aplicó la enzima directamente del sobrenadante de cultivo, mientras que en el 7 la enzima purificada. La actividad endolevanasa solo se presenta en la preparación purificada, indicativo de que la actividad endolevanasa en la enzima de fusión, es mucho menor que la levansacarasa. No fue posible demostrar mediante este zimograma evidencia de proteólisis.

Para el sistema de expresión constitutivo (Figura 22 a y b), la actividad levansacarasa es evidente, tanto en el sistema de expresión constitutivo de *P. pastoris* (carriles 6 y 7) como en el sistema de *E. coli* (carril 9), resultado que no se observa en el carril 8, que corresponde al control (*P. pastoris* transformada con el vector vacío). Por otro lado, no se alcanzan a percibir bandas por debajo del producto principal que indiquen que la enzima se esté proteolizando. En cuanto a la actividad endolevanasa nuevamente nos fue imposible observar actividad en las proteínas del sobrenadante de cultivo (Figura 22b, carril 6), aunque si en la enzima purificada (carril 7).

En consecuencia, no se logró demostrar que la proteólisis tenga un impacto importante en la pérdida de actividad tanto levansacarasa como endolevanasa.

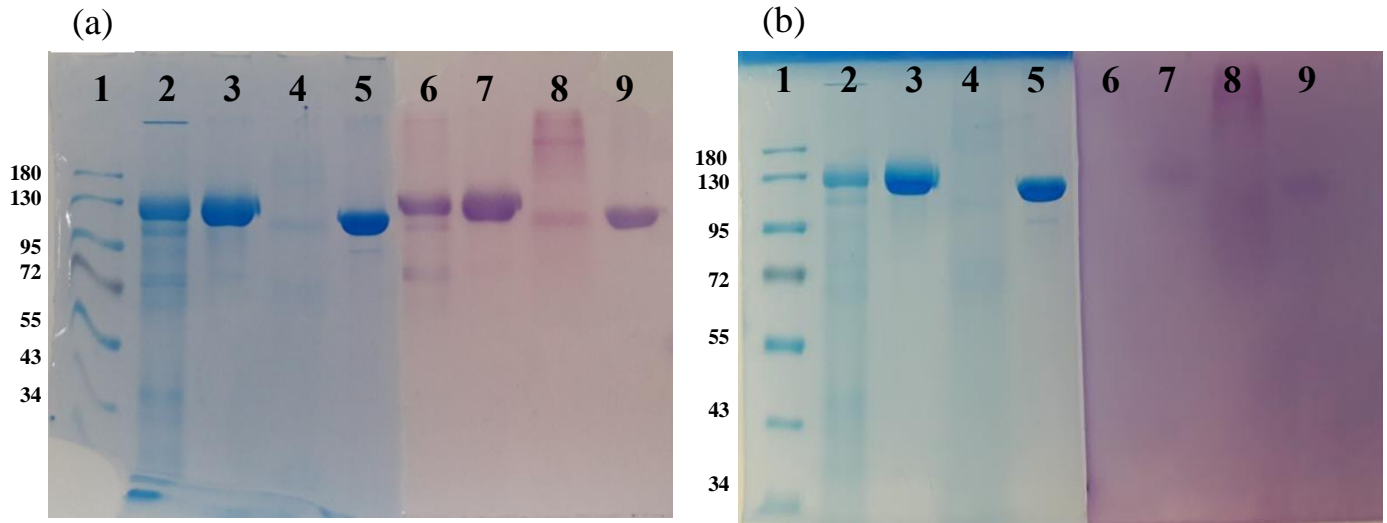


Figura 21. Producción inducible de LevB₁SacB. Identificación de las actividades mediante SDS-PAGE y zimograma. (a) Sistema de expresión X-33/pPICZαA-LevB₁SacB para observar la actividad levansacarasa y (b) sistema de expresión X-33/pPICZαA-LevB₁SacB para observar la actividad endolevanasa. 1) Marcador de peso molecular (kDa), 2) y 6) X-33/pPICZαA-LevB₁SacB 120 h de cultivo, 3) y 7) X-33/pPICZαA-LevB₁SacB 120 h de cultivo purificada por afinidad a níquel, 4) y 8) clona X-33/pPICZαA transformada con el vector sin inserto *LevB₁SacB* 120 h de cultivo, 5) y 9) LevB₁SacB expresada en *E. coli* Rosetta 2 purificada por cromatografía de afinidad a níquel

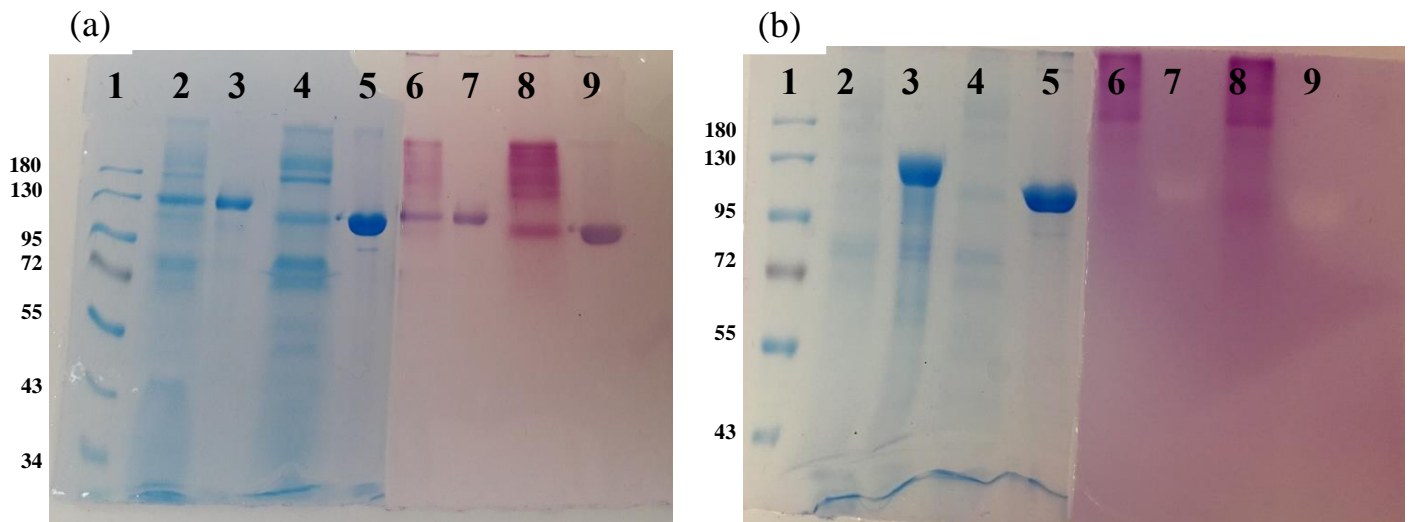


Figura 22. Producción constitutiva de LevB₁SacB. Identificación de las actividades mediante SDS-PAGE y zimograma. (a) Sistema de expresión X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB para observar la actividad levansacarasa y (b) sistema de expresión X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB para observar la actividad endolevanasa. 1) Marcador de peso molecular (kDa), 2) y 6) X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB 120 h de cultivo, 3) y 7) X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB 120 h de cultivo purificada por afinidad a níquel, 4) y 8) clona X-33/pGAPZαA transformada con el vector sin inserto *LevB₁SacB* 120 h de cultivo, 5) y 9) LevB₁SacB expresada en *E. coli* Rosetta 2 purificada por cromatografía de afinidad a níquel

Aún queda por comprobar una última hipótesis sobre la baja actividad endolevanasa que se refiere a un plegamiento inadecuado del sistema, atribuible a un procesamiento incorrecto del péptido señal. Sin embargo, la actividad endolevanasa en los zimogramas de las Figuras 21 y 22, una vez que la enzima ha sido purificada, sugiere que existe mayor actividad en el gel con la enzima purificada, cuando esta es detectada a muy bajos niveles en el medio de cultivo. Así, es posible que exista un problema a nivel ensayo de actividad endolevanasa, cuando este se hace directamente en el sobrenadante de cultivo. A la pregunta de por qué existe actividad en el gel con la enzima purificada, y esta se detecta a niveles bajos en el medio de cultivo, surge la hipótesis de que pudiese existir un problema a nivel del ensayo de actividad endolevanasa, cuando este se hace directamente del sobrenadante de cultivo.

Para analizar esta hipótesis se realizaron distintas pruebas de medición de actividad enzimática del componente endolevanasa en la enzima de fusión expresada en el sistema inducible de *P. pastoris* (X-33/pPICZ α A-LevB₁Sac). Para ello se emplearon diferentes volúmenes del sobrenadante de cultivo (10, 25, 50 y 100 μ L) que se obtuvo a las 120 h de inducción. La reacción se llevó con 10 g/L de levana SacB de bajo peso molecular en un volumen de reacción de 500 μ L. Los resultados mostraron que conforme se incrementa la cantidad de sobrenadante de cultivo en el medio de reacción (aumentando la cantidad de enzima), los valores medidos de actividad enzimática (U/mL) disminuyen, obteniéndose 0.89, 0.68, 0.66 y 0.40 U/mL de actividad endolevanasa para 10, 25, 50 y 100 μ L de sobrenadante de cultivo respectivamente. Este resultado sugiere que al incrementar el volumen de sobrenadante en el ensayo de actividad, se incrementa también una cantidad de componentes que interfieren con la actividad de la enzima endolevanasa o con el método de medición de la misma.

Para analizar el efecto de los componentes del medio de cultivo en la medición de poder reductor mediante la técnica de DNS, primeramente, se prepararon curvas estándar de DNS a partir de soluciones de azúcares reductores (0 a 2 g/L) preparados en agua como solvente (control) y en medio BM-Y en el que se encuentran los componentes a investigar. Al comparar las curvas estándar resultantes se observa que la obtenida para el medio BM-Y es 6 veces menor que la que se obtuvo para el control (Figura 23 a y b). Así, se demuestra claramente que el medio BM-Y contiene componentes que interfieren con la cuantificación de azúcares reductores.

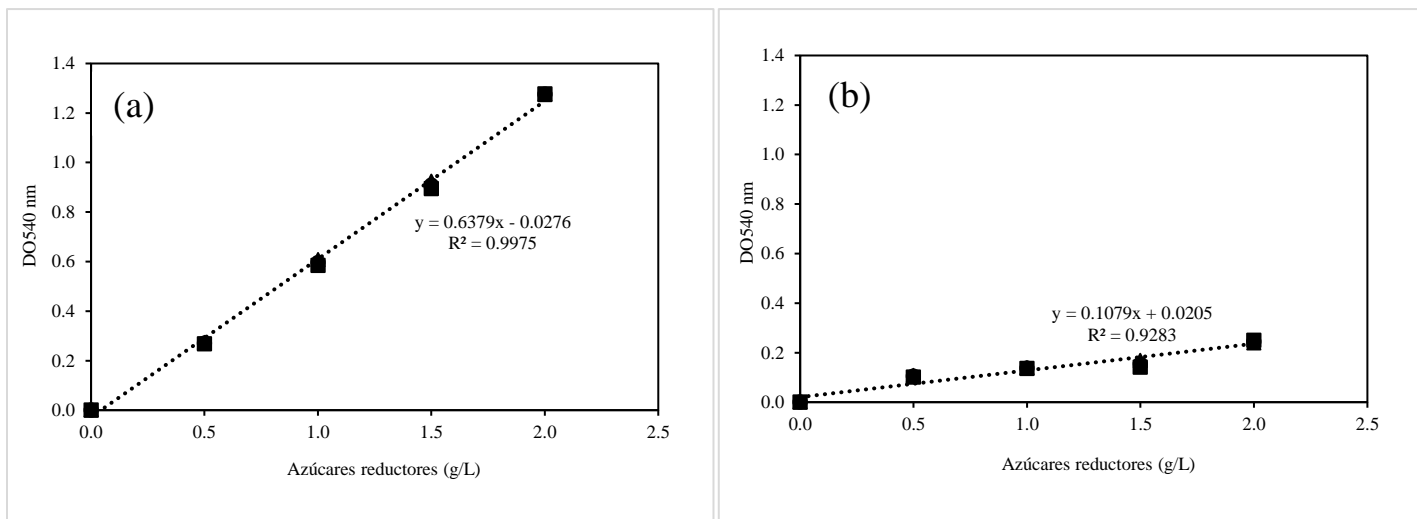


Figura 23. Curvas de DNS. (a) Control y (b) medio BM-Y

Para tener una idea más concreta sobre que componentes podrían estar interfiriendo con el ensayo de actividad, se evaluó de forma individual cada componente mayoritario que integra el medio BM-Y. Con este fin, se midió la absorbancia a 540_{nm} de soluciones que fueron preparadas con los componentes en mezcla con 0 y 1.0 g/L de azúcares reductores. En la Tabla 2, al observar las diferencias obtenidas entre la absorbancia a la que da lugar el azúcar, en presencia del compuesto evaluado con respecto al control en su ausencia, se puede concluir que todos los componentes que integran el medio BM-Y causan interferencia con el método de medición de poder reductor mediante la técnica de DNS, aunque ninguno a niveles que pudieran explicar los resultados de la Figura 23. De hecho, el único que inhibe la medición es la base nitrogenada, y en menos medida el amortiguador.

Existen también reportes en la literatura que indican el extracto de levadura y la peptona causan interferencia con la actividad de algunas enzimas. Tal es el caso de una lacasa recombinante producida en dos medios de cultivo diferentes en el sistema de expresión de *P. pastoris* (Hong et al., 2002). Uno de los medios empleados fue el BMMY y el otro fue denominado BMM. El primer medio está compuesto por 10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 13.4 g/L de base nitrogenada para levadura con sulfato de amonio sin aminoácidos, biotina $4 \cdot 10^{-4}$ g/L, 5 mL/L de

metanol y 0.1 M de amortiguador de fosfatos, pH 6, mientras que el medio BMM el extracto de levadura y la peptona fueron omitidas. Como resultado se obtuvo que la mayor actividad enzimática de la lacasa fue de 3.3 U/mL después de 72 h de incubación empleando el medio BMM mientras que con el medio BMMY se alcanzó únicamente 0.11 U/mL de actividad enzimática. Con estos resultados los autores concluyeron que el extracto de levadura y la peptona presentes en el medio BMMY son los principales componentes que causan interferencia con la actividad de la lacasa.

Tabla 2. Evaluación de los componentes del medio BM-Y en la medición de poder reductor mediante la técnica de DNS

Componentes	0.0 g/L reductores	1.0 g/L reductores	1.0-0.0 g/L reductores
	DO540 nm	DO540 nm	DO540 nm
Control	0	0.7174	0.7174
1 % extracto de levadura	0.1330	0.9618	0.8288
2 % peptona	0.0096	0.8293	0.8197
X33/pPICZαA LevB1SacB Sistema inducible	1.34 % YNB	0	0.5614
4*10 ⁻⁵ % biotina	0	0.7839	0.7839
0.1 M de amortiguador de fosfatos, pH 6	0	0.6484	0.6484

Finalmente, para concluir este análisis y poder demostrar la hipótesis planteada al inicio, es decir sobre la existencia de una problemática a nivel ensayo de actividad cuando se hace directamente del sobrenadante de cultivo, se decidió medir la actividad del componente endolevanasa en la enzima de fusión pura expresada en el sistema inducible de *P. pastoris*. Para ello una muestra de sobrenadante tomada a las 120 h de cultivo se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel. Una vez pura la enzima se midió actividad endolevanasa empleando 3 medios de reacción, uno compuesto únicamente por el amortiguador de acetato de sodio, 50 mM y pH 6; otro con medio

BM-Y preparado al momento del análisis y el último, un sobrenadante obtenido a las 120 h de cultivo de *P. pastoris* transformada con el vector vacío (X-33/pPICZ α A). Los resultados obtenidos arrojaron que durante los 10 min que duró la reacción, se obtuvieron 5.1 U/mL para la primera medición empleando únicamente el amortiguador, mientras que para los otros dos casos fue imposible cuantificar la actividad enzimática, en este periodo. Con esto nuevamente concluimos que los componentes presentes en el medio de cultivo empleado en el presente proyecto causan una interferencia con el método de medición de poder reductor, mediante DNS, aunque a pesar de los experimentos realizados no podemos definir en estos momentos qué compuesto del medio es el responsable del efecto sobre el ensayo.

8.2. Prueba de concepto a nivel matraz y biorreactor: Cultivo alimentado de la cepa constitutiva

Considerando que, contrario a lo que se pensaba, sí se cuenta con actividad endolevanasa en la enzima de fusión, según se puede observar en los zimogramas de las Figuras 21 y 22 se decidió realizar la prueba de concepto, con los niveles de actividad obtenidos en la enzima de fusión LevB₁SacB.

A pesar de las limitaciones en los niveles de expresión de la enzima de fusión LevB₁SacB en el sistema de expresión constitutivo de *P. pastoris*, se decidió realizar las pruebas subsecuentes con este sistema debido a las ventajas que ofrece para el proceso comparado con el sistema inducible, dentro de las cuales destacan:

- (1) el promotor pGAP no requiere la inducción por metanol, que como se describió anteriormente, es tóxico en el ámbito alimentario,
- (2) se evita la necesidad de cambiar el cultivo para pasar de una fuente de carbono a otra (glucosa y/o glicerol a metanol) para inducir la expresión del gen, al inicio del proceso y eventualmente, si se requiere volver a inducir la expresión del gen y
- (3) permite el diseño de una estrategia de cultivo semicontinuo (expresión-reacción).

Así, a partir del sistema constitutivo se diseñaron las siguientes etapas para el proceso objetivo del proyecto para un volumen definido como V_f de reacción-fermentación, ya sea a nivel matraz o nivel biorreactor (Figura 24):

- a) *Arranque*. Crecimiento de *P. pastoris* X-33 en glucosa y producción constitutiva de LevB₁SacB en un volumen de $0.5 V_f$.
- b) *Primera etapa: fase de crecimiento y reacción*. Adición de medio de cultivo fresco $0.5 V_f$ conteniendo 200 g/L de sacarosa. Como consecuencia de esta adición se lleva a cabo una dilución de la biomasa al 50 % y se obtiene una concentración de sacarosa de $[S]_f = 100$ g/L. En esta etapa *P. pastoris* crecerá a expensas de los monosacáridos que resulten (junto con los L-FOS) de la reacción de LevB₁SacB con sacarosa. Al crecer, *P. pastoris* continuará la producción constitutiva de la enzima de fusión.

- c) *Etapas productivas*. Retiro de $0.5 V_f$ del medio (producto del proceso), y nueva adición de medio de cultivo fresco $0.5 V_f$ conteniendo 200 g/L de sacarosa. El número de etapas productivas puede ser tan grande como el proceso lo permita. Al término de cada etapa productiva se obtienen como producto $0.5 V_f$ de medio conteniendo biomasa, enzima (LevB₁SacB), el producto sintetizado (L-FOS) y, como resultado del objetivo del proyecto, un mínimo de glucosa, fructosa y sacarosa residual.

Evaluación del proceso a nivel matraz

Para la evaluación a nivel matraz se siguió la estrategia antes definida. Para la etapa de *arranque* se sabe por los estudios preliminares (Figura 16b), que desde el punto de vista de productividad, 72 h de cultivo representan el tiempo adecuado para obtener y/o recuperar la enzima de fusión en el sistema constitutivo de *P. pastoris*. Otro aspecto importante a considerar, es la cantidad de sacarosa a adicionar, ya que podría afectar (inhibir) el crecimiento de la levadura, razón por la que para las etapas de reacción se decidió trabajar con una concentración de sacarosa $[S]_f$ de 100 g/L como máximo.

Arranque. La fermentación se inició inoculando 50 mL de medio BM-Y glucosa 2 % ($0.5 V_f$) en un matraz de 250 mL, que se incubó a 28 °C y 200 rpm. Después de 72 h de cultivo, cuando el microorganismo ha consumida la glucosa y ha sintetizado y excretado la enzima de fusión LevB₁SacB, se adicionan 50 mL de medio BM-Y ($0.5 V_f$), conteniendo 200 g/L de sacarosa, con el fin de tener un volumen de fermentación de $V_f=100$ mL y una concentración de 100 g/L de sacarosa. Es en este punto cuando la enzima inicia la síntesis de L-FOS, los monosacáridos subproducto de la reacción son consumidos por *P. pastoris* y se continua con la producción constitutiva de la enzima de fusión. Dadas estas operaciones, al proceso se le denomino como sistema de “producción de enzima, reacción enzimática y eliminación de monosacáridos (PEREEM)”.

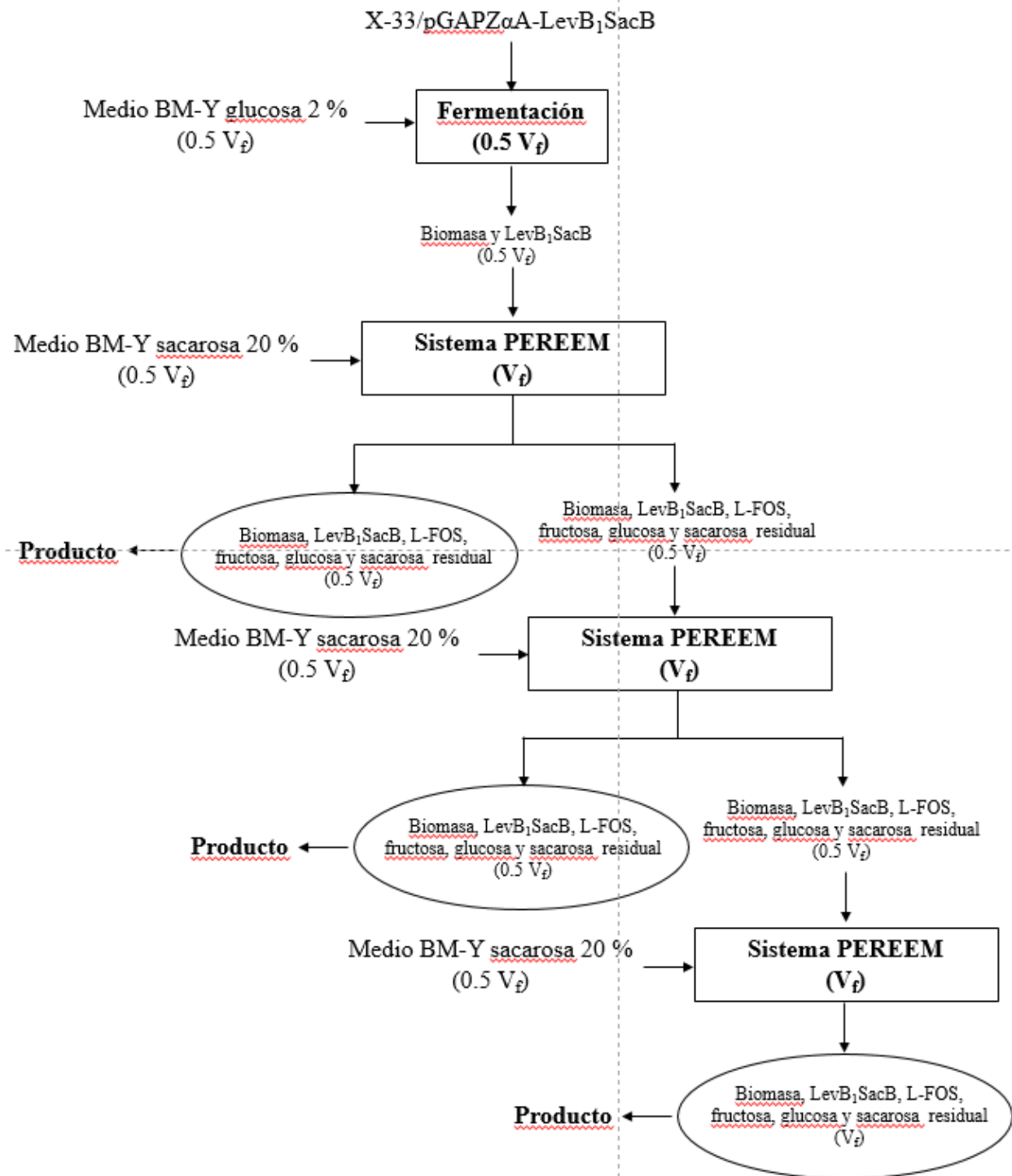


Figura 24. Diagrama que describe las etapas del sistema PEREEM en la producción L-FOS

Cada etapa de cultivo se llevó a cabo incubando el medio en las mismas condiciones y tras 48 h del proceso, se retiraron 50 mL de cultivo previo a la siguiente adición de sacarosa, la incubación se monitoreo 48 h más. En la siguiente etapa se retiraron nuevamente 50 mL de cultivo, realizándose una tercera adición de sacarosa. Se decidió concluir el estudio con esta etapa, pero el proceso se dejó avanzar durante 120 h más, monitoreando su evolución final. A lo largo del experimento, se dio un seguimiento particular al crecimiento del microorganismo, señal directa del consumo de monosacáridos y de su presencia producto de la reacción de LevB₁SacB sobre sacarosa.

En total, este primer experimento tuvo una duración de 288 h, durante las cuales se midió el crecimiento celular (OD_{600nm}) y pH, y durante las etapas de PEREEM la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa, la producción de polímero y el perfil de L-FOS sintetizados a partir de las 72 h de cultivo.

Los resultados y cinética del proceso se reportan en la Figura 25a, donde puede observarse que como era previsible, durante las primeras 72 h de cultivo, el crecimiento del microorganismo estuvo asociado al consumo de glucosa, alcanzándose 4.57 gDCW/L de biomasa. En este punto se constató que el sustrato limitante (glucosa) había sido consumido, dando lugar a la producción constitutiva de LevB₁SacB (4.1 U/mL medidas como levansacarasa y 0.11 U/mL medidas como endolevanasa) en el medio de cultivo. En las etapas subsecuentes, después de cada adición de sacarosa, se puede observar que la levadura reinicia el crecimiento, alcanzando valores similares de biomasa al final de la etapa, a saber: 5.35, 5.23 y 5.27 gDCW/L a las 120, 168 y 288 h, respectivamente, evidencia clara de que el microorganismo utilizó como fuente de carbono a los monosacáridos libres obtenidos como resultado de la actividad de la enzima de fusión sobre sacarosa.

Por otro lado, en la Figura 25b, se muestra el comportamiento del pH durante la fermentación, la cual se dividió en dos etapas para su análisis. La primera incluye las primeras 72 h de fermentación, donde se observa un ligero cambio de pH pasando de 6.2 a un valor de 5.6. Por otro lado, en las restantes 216 h el cambio de pH fue más drástico. Una vez que se inician las nuevas etapas retirando medio al final del crecimiento y adicionando medio fresco con sacarosa, se amortigua el pH del cultivo. Se observa claramente que el cultivo sufre un proceso de acidificación alcanzando

valores de pH cercanos a 4, al final de todo el proceso, indicando que en las etapas subsecuentes se produjeron ácidos orgánicos, posiblemente como consecuencia de limitación de oxígeno, comparada con las primeras horas de fermentación. El proceso constó de 3 etapas de dilución/adición que se iniciaron a las 72, 120 y 168 h.

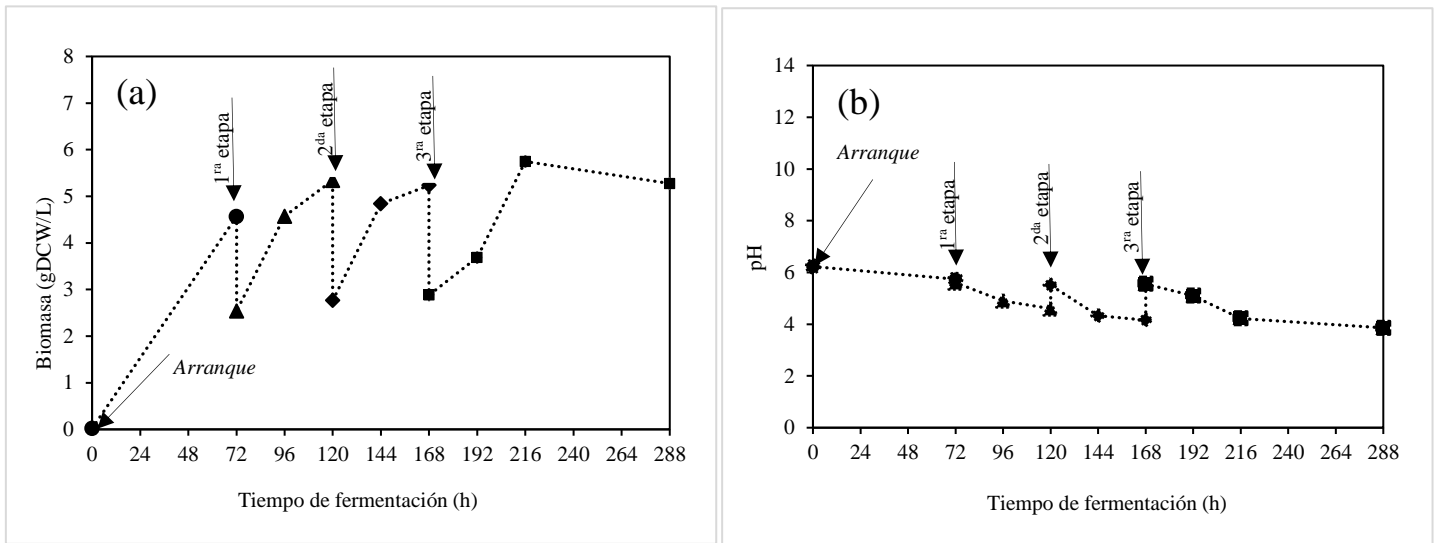


Figura 25. Cinéticas de crecimiento de *P. pastoris* y de control de pH en el sistema X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB en medio BM-Y en el proceso de PEREEM en tres etapas, con adiciones de sacarosa (ver detalles en el texto y en M&M). (a) Evolución de la biomasa de *P. pastoris* y (b) comportamiento de pH

El análisis de los productos de reacción se realizó después de cada etapa de PEREEM, es decir de las 72 h de *arranque* del proceso. En la Figura 26 se presentan los resultados de la síntesis de L-FOS, donde efectivamente se aprecia que el sistema propuesto en este trabajo funciona adecuadamente dando lugar a su producción. Se observa que después de 24 h de la primera adición de sacarosa, se obtienen L-FOS con un GP máximo de 20, perfil que se mantiene sin cambio durante las siguientes 24 h. Como es de esperarse, cuando se lleva a cabo la segunda y tercera adición de sacarosa, a las 120 y 168 h, se puede constatar en el cromatograma correspondiente, una señal que corresponde a la sacarosa recién añadida y las señales diluidas de los L-FOS. Sin embargo, a medida que el tiempo avanza, y particularmente al final de la etapa, se puede constatar

la síntesis de L-FOS con un GP máximo de 20, perfil que como ya se señaló, se mantiene hasta el final del proceso.

En el proceso desarrollado se obtiene a la levanobiosa (F_2) como producto principal del sistema, identificado a partir de un estándar comercial de I-FOS (Raftilosa P95 de Orafti). Este compuesto también ha sido reportado como producto principal en la síntesis de L-FOS mediante el sistema simultáneo y biocatalizador de fusión LevB₁SacB (Porras-Domínguez et al., 2017) y proviene principalmente de los cortes hidrolíticos en la cadena de levana que realiza la endolevanasa en la enzima de fusión. También en el cromatograma destaca la presencia de otras oligolevanas principalmente F_3 , F_4 , F_5 y F_6 y en menor proporción F_7 , F_8 , F_9 ... hasta el F_{20} . Finalmente, las señales pequeñas que aparecen entre cada uno de los productos de esta serie, conocida como serie F_n , podrían corresponder a FOS de la serie 1-kestosa, 6-kestosa, blastosa y aquellas que presentan ramificaciones en β 2-1 (Raga-Carbajal et al., 2018).

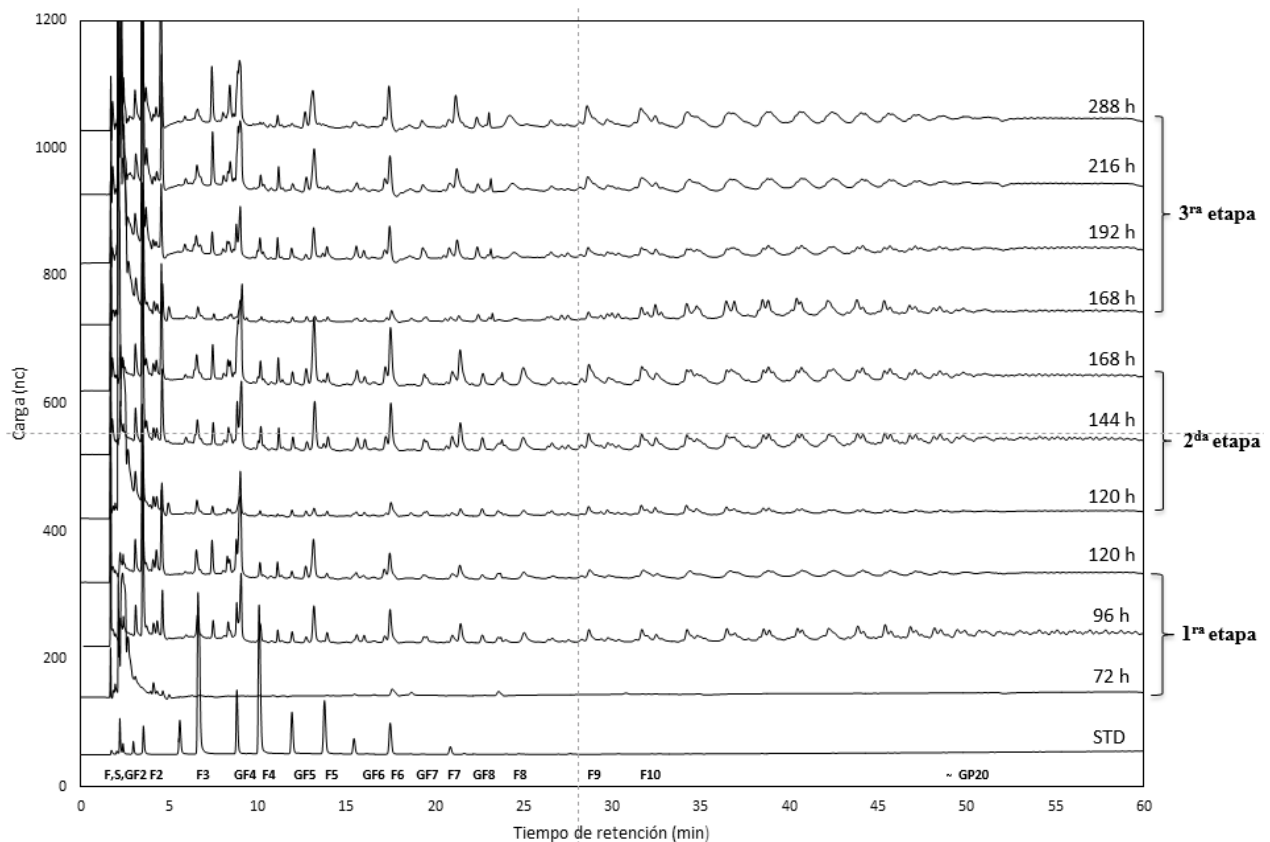


Figura 26. Evolución del perfil de L-FOS producidos durante la síntesis con LevB₁SacB, en un sistema de PEREEM, llevado a cabo por etapas, para una concentración global de 300 g/L de sacarosa. El proceso se desarrolló a 28 °C y 200 rpm, en un volumen de reacción de 0.1 L

El análisis de la distribución de pesos moleculares de la levana sintetizada en cada etapa se llevó a cabo mediante GPC, esto con el objetivo de observar el efecto de la actividad levansacarasa sobre su producción y la eventual deficiencia de actividad endolevanasa. En el cromatograma de la Figura 27a, se observa que al inicio de la reacción está presente una señal que corresponde a la sacarosa. Posteriormente a las 24 h de reacción, se observa la aparición de señales, la primera de ellas, con tiempo de retención de 8 a 9 min, que corresponde a la levana de alto peso molecular cuyo peso molecular promedio es superior a 3500 kDa, mientras que la segunda señal corresponde a los L-FOS antes descritos, con un GP de hasta 20. A las 48 h de reacción se observa una ligera disminución de levana de alto peso molecular, asociada sin duda a la hidrólisis por la endolevanasa LevB₁, lo que a su vez genera un pequeño aumento en la cantidad de L-FOS. Para la segunda adición de sacarosa, se observa una disminución muy ligera del polímero de alto peso molecular al igual que para los L-FOS asociada, como se describió anteriormente, a la dilución del cultivo (120 h). Transcurridas las siguientes 24 h, se vuelve a observar el mismo comportamiento, mismo que continúa durante las adiciones posteriores de sacarosa (168 h) (Figura 27 b y c). Sin embargo, como se aprecia en la Figura 27c, al final del proceso se consume toda la levana de alto peso molecular. Algo que es relevante mencionar es que durante el proceso no se detecta levana de bajo peso molecular, indicativo de la mayor afinidad que presenta la endolevanasa por este tamaño del polímero.

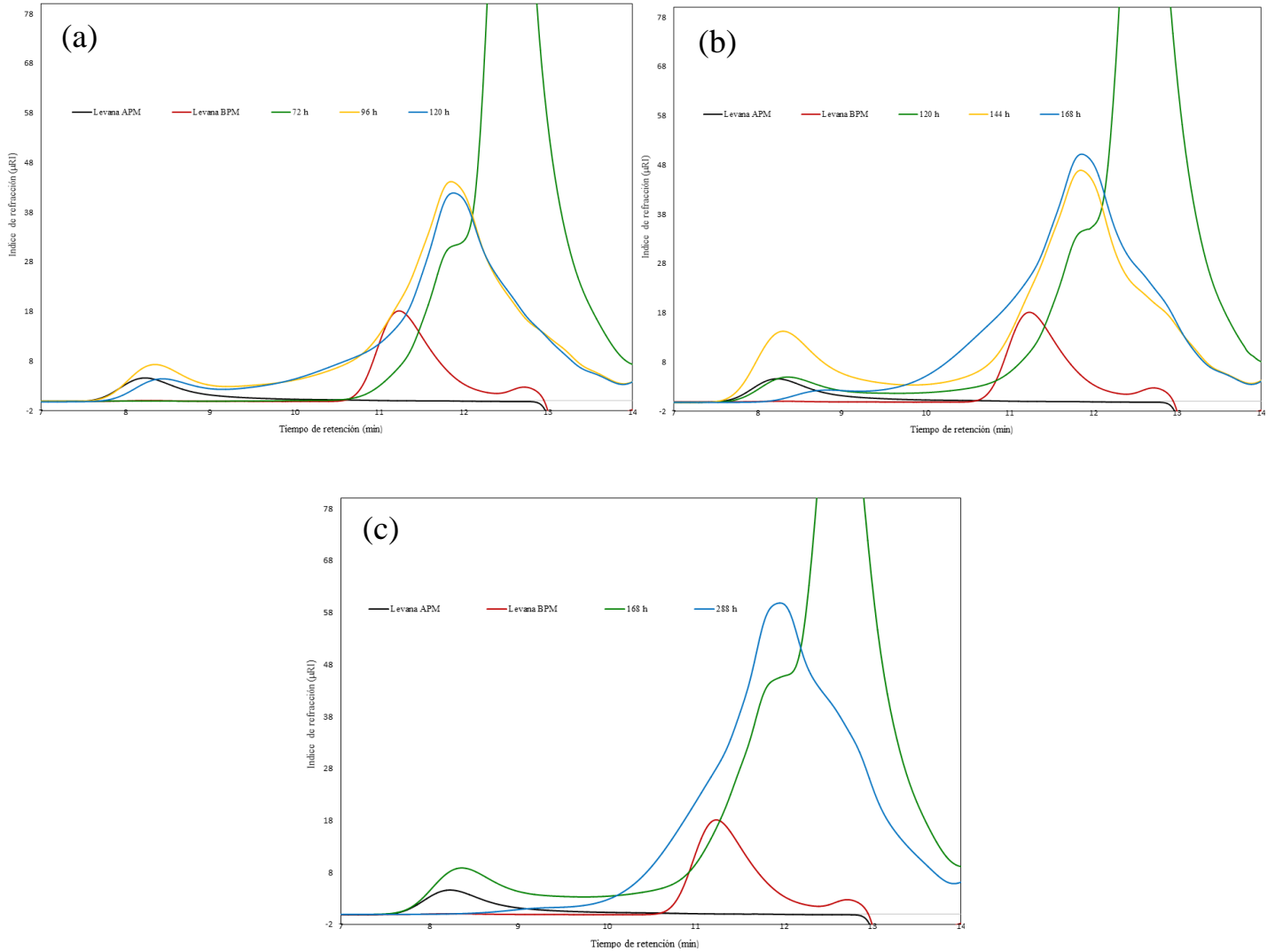


Figura 27. Evolución en la producción de levanas durante la síntesis con LevB₁SacB, en un sistema de PEREEM, llevado a cabo por etapas, para una concentración global de 300 g/L de sacarosa. El proceso se desarrolló a 28 °C y 200 rpm, en un volumen de reacción de 0.1 L. (a) 1^{ra} etapa, (b) 2^{da} etapa y (c) 3^{ra} etapa en el sistema descrito

Como último elemento de este análisis, en la Figura 28 se reporta la evolución de la glucosa, fructosa y sacarosa presente en cada etapa, mediante HPLC. Como era de esperarse, en la primera adición de sacarosa a las 72 h de fermentación, la concentración detectada fue la adicionada, es decir, 100 g/L y no se detectó glucosa. Sin embargo, en las adiciones posteriores, es decir, a las 120 (etapa 2) y 168 h (etapa 3) la concentración de sacarosa fue menor a los 100 g/L que se esperaban conforme a lo recién adicionado, lo que posiblemente esté relacionado con una actividad

levansacarasa alta. En efecto, una alta actividad levansacarasa generaría levana y glucosa como subproducto de reacción, que efectivamente fue detectada, como se muestra en la Figura 27 b-c y 28. Sorprendentemente, y como consecuencia también de la importante actividad levansacarasa, para cada adición de sacarosa se logra obtener 100 % de conversión después de 24 h de reacción en todos los casos conclusión derivada de no detectar sacarosa. Es importante señalar también que no se detecta fructosa libre, lo que implica o bien que no hay hidrólisis de la sacarosa, o bien, que la fructosa es consumida por *P. pastoris* tan rápido como la glucosa, subproducto de reacción que tampoco se acumula en el medio. Una tercera posibilidad es que la fructosa sea usada como aceptor de la enzima generando levanobiosa. Este resultado se mantiene sin modificaciones en las 24 h posteriores.

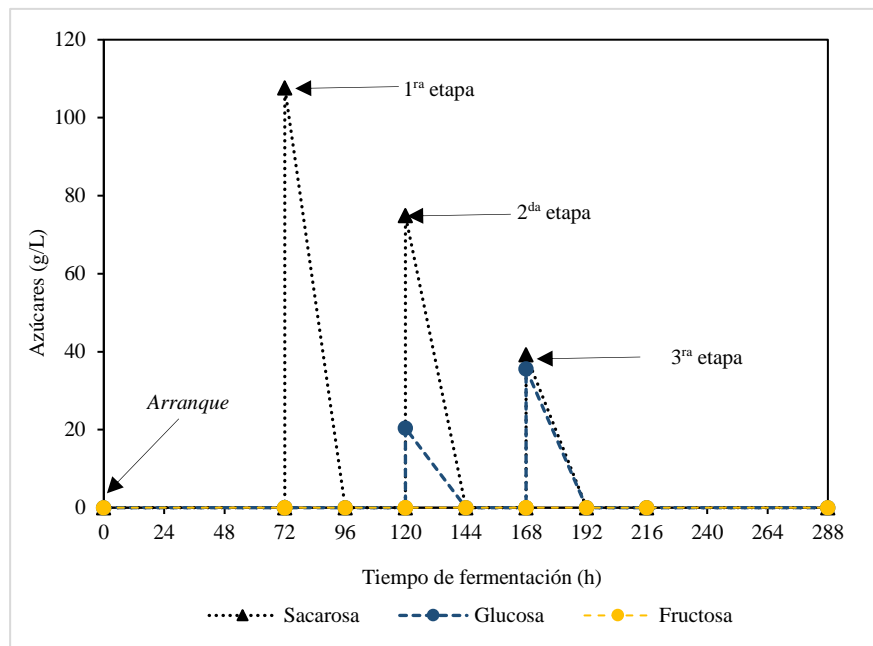


Figura 28. Evolución de la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa durante el proceso de PEREEM para la síntesis de L-FOS con la enzima LevB₁SacB empleando una concentración global de 300 g/L de sacarosa suministrada en tres etapas. El proceso se desarrolló a 28 °C y 200 rpm, en un volumen de reacción de 0.1 L

Finalmente se llevó a cabo la cuantificación del producto principal, es decir los L-FOS. Para esto se empleó la enzima comercial Fructozyme L de Novozyme, que es capaz de hidrolizar las fructanas y los FOS hasta unidades de fructosa. De esta forma es posible afirmar que se obtuvieron 8.62 g de L-FOS totales al final del proceso a partir de 30 g de sacarosa adicionada en 3 etapas en un tiempo total de 288 h a partir de la etapa de *arranque* del proceso, lo que equivale a un rendimiento de 28.7 g de L-FOS por 100 g de sacarosa.

En la Tabla 3 se muestra la conclusión del proceso de PEREEM desarrollado a nivel matraz. Podemos concluir, con base en el presente sistema y bajo las condiciones propuestas en el presente proyecto que es posible obtener L-FOS libres de monosacáridos. Cabe señalar que otro de los parámetros de particular interés en el presente sistema fue el seguimiento al crecimiento de la levadura, ya que como se describió anteriormente permitió purificar de manera parcial el producto principal (L-FOS) mediante el consumo de los monosacáridos subproductos de reacción, en términos de este parámetro se alcanzó una DO_{600nm} de 23.23, 22.76 y 22.92 equivalente a 5.35, 5.23 y 5.27 gDCW/L a las 120, 168 y 288 h del proceso.

Tabla 3. Evaluación por etapas para el sistema de PEREEM desarrollado a nivel matraz empleando el sistema de expresión y consumo de monosacáridos de *P. pastoris* X-33

Sistema constitutivo X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB								
	Volumen (mL)	Tiempo (h)	Sacarosa (g)	Glucosa (g)	Fructosa (g)	Sacarosa residual (g)	L-FOS (g)	Biomasa (g)
1^{ra} etapa	50	48	10	0	0	0	2.5	0.267
2^{da} etapa	50	48	10	0	0	0	3.75	0.262
3^{ra} etapa	100	120	10	0	0	0	2.37	0.527
Total	200	216	30	0	0	0	8.62	1.056

Evaluación del proceso a nivel biorreactor

Una vez desarrollado el proceso a nivel matraz, se inició la última etapa del proyecto, llevando el proceso a mayor escala. Con este fin se planteó llevar a cabo la experimentación en un biorreactor agitado de 1 L, empleando 0.8 L de volumen de reacción-fermentación (V_f), guardando la misma secuencia de etapas y condiciones que las realizadas a nivel matraz, tanto en términos de la estrategia de alimentación y retiro del medio de cultivo, tal y como se especificó en la sección de M&M. Las principales diferencias en este segundo experimento fueron el control de pH y de oxígeno disuelto a través de la aireación/agitación del cultivo, según se describió en M&M.

El proceso en biorreactor tuvo una duración de 59 h, durante las cuales se midió crecimiento celular, actividad enzimática medida como levansacarasa y endolevanasa, perfil de levana y L-FOS, así como la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa, en diferentes etapas del proceso.

En la Figura 29 se reporta la cinética de crecimiento de la transformante, en donde se observa que, en la fase de *arranque*, durante las primeras 35 h de fermentación, el crecimiento de *P. pastoris* estuvo asociado al consumo de glucosa contenida en el medio BM-Y inicial, alcanzando para este punto 4.95 gDCW/L. Posteriormente, después de cada adición de sacarosa, nuevamente se observa el crecimiento del microorganismo, pero esta vez asociado al consumo de monosacáridos generados como subproductos de la reacción de la enzima de fusión sobre sacarosa, alcanzando 17.05 y 17.48 gDCW/L después de 53 y 59 h de fermentación que fue la duración de las dos etapas subsecuentes. Comparado los resultados obtenidos en biorreactor con los obtenidos a nivel matraz, es notable que el proceso desarrollado en fermentador fue más eficiente en términos de crecimiento debido a la influencia de aireación, lo que favoreció que se alcanzaran mayores densidades celulares en menor tiempo. Del mismo modo, el control de pH tiene un efecto sobre la estabilidad y la actividad de ambos componentes de la proteína de fusión.

En la Figura 30 se reporta la actividad enzimática producida durante el cultivo. En la figura se puede observar como la actividad volumétrica se va incrementando a lo largo del tiempo de fermentación para la actividad levansacarasa, alcanzando un total de 15,120 U/L al final del proceso, mientras que la actividad endolevanasa alcanzó 850 U/L. Al igual que en los experimentos preliminares del proyecto, constatamos nuevamente que la actividad endolevanasa

está siendo afectada negativamente, ya que se esperaría una actividad de 10,878 U/L de mantenerse el comportamiento observado en la proteína expresada en *E. coli* (Porras-Domínguez, 2018), aunque resultó mayor que el dato obtenido en el ensayos de expresión a nivel matraz donde se obtuvo 4048 U/L de actividad levansacarasa y 112 U/L de actividad endolevanasa después de 72 h de cultivo.

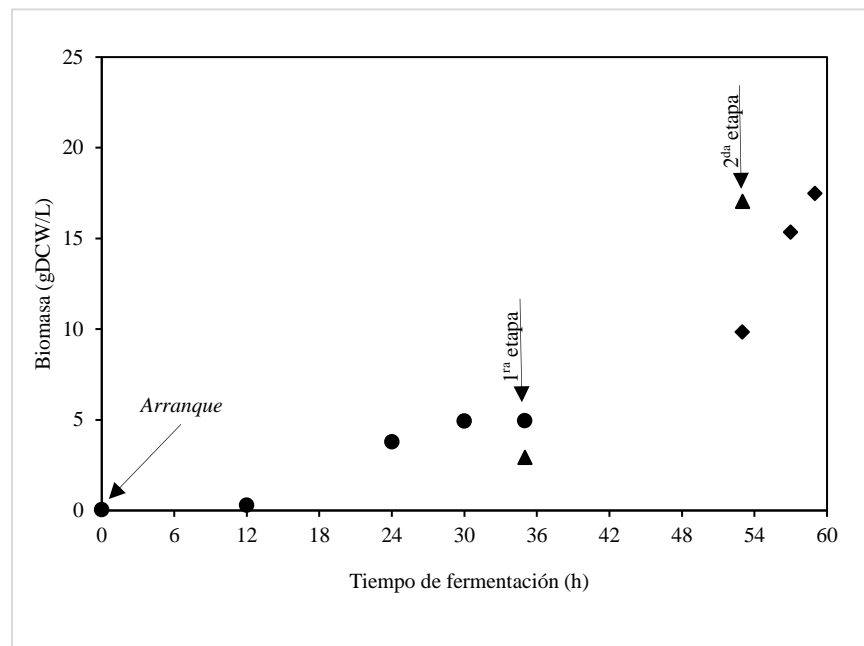


Figura 29. Cinética de crecimiento de *P. pastoris* en el sistema X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB en medio BM-Y en el proceso de PEREEM en dos etapas, con adiciones de sacarosa (ver detalles en el texto y en M&M)

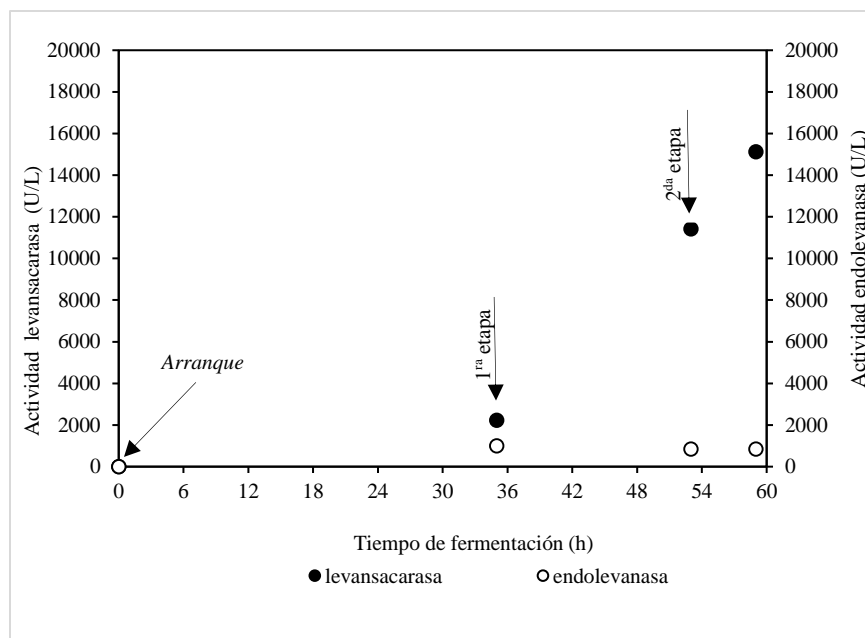


Figura 30. Evolución de las actividades levansacarasa y endolevanasa en el sistema X-33/pGAPZ α A-LevB $_1$ SacB en medio BM-Y en el proceso de PEREEM en dos etapas, con adiciones de sacarosa (ver detalles en el texto y en M&M)

El perfil de L-FOS obtenido a lo largo de las diferentes etapas del proceso de PEREEM se muestra en la Figura 31. Después de las primeras 18 h de reacción se observa que el perfil de L-FOS presenta un GP máximo de 8, en el predominan principalmente los FOS de la serie Fn, es decir que no poseen glucosa inicial, obtenidos a partir de la hidrólisis tipo endo sobre levana. Posteriormente, cuando se inicia la segunda adición de sacarosa, se observa rápidamente la síntesis de L-FOS de mayor GP, asociado a una mayor actividad levansacarasa. En este punto, la actividad levansacarasa fue 5 veces mayor que el inicio de la reacción (11.42 vs 2.22 U/mL de actividad levansacarasa). Al finalizar el proceso, el GP alcanzado fue de 10 en donde nuevamente se observa que predominan L-FOS de la serie Fn. Es notable la gran diferencia en el perfil de L-FOS al finalizar las dos adiciones de sacarosa, ya que, en la segunda adición, hubo un menor tiempo de reacción de la endolevanasa para actuar sobre la levana comparado con las 18 h que duró en la primera adición. Esto dio lugar a una hidrólisis mucho más extensa, disminuyendo el GP de los productos, tanto de la serie GFn, como de la serie Fn.

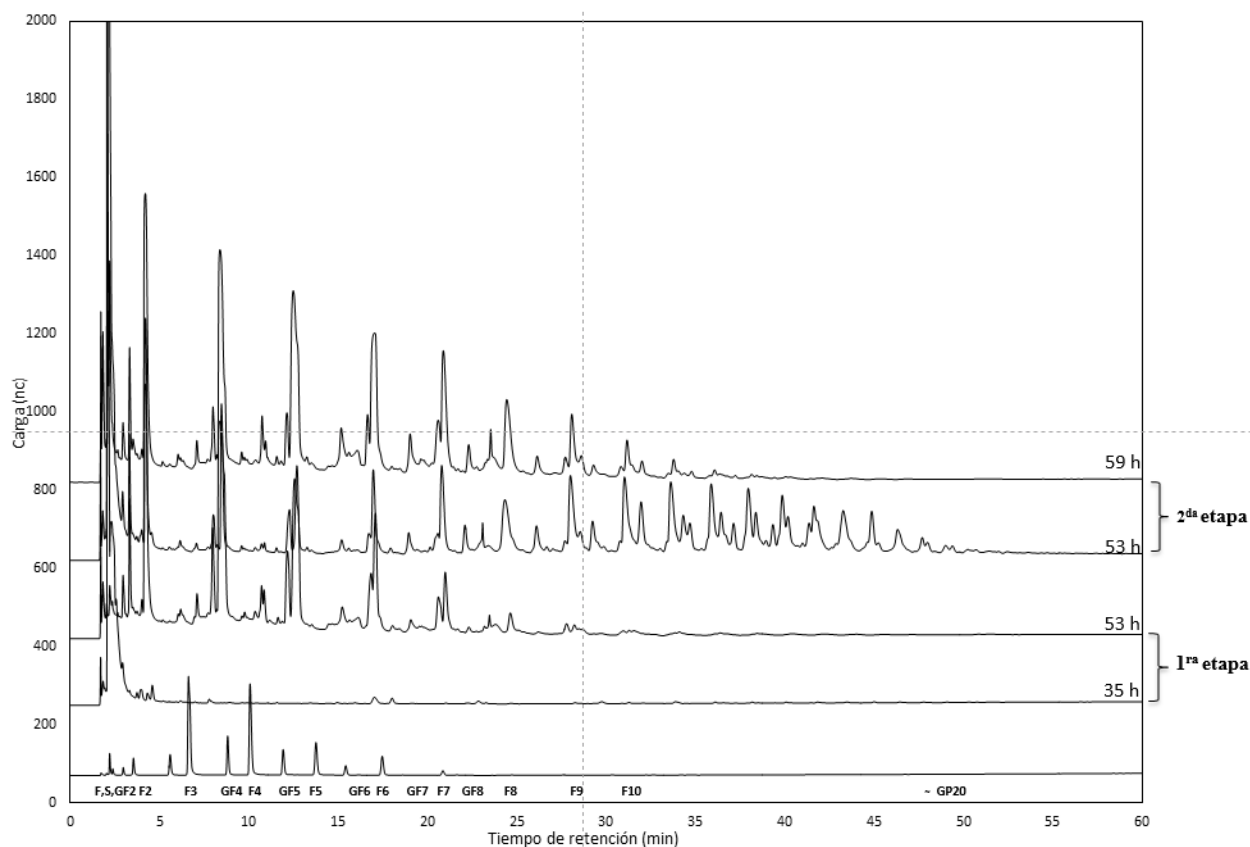


Figura 31. Evolución del perfil de L-FOS producidos durante la síntesis con LevB₁SacB, en un sistema de PEREEM, llevado a cabo por etapas, para una concentración global de 200 g/L de sacarosa. El proceso se desarrolló a 28 °C y 200-1200 rpm, en un volumen de reacción de 0.8 L.

La caracterización de la levana sintetizada se reporta en la Figura 32 (a y b). En la Figura 32a se observa que cuando se lleva a cabo la primera adición de sacarosa (35 h) se detecta la presencia de una señal que corresponde a la levana de alto peso molecular de la misma forma que aparece la señal que corresponde a los L-FOS. Transcurridas 18 h del proceso el polímero sintetizado se hidroliza para aumentar la cantidad del producto principal. Por otro lado, en lo que respecta a la segunda adición de sacarosa se hace visible nuevamente la síntesis de polímero de alto peso molecular y L-FOS de mayor GP. Finalmente, al concluir el proceso se observa hidrólisis del polímero de alto peso molecular, así como de los L-FOS de mayor GP lo que genera a su vez genera un incremento en la cantidad de L-FOS de menor tamaño (GP 10).

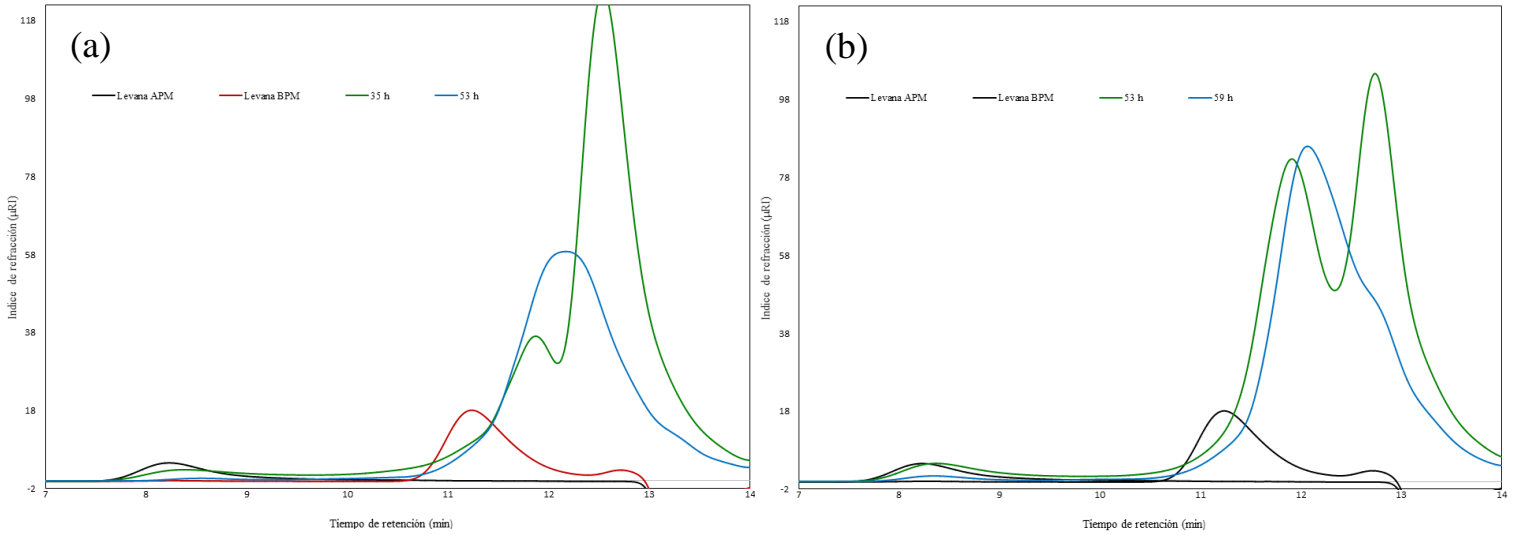


Figura 32. Evolución en la producción de levanas durante la síntesis con LevB₁SacB, en un sistema de PEREEM, llevado a cabo por etapas, para una concentración global de 200 g/L. El proceso se llevó a cabo a 28 °C y 200-1200 rpm, en un volumen de reacción de 0.8 L. (a) 1^{ra} etapa, (b) 2^{da} etapa del sistema descrito

En la Figura 33 se reporta la cinética de consumo de sacarosa, liberación de glucosa y fructosa. Se observa, que después de transcurridas 18 h de la primera etapa, la sacarosa adicionada se consume en su totalidad. En este punto tampoco se detecta glucosa ni fructosa en el medio de cultivo/reacción. En cuanto a la segunda etapa, a las 53 h, se observa que desde los primeros minutos después de la adición de sacarosa, da inicio la liberación de glucosa al medio de reacción; al concluirse el proceso, a las 59 h, aun se detecta una cierta cantidad de sacarosa residual, pero nuevamente, no son detectables los monosacáridos.

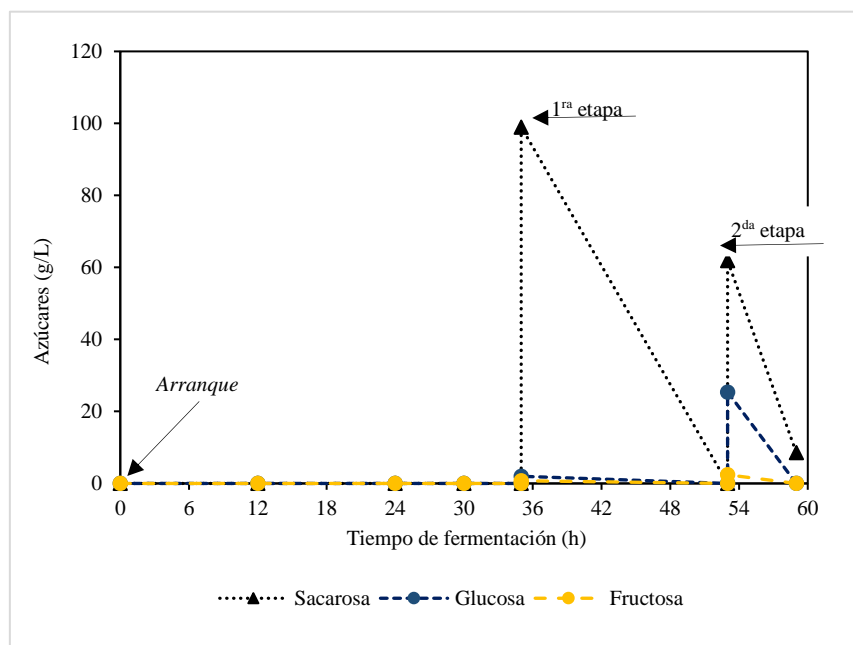


Figura 33. Evolución de la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa durante el proceso de PEREEM para la síntesis de L-FOS con la enzima LevB₁SacB empleando una concentración global de 200 g/L de sacarosa suministrada en dos etapas. El proceso se desarrolló a 28 °C y 200-1200 rpm, en un volumen de reacción de 0.8 L

Finalmente, mediante este proceso desarrollado a nivel biorreactor, se obtuvieron 72.9 g de L-FOS al final del proceso de PEREEM, a partir de 160 g de sacarosa adicionada en dos etapas en un tiempo total de 59 h, equivalente a un rendimiento global de 45.5 % (g de L-FOS por 100 g de sacarosa), netamente superior al alcanzado a nivel matraz.

Como conclusión, en el proceso de PEREEM a nivel biorreactor, se logró obtener el mismo comportamiento en términos de producción de L-FOS libres de monosacáridos y crecimiento de *P. pastoris* lográndose el consumo de los subproductos generados (Tabla 4).

Tabla 4. Evaluación por etapas para el sistema de PEREEM desarrollado a nivel biorreactor empleando el sistema de expresión y consumo de monosacáridos de *P. pastoris* X-33

Sistema constitutivo X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB										
	Volumen (mL)	Tiempo (h)	Sacarosa (g)	Actividad volumétrica SacB (U/L)	Actividad volumétrica LevB ₁ (U/L)	Glucosa (g)	Fructosa (g)	Sacarosa (g)	L-FOS (g)	Biomasa (g)
1^{ra} etapa	400	18	80	11,420	850	0	0	0	16.38	7.87
2^{da} etapa	800	6	80	15,120	850	0	0	6.83	56.48	13.98
Total	1200	24	160	-----	-----	0	0	6.83	72.86	21.85

Comparando el desarrollo de ambos sistemas es claro que el proceso llevado a cabo a nivel biorreactor trae consigo muchas ventajas con respecto al proceso desarrollado a nivel matraz. La primera es que *P. pastoris* puede crecer hasta una alta densidad celular cuando se cultiva en biorreactor, la razón principal de que esto suceda es que en este es posible monitorear y controlar simultáneamente parámetros como pH, aireación y la velocidad de alimentación de la fuente de carbono (Cereghino & Cregg, 2000; Cregg et al., 2000; Daly & Hearn, 2005; Macauley-Patrick., 2005). Como se describió anteriormente esta ventaja se hizo claramente evidente en el proceso desarrollado a este nivel. Un aspecto particularmente positivo de esta característica es que la concentración de proteína secretada en el medio de cultivo también se vio favorecida. Se ha reportado en la literatura que el crecimiento de *P. pastoris* es especialmente importante para las proteínas heterólogas secretadas, ya que su concentración en el medio de cultivo es proporcional a la concentración celular (Cereghino & Cregg, 2000; Cregg et al., 2000). La segunda ventaja de emplear el biorreactor en el sistema de PEREEM, es la que se relaciona con el aumento de la eficiencia del proceso. Debido a una mayor producción constitutiva de la enzima de fusión, asociada a un consumo mucho más rápido de la fuente de carbono por la levadura, se logró obtener el producto (L-FOS) libres de monosacáridos (glucosa y fructosa) nueve veces más rápido que en el matraz de agitación y con un rendimiento de producción de L-FOS con respecto a la sacarosa de casi el doble.

Resultados finales

Como resultados finales, es necesario comparar los sistemas de PEREEM desarrollados en el presente proyecto con respecto al proceso de síntesis de L-FOS empleando el biocatalizador de fusión expresado en *E. coli*, en este último sistema se requiere la purificación de los L-FOS para eliminar glucosa, fructosa y sacarosa residual que se acumulan en grandes cantidades al final del proceso. Por otro lado, la fructosa, producto de la hidrólisis de la sacarosa y la glucosa, subproducto de la reacción de síntesis de L-FOS, además de causar inhibición a la reacción, no permiten alcanzar conversiones de sacarosa del 100 %, mientras que con el sistema desarrollado en *P. pastoris* al eliminarse estos compuestos la eficiencia de la reacción es sensiblemente mejor, como se resume en los resultados que se presentan en la Tabla 5. Por otro lado, el proceso desarrollado a nivel biorreactor muestra un rendimiento mayor al obtenido a nivel matraz (45.5 vs 28.7 g de L-FOS por 100 g de sacarosa) en el sistema de PEREEM como resultado del ambiente controlado que se tuvo, se observa también que se obtuvo un rendimiento similar al del biocatalizador de fusión con la enorme ventaja de que en este sistema se obtiene un producto parcialmente puro libre de los subproductos contaminantes de reacción.

Tabla 5. Balance de los componentes presentes en el sobrenadante de cultivo para la clona X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB en relación con los componentes de reacción obtenidos para LevB₁SacB expresada en *E. coli* Rosseta 2 (Porrás-Domínguez, 2017)

	Tiempo (h)	L-FOS/Sacarosa (g/ g)	Glucosa (g)	Fructosa (g)	Sacarosa residual (g)	GP máximo alcanzado
X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB (Matraz)	288	0.28	0	0	0	20
X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB (Biorreactor)	59	0.45	0	0	6.83	10
Rosetta 2/PET-22 (+) LevB₁SacB	6	0.41	54 g/L	234 g/L	65 g/L	10

Por otro lado para obtener el perfil de L-FOS empleando el biocatalizador de fusión expresado en *E. coli* es necesario llevar a cabo la reacción durante 6 h de manera precisa, para evitar que los L-FOS sean hidrolizados (Figura 34c), mientras que en el presente sistema, los problemas asociados

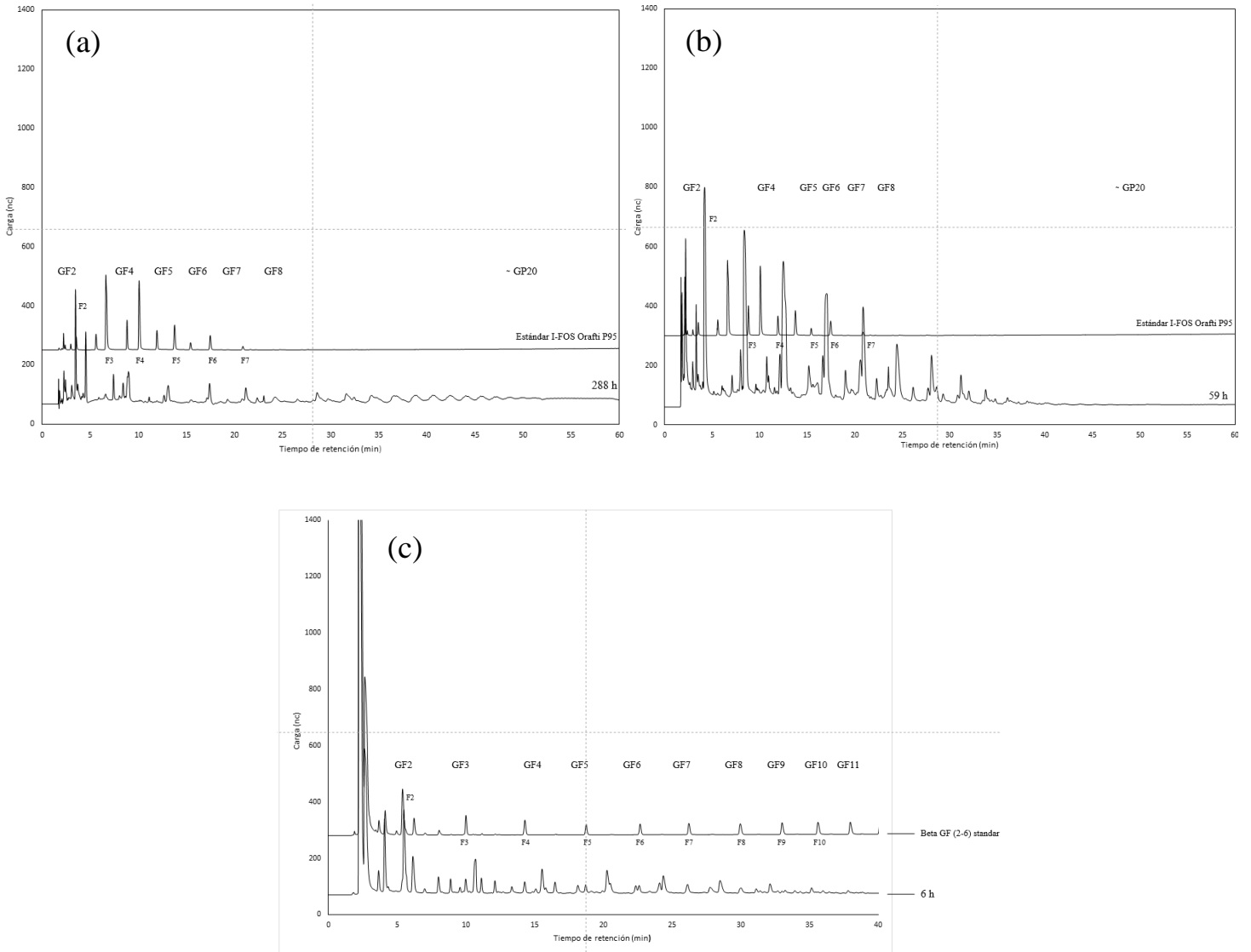


Figura 34. Perfil de L-FOS obtenido en los sistemas propuestos para la síntesis de L-FOS empleando el biocatalizador de fusión. (a) Sistema de PEREEM a nivel matraz, (b) sistema de PEREEM a nivel fermentador y (c) biocatalizador de fusión expresado en *E. coli* Rosetta 2

con la baja actividad de la endolevanasa en LevB₁SacB durante la síntesis de L-FOS obligaron por un lado a extender el tiempo de reacción para llegar a los perfiles de L-FOS reportados (Figura 34 a y b), lo que permitió por un lado que *P. pastoris* consumiera los monosacáridos generados, pero muy particularmente, dar el tiempo necesario para la obtención de L-FOS, sin que estos se perdieran por una hidrólisis extensiva.

Es importante destacar que durante la evolución de síntesis de L-FOS en los sistemas de PEREEM se detectó levana de alto peso molecular la cual finalmente fue hidrolizada por la endolevanasa al final del proceso permitiendo tener un perfil de L-FOS libre de este polímero (Figura 35 a y b).

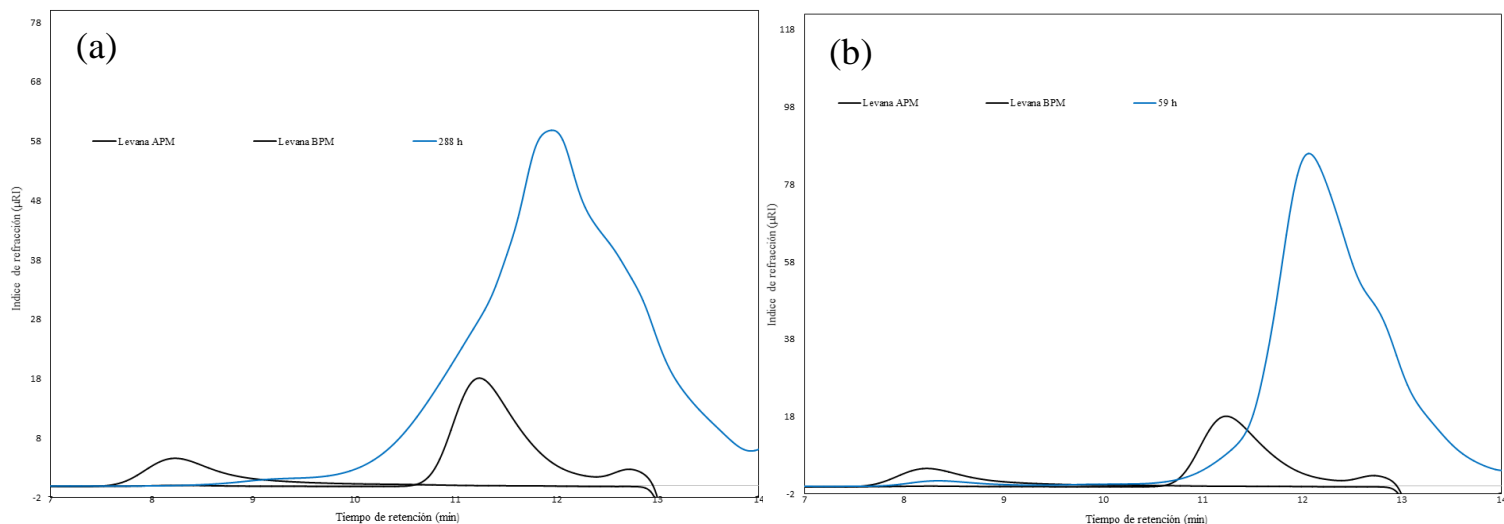


Figura 35. Perfil de levana obtenido en los sistemas propuestos para la síntesis de L-FOS empleando el biocatalizador de fusión. (a) Sistema de PEREEM a nivel matraz y (b) sistema de PEREEM a nivel biorreactor

Con el trabajo desarrollado en el presente proyecto quedo demostrado que es posible desarrollar un proceso simultáneo de PEREEM todo en un solo reactor que permita la producción de L-FOS libre de monosacáridos.

9. CONCLUSIONES

- El sistema de producción LevB₁SacB en *P. pastoris* X-33 es más eficiente en el sistema de expresión inducible por metanol bajo el control del promotor pAOX1, que en el sistema con expresión constitutiva bajo el control del promotor pGAP.
- La relación levansacarasa/endolevanasa resultó ser 46 en el sistema inducido por metanol y 36 en el sistema constitutivo con el promotor pGAP, debido a la baja actividad de la endolevanasa, lo cual contrasta con la enzima de fusión expresada en *E.coli* cuya relación es 1.39.
- A pesar de la limitada actividad endolevanasa, se logró establecer un sistema de síntesis de L-FOS a nivel matraz, libre de monosacáridos (glucosa y fructosa) y sacarosa. El perfil cromatográfico de los L-FOS permitió determinar que tienen un GP entre 2 y 20 unidades de fructosa, constituidos principalmente de levanobiosa (F₂) y de una gama de productos correspondientes a la serie Fn.
- Se logró establecer un sistema de síntesis de L-FOS a nivel biorreactor, libre de monosacáridos (glucosa y fructosa) y con un mínimo de sacarosa. El perfil cromatográfico mostró tener un GP de entre 2 y 10 unidades de fructosa, consistiendo principalmente de levanobiosa (F₂) y de una gama de productos correspondientes a la serie Fn.
- El sistema de PEREEM resultó ser más eficiente a nivel biorreactor que a nivel matraz, resultado de obtener 45.5 g y 28.7 g de L-FOS, respectivamente por cada 100 g de sacarosa.
- Se demostró que es posible desarrollar un sistema de PEREEM con *P. pastoris*, mediante el cual se llevó a cabo la expresión de la fusión LevB₁SacB, secreción de la enzima de fusión LevB₁SacB, la reacción de síntesis de L-FOS a partir de sacarosa y el consumo de los monosacáridos generados.

10. PERSPECTIVAS

- Dado los resultados obtenidos en el presente proyecto, es necesario llevar a cabo el estudio de síntesis de L-FOS empleando mayores concentraciones de sacarosa con la finalidad de favorecer la reacción de transferencia e incrementar la formación de L-FOS, pero al mismo tiempo no inhibir el crecimiento de *P. pastoris*.
- Realizar en proceso de PEREEM en medios mínimos, con la finalidad de que los componentes no interfieran en la calidad del producto.

11. PRODUCTOS

- Resultados del apartado 8.2 junto con resultados reportados previamente en la tesis de licenciatura “Montiel Salgado Silvia (2017). Producción de Fructooligosacáridos tipo levana por vía enzimática. Presentada en el Tecnológico de Zacatepec para obtener el grado de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica. México.” Concluyeron en la publicación del artículo siguiente:

Porras-Domínguez J.R., Rodríguez-Alegría M.E., Ávila-Fernández Á., Montiel-Salgado S., y López-Munguía, A., (2017). Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrase-endolevanase fusion enzyme (LevB₁SacB). *Carbohydrate Polymers* 177:40-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.040>.

- Derivado de este trabajo de investigación se publicó el siguiente artículo:

Ávila-Fernández Á., Montiel S., Rodríguez-Alegría M.E., Caspeta L., y López-Munguía, A. (2023). Simultaneous enzyme production, Levan-type FOS synthesis and sugar by-products elimination using a recombinant *Pichia pastoris* strain expressing a levansucrase-endolevanase fusion enzyme. *Microbial Cell Factories* 22:18. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-02009-7>.

- Resultados del apartado 8.2 junto con resultados reportados previamente en la tesis de licenciatura “Montiel Salgado Silvia (2017). Producción de Fructooligosacáridos tipo levana por vía enzimática. Presentada en el Tecnológico de Zacatepec para obtener el grado de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica. México.” Concluyeron en la presentación del trabajo: “Levan-type fructooligosaccharides production by enzymatic synythesis” mediante un poster en el 4º Iberoamerican Congress on Biorrefineries 2018. Oct 24-26, 2018, Jaen España.
- Resultado de seleccionar un sistema de expresión (constitutivo e inducible) en *Pichia pastoris* para el desarrollo del sistema PEREEM se presentó el siguiente poster: “Expresión

de una enzima de fusión en *Pichia pastoris* para la síntesis de fructooligosacáridos” en el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 2019. León, Guanajuato, 23-28 de Junio 2019.

- Derivado de este trabajo de investigación se presentó el poster: “Fed batch levan-type FOS synthesis and sugar byproducts elimination by a recombinant *Pichia pastoris* strain expressing a gene coding for a levansucrase-endolevanase fusion protein” en el 4th International Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability 2023. May 14-17, 2023 Lake Garde.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5301–5317. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>
- Ávila-Fernández, Á., Galicia-Lagunas, N., Rodríguez-Alegría, M. E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2011). Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chemistry*, 129(2), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.088>
- Ávila-Fernández, Á., Olvera-Carranza, C., Rudiño-Piñera, E., Cassab, G. I., Nieto-Sotelo, J., & López-Munguía, A. (2007). Molecular characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Plant Science*, 173(4), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.07.009>
- Bali, V., Panesar, P. S., Bera, M. B., & Panesar, R. (2015). Fructo-oligosaccharides: Production, Purification and Potential Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1475–1490. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.694084>
- Bause, E., & Legler, G. (1981). The role of the hydroxy amino acid in the triplet sequence Asn-Xaa-Thr(Ser) for the N-glycosylation step during glycoprotein biosynthesis. *The Biochemical Journal*, 195(3), 639–644. <https://doi.org/10.1042/bj1950639>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid a sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteing utilizin the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00029-7)
- Clare, J. J., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Sreekrishna, K., & Romanos, M. A. (1991). High-

- level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology*, 9(5), 455–460. <https://doi.org/10.1038/nbt0591-455>
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 16(1), 23–52. <https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23>
- Daly, R., & Hearn, M. T. W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 18(2), 119–138. <https://doi.org/10.1002/jmr.687>
- Damasceno, L. M., Huang, C. J., & Batt, C. A. (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 31–39. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3654-z>
- Doyon, Y., Home, W., Daull, P., & Bel, D. L. E. (2002). *A -Amylase Secretion and Activity*. 264, 259–264.
- Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S287–S291. <https://doi.org/10.1079/bjn/2002550>
- Ganaie, M. A., Lateef, A., & Gupta, U. S. (2014). Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), 2143–2159. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0661-9>
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. Van, Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259–275. <https://doi.org/10.1079/nrr200479>
- Holst, B., Bruun, A. W., Kielland-Brandt, M. C., & Winther, J. R. (1996). Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum. *The EMBO Journal*, 15(14), 3538–3546. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00723.x>
- Hong, F., Meinander, N. Q., & Jönsson, L. J. (2002). Fermentation strategies for improved

- heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(4), 438–449. <https://doi.org/10.1002/bit.10297>
- Kang, H. K., Kim, D., Yun, S. Il, Lim, T. Y., & Xia, Y. M. (2011). Cloning of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* and Its expression in *pichia pastoris*. *Food Science and Biotechnology*, 20(1), 277–281. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0039-0>
- Ko, H., Bae, J. H., Sung, B. H., Kim, M. J., Park, H. J., & Sohn, J. H. (2019). Microbial production of medium chain fructooligosaccharides by recombinant yeast secreting bacterial inulosucrase. *Enzyme and Microbial Technology*, 130(May), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109364>
- Lafraya, Á., Sanz-Aparicio, J., Polaina, J., & Marín-Navarro, J. (2011). Fructo-oligosaccharide synthesis by mutant versions of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6148–6157. <https://doi.org/10.1128/AEM.05032-11>
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249–270. <https://doi.org/10.1002/yea.1208>
- Menéndez, C., Hernández, L., Banguela, A., & País, J. (2004). Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(5), 446–452. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.11.018>
- Meng, G., & Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural Biology*, 10(11), 935–941. <https://doi.org/10.1038/nsb974>
- Meulenbeld, G. H., Zuilhof, H., Van Veldhuizen, A., Van Den Heuvel, R. H. H., & Hartmans, S. (1999). Enhanced (+)-catechin transglucosylating activity of *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D due to fructose removal. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4141–4147. <https://doi.org/10.1128/aem.65.9.4141-4147.1999>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.

Analytical Chemistry, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Mochizuki, S., Hamato, N., Hirose, M., Miyano, K., Ohtani, W., Kameyama, S., Kuwae, S., Tokuyama, T., & Ohi, H. (2001). Expression and characterization of recombinant human antithrombin III in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 23(1), 55–65. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1479>

Muñoz-Gutiérrez, I., Rodríguez-Alegría, M. E., & López Munguía, A. (2009). Kinetic behaviour and specificity of β -fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans. *Process Biochemistry*, 44(8), 891–898. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.013>

Nobre, C., Castro, C. C., Hantson, A. L., Teixeira, J. A., De Weireld, G., & Rodrigues, L. R. (2016). Strategies for the production of high-content fructo-oligosaccharides through the removal of small saccharides by co-culture or successive fermentation with yeast. *Carbohydrate Polymers*, 136, 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.088>

Nobre, C., Gonçalves, D. A., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2018). One-step co-culture fermentation strategy to produce high-content fructo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 201(May), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.051>

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 and Selection*, 21(10), 589–595. <https://doi.org/10.1093/protein/gzn036>

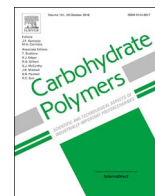
Porras-Dominguez, J. R. (2012). Obtencion de Fructo-oligosacáridos a partir de levanas bacterianas mediante el uso de endolevanasas. Presentada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM para obtener el grado de Maestro en Ciencias. México

Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Escalante, A., González-Cervantes, R., Olvera, C., & López Munguía, A. (2014). Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochemistry*, 49(5), 783–790. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.02.005>

- Porras-Domínguez, J. R., Rodríguez-Alegría, M. E., Ávila-Fernández, Á., Montiel-Salgado, S., & López-Munguía, A. (2017). Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrase-endolevanase fusion enzyme (LevB1SacB). *Carbohydrate Polymers*, 177(May), 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.040>
- Porras-Domínguez, J. R. (2018). Estudio de la levansacarasa SacB y la endolevanasa LevB₁ para el diseño de un sistema simultáneo de producción de fructooligosacáridos a partir de sacarosa. Presentada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM para obtener el grado de Doctor en Ciencias. México
- Porras-Domínguez, J. R., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda, A., Alvarez Berber, L. P., Edmundo, C., & López Munguía, A. (2019). Fructooligosaccharides purification: Complexing simple sugars with phenylboronic acid. *Food Chemistry*, 285(January), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.130>
- Raga-Carbajal, E., López-Munguía, A., Alvarez, L., & Olvera, C. (2018). Understanding the transfer reaction network behind the non-processive synthesis of low molecular weight levan catalyzed by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32872-7>
- Raemaekers, R. J. M., De Muro, L., Gatehouse, J. A., & Fordham-Skelton, A. P. (1999). Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris*. Correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *European Journal of Biochemistry*, 265(1), 394–403. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00749.x>
- Ritsema, T., & Smeekens, S. (2003). Fructans: Beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00034-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00034-7)
- Roberfroid, M. B. (2007). Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of nutrition*, 137 (11), 2493S–2502S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2493S>
- Rydberg, E. H., Sidhu, G., Vo, H. C., Hewitt, J., Ct, H. C. F., Wang, Y., Numao, S., Macgillivray, R. T. A., Overall, C. M., Brayer, G. D., & Withers, S. G. (2008). Cloning, mutagenesis, and

- structural analysis of human pancreatic α -amylase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Science*, 8(3), 635–643. <https://doi.org/10.1110/ps.8.3.635>
- Singh, R. S., Singh, R. P., & Kennedy, J. F. (2016). Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85(January), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.026>
- Sinha, J., Plantz, B. A., Inan, M., & Meagher, M. M. (2004). *Causes of Proteolytic Degradation of Secreted Recombinant Proteins Produced in Methylophilic Yeast Pichia pastoris : Case Study With Recombinant Ovine Interferon- T*. <https://doi.org/10.1002/bit.20318>
- Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H., & Czermak, P. (2015). Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 202, 118–134. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.027>
- Trujillo, L. E., Arrieta, J. G., Dafhnis, F., García, J., Valdés, J., Tambara, Y., Pérez, M., & Hernández, L. (2001). Fructo-oligosaccharides production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(2–3), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00290-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00290-8)
- Vassileva, A., Chugh, D. A., Swaminathan, S., & Khanna, N. (2001). Expression of hepatitis B surface antigen in the methylophilic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *Journal of Biotechnology*, 88(1), 21–35. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00254-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00254-1)
- 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), 1763–1778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04120.x>
- Vijn, I., & Smeekens, S. (1999). Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology*, 120(2), 351–359. <https://doi.org/10.1104/pp.120.2.351>
- Werten, M. W. T., Van Den Bosch, T. J., Wind, R. D., Mooibroek, H., & De Wolf, F. A. (1999).

- High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*, 15(11), 1087–1096.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199908\)15:11<1087::AID-YEA436>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199908)15:11<1087::AID-YEA436>3.0.CO;2-F)
- Wu, J. M., Lin, J. C., Chieng, L. L., Lee, C. K., & Hsu, T. A. (2003). Combined use of GAP and AOX1 promoter to enhance the expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4), 453–459.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00147-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00147-9)
- Yang, Y. L., Wang, J. H., Teng, D., & Zhang, F. (2008). Preparation of high-purity fructo-oligosaccharides by *Aspergillus japonicus* β -fructofuranosidase and successive cultivation with yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2805–2809.
<https://doi.org/10.1021/jf703586q>
- You, W. K., Choi, W. S., Koh, Y. S., Shin, H. C., Jang, Y., & Chung, K. H. (2004). Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. *FEBS Letters*, 571(1–3), 67–73.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.060>
- Zhou, X., & Zhang, Y. (2002). *Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by Pichia pastoris by controlling the specific growth rate*. 1449–1453.



Research paper

Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrase-endolevanase fusion enzyme (LevB₁SacB)

Jaime R. Porras-Domínguez^a, María Elena Rodríguez-Alegría^a, Ángela Ávila-Fernández^b,
Silvia Montiel-Salgado^a, Agustín López-Munguía^{a,*}

^a Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^b 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 LevB₁SacB, a new enzyme resulting from the fusion of SacB, a levansucrase from *Bacillus subtilis* and LevB₁, an endolevanase from *B. licheniformis*. In the fusion enzyme, SacB retains its catalytic behavior with a decrease in kcat from 164 to 108 s⁻¹. LevB₁ in LevB₁SacB 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 LevB₁SacB or both enzymes (LevB₁ & 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 LevB₁SacB or LevB₁ & 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 neofractans (graminans ramified in the glucose C6) (Gomez, Tuohy, Gibson, Klinder, & Costabile, 2010; Kilian, Kritzing, 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 (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 μM) a shift in reaction mechanism is obtained at concentrations higher than 1.0 μM , 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 LevB₁, a recombinant endolevanase from *B. licheniformis*, with high endo-specificity for β -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, LevB₁ 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 LevB₁ 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 (OD₆₀₀) 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 CaCl₂, pH 6.0

2.2. Endolevanase LevB₁ expression and purification

Recombinant endolevanase LevB₁ 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 OD₆₀₀ 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 NiSO₄ 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. LevB₁ was recovered at 180 mM imidazole. Finally, the eluted enzyme was dialyzed against 50 mM sodium acetate buffer, 1 mM CaCl₂ and pH 6.0.

2.3. Cloning and expression of LevB₁SacB, the fusion protein gene

The corresponding C-terminal end of LevB₁ 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). 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 OD₆₀₀ 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 (LevB₁SacB) 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 LevB₁SacB has a molecular weight of 107 kDa.

2.4. Standard activity assay

Levansucrase activity was assayed in 600 μl reactions at 37 °C in 50 mM acetate buffer (pH 6.0) containing 1 mM CaCl₂ 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 μmol of reducing sugars per minute. Endolevanase activity assays were performed at 37 °C in 600 μl 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 μmol 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 μM or 1.0 μM 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, 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 μM 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 LevB₁SacB, 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 CaCl_2 (pH 6.0) in a 1 ml volume assay also at 35 °C. The effect of temperature on LevB₁SacB 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[®] 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 μl 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 LevB₁SacB 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 (LevB₁) concentration ratio on product profile was first studied. For this purpose, two SacB concentrations were defined (0.1 μM and 1 μM) 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:LevB₁ ratios were performed, starting from an equimolar ratio (SacB:LevB₁ 1:1) and up to an endolevanase excess (SacB:LevB₁ 1:100 or 1:20, for the 0.1 μM and 1 μM 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 dextranucrase/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/LevB₁ 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 μM 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 μM SacB concentration, high Mw levan is present. A SacB/LevB₁ ratio of 1:1 at 1 μM 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,

SacB 1 μM reactions

SacB 0.1 μM reactions

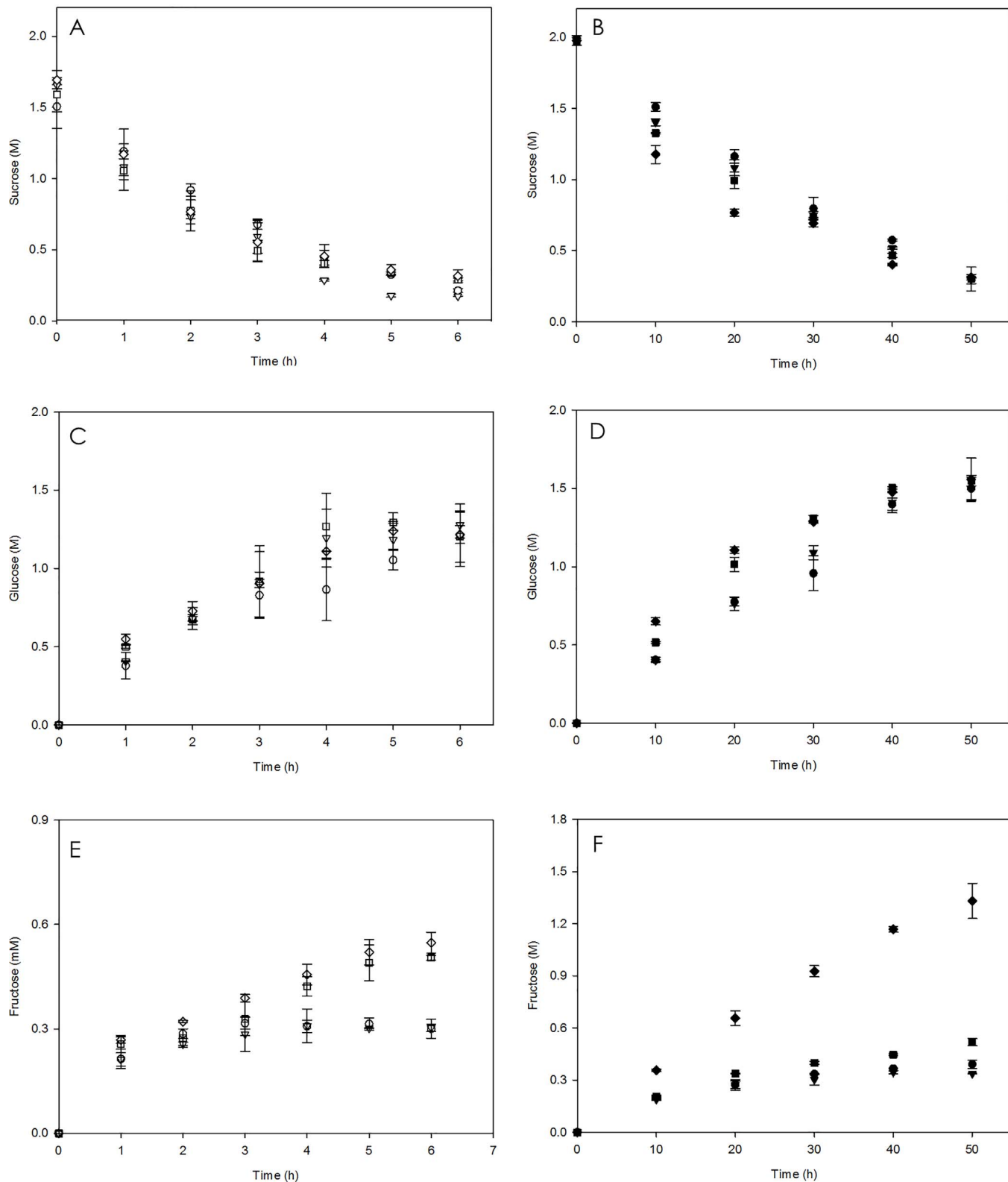


Fig. 1. Evolution of sucrose (A & B) consumption and glucose (C & D) and fructose (E & F) release at different SacB/LevB₁ ratios from 600 g/l sucrose at 37 °C, pH 6.0 50 mM acetate buffer and 1 mM CaCl₂. Open symbols correspond to reactions at 1 μM of SacB at different SacB/LevB₁ ratios 1–0 (circle), 1–1 (triangle), 1–10 (square) and 1–20 (rhomb). Closed symbols correspond to reactions at 0.1 μM of SacB at different SacB/LevB₁ ratios 1–0 (circle), 1–1 LevB₁ (triangle), 1–10 (square) and 1–100 (rhomb).

Table 1L-FOS synthesis yields obtained at different SacB/LevB₁ ratios.

SacB (μM)	LevB ₁ (μM)	SacB/LevB ₁ 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.

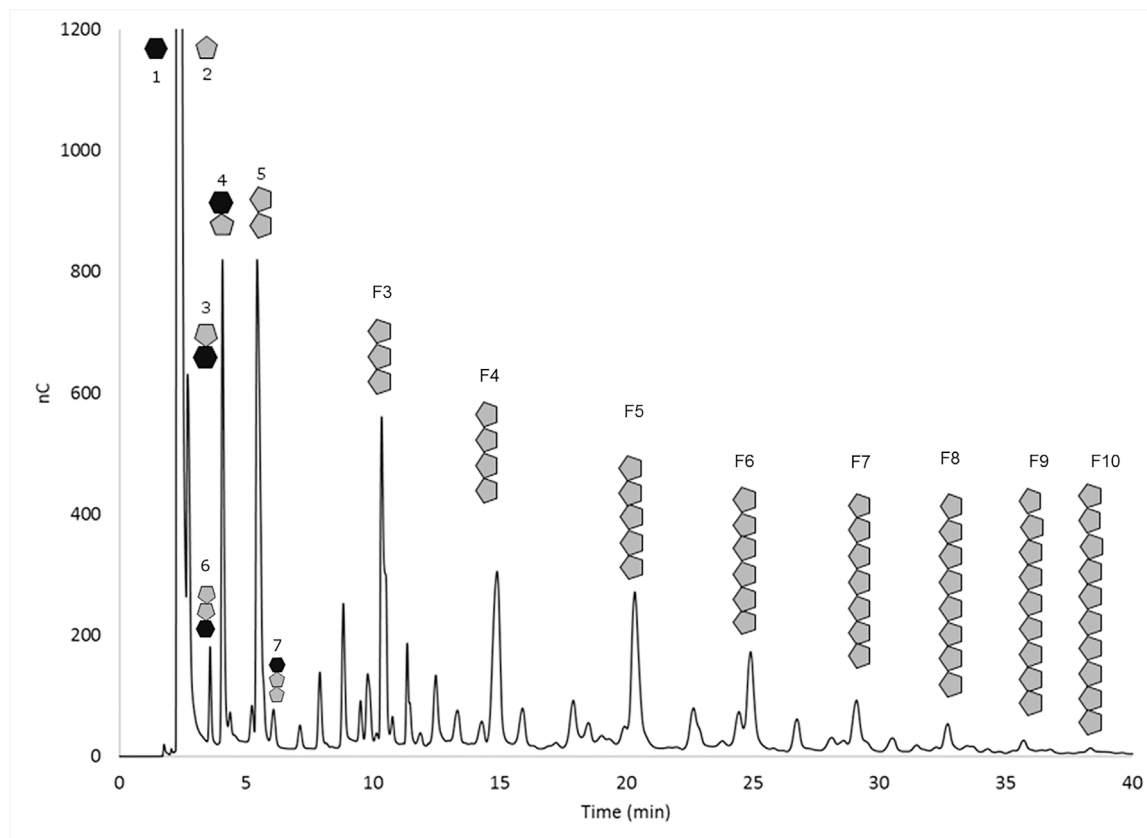


Fig. 2. L-FOS product profile observed by HPAEC-PAD, as obtained from SacB/LevB₁ reactions with 1 μM of each enzyme, 600 g/l sucrose, 37 °C, pH 6.0, 50 mM acetate buffer containing 1 mM CaCl₂. The figures over the chromatographic signals are drawn to give an idea of the most probable polymerization degree 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_n) resulting from direct SacB synthesis from sucrose, and oligolevans (F_n) series, resulting from LevB₁ endo-hydrolysis of levan chains, all reaching a certain molecular weight defined by LevB₁ 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/LevB₁ 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, LevB₁ 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 LevB₁ concentration, as shown in Table 1.

3.1.3. Kinetic characterization of LevB₁SacB

Considering the advantages of a LevB₁SacB 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

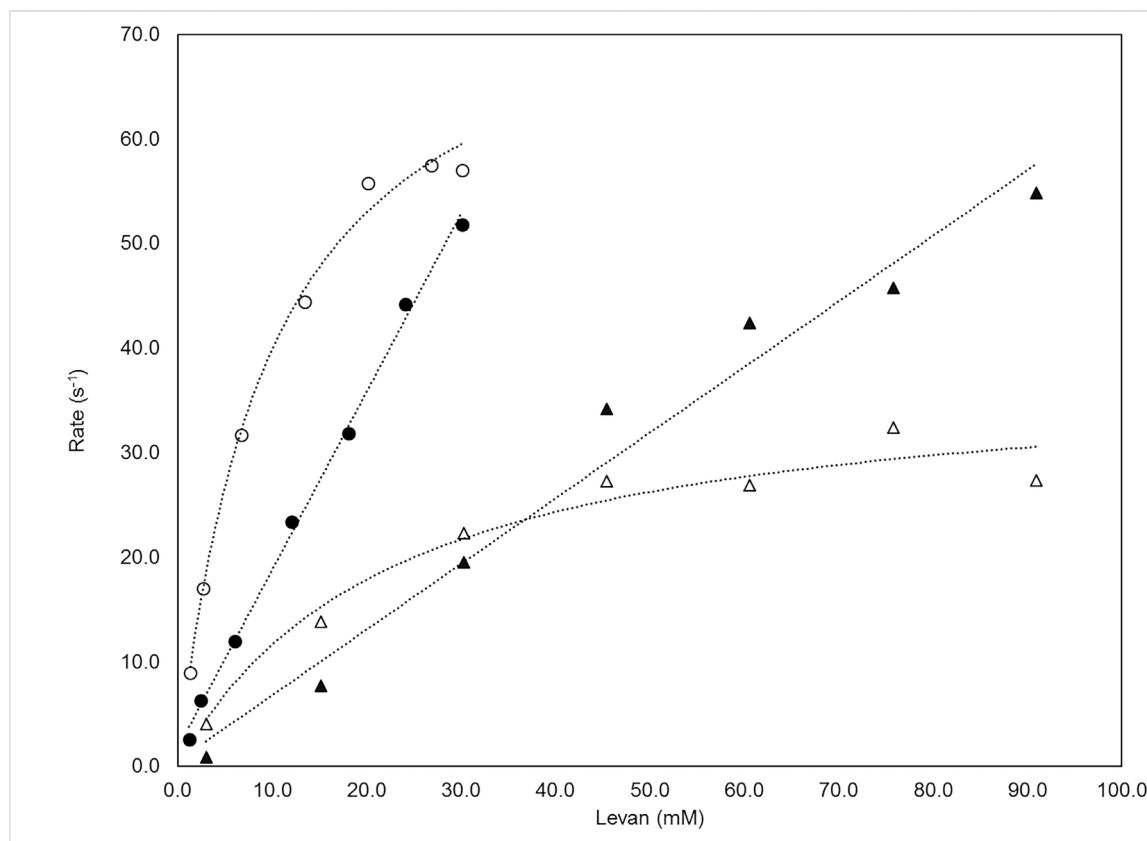


Fig. 3. Comparative kinetic behavior of endolevanase (LevB₁) with 7.6 kDa Mw levan (closed circles) and 3.3 kDa levan (closed triangles) as substrate, and the endolevanase activity in LevB₁SacB, also with 7.6 kDa Mw levan (open circles) and 3.3 kDa levan (open triangles) as substrate.

fusion enzyme. For this purpose, the genes coding for LevB₁ and SacB were included in a single construction linked with a short sequence, equivalent to the hexapeptide: GGSGGS. Two possibilities were considered: LevB₁-GGSGGS-SacB and SacB-GGSGGS-LevB₁. The former was selected as in this construction the two active sites are placed relatively far from each other and separated by the endolevanase β -sandwich domain which may act as an additional levan binding domain. This is the case of exolevanase from *B. subtilis* (SacC), where the β -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 LevB₁ activity (Yamamoto, Iizuka, Tanaka, & Yanamoto, 1984). Free fructose was not observed in the HPAEC-PAD chromatograms of samples taken from the endolevanase activity assays. LevB₁ 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 LevB₁SacB is referred to the molar concentration of the single enzyme, this in order to compare LevB₁ 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 LevB₁SacB, a 5-fold reduction in affinity is produced as a consequence of the fusion to LevB₁, as measured by the K_m value for sucrose, while the turnover number (k_{cat}) is reduced to

108 s^{-1} , two third the activity of the single enzyme (164 s^{-1}). On the other hand, the endolevanase behavior of LevB₁ free or fused in LevB₁SacB is shown in Fig. 3. As previously reported, the kinetic behavior of LevB₁ is described by a first order model, with a specific rate constant of 1.73 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_{cat} as high as 901 s^{-1} for thimoty grass levan (Mardo et al., 2017). The kinetic behavior of LevB₁ in the fusion enzyme LevB₁SacB follows Michaelis-Menten type kinetics, as shown in Fig. 3. Structural regions in SacB additional to the LevB₁ β -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 LevB₁ active site. This was actually the case when the fusion of the carbohydrate binding domain (CBM66) to *Bacteroides thetaiotaomicron* exolevanase (BT382) decreased the K_m 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 LevB₁ activities was carried out during storage at 37 °C of the fusion protein LevB₁SacB. 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, LevB₁ is fully stable at 37 °C (Porras-Domínguez et al., 2014), so that, while the presence in the same structure of LevB₁ favours SacB stability, this is not the case for LevB₁, which became less stable. Nevertheless, the fusion enzyme is sufficiently stable to perform

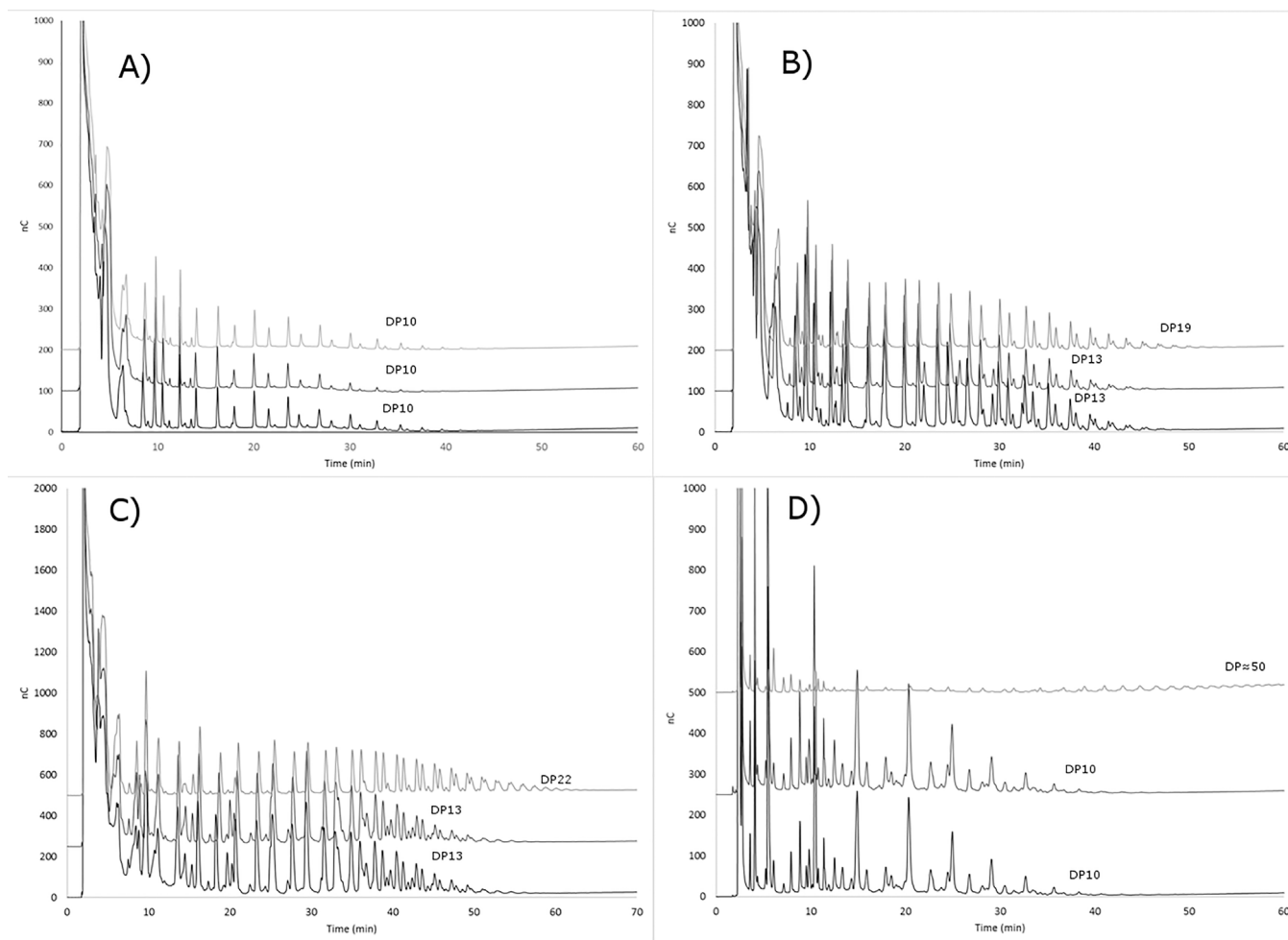


Fig. 4. L-FOS product profile during initial reaction conditions as observed by HPAEC-PAD obtained with levansucrase SacB (light gray), simultaneous SacB and LevB₁ (dark gray) and LevB₁SacB (black). Reaction conditions: 600 g/l sucrose, 37 °C, pH 6.0, 50 mM acetate buffer. A) 10 min, B) 30 min and C) 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 LevB₁ and SacB and the fusion enzyme (LevB₁SacB) reaction systems.

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

the L-FOS synthesis process. In this context, LevB₁ stability is the limiting factor defining reaction conditions for an efficient synthesis. LevB₁SacB 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 LevB₁ 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 LevB₁SacB

The evolution of the L-FOS profile synthesized in reactions with the fusion enzyme (10 U/ml of levansucrase activity in LevB₁SacB), the simultaneous synthesis and hydrolysis reaction (1 μM of both Sac B and LevB₁) 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 LevB₁ 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, LevB₁SacB 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.

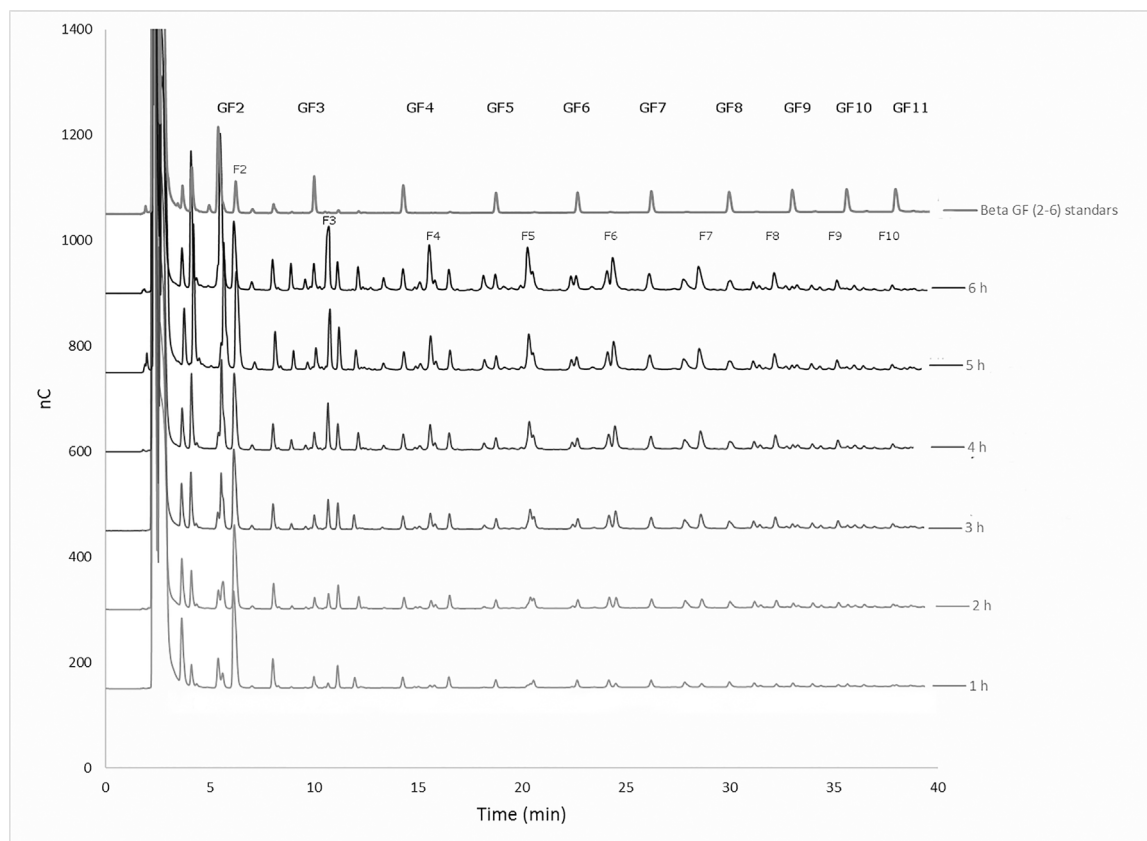


Fig. 5. Evolution of the L-FOS profile as observed by HPAEC-PAD in a 1.7 l reaction in samples taken during a 6 h synthesis from sucrose (600 g/L) in the presence of LevB₁SacB at 37 °C, pH 6.0 50 mM sodium acetate buffer containing 1 μM CaCl₂.

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 LevB₁SacB 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 LevB₁SacB, 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 LevB₁SacB 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 LevB₁) in a single one-pot reaction containing equimolar concentrations of both enzymes, or the fusion enzyme LevB₁SacB 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 LevB₁SacB alternative is that production, purification and application procedures for SacB and LevB₁, 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 dextranucrase 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 dextranucrase 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 levansucrase from *Bacillus megaterium*. *The Biochemical Journal*, 407(2), 189–198. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20070600>.
- 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 dextranucrase and dextranase: Application for one-step synthesis of isomalto-oligosaccharides. *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 β -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.

RESEARCH

Open Access



Simultaneous enzyme production, Levan-type FOS synthesis and sugar by-products elimination using a recombinant *Pichia pastoris* strain expressing a levansucrase-endolevanase fusion enzyme

Ángela Ávila-Fernández¹, Silvia Montiel², María Elena Rodríguez-Alegría², Luis Caspeta² and Agustín López Munguía^{2*}

Abstract

Background Although Levan-type fructooligosaccharides (L-FOS) have been shown to exhibit prebiotic properties, no efficient methods for their large-scale production have been proposed. One alternative relies on the simultaneous levan synthesis from sucrose, followed by endolevanase hydrolysis. For this purpose, several options have been described, particularly through the synthesis of the corresponding enzymes in recombinant *Escherichia coli*. Major drawbacks still consist in the requirement of GRAS microorganisms for enzyme production, but mainly, the elimination of glucose and fructose, the reaction by-products.

Results The expression of a fusion enzyme between *Bacillus licheniformis* endolevanase (LevB1) and *B. subtilis* levansucrase (SacB) in *Pichia pastoris* cultures, coupled with the simultaneous synthesis of L-FOS from sucrose and the elimination of the residual monosaccharides, in a single one-pot process was developed. The proof of concept at 250 mL flask-level, resulted in 8.62 g of monosaccharide-free L-FOS and 12.83 gDCW of biomass, after 3 successive sucrose additions (30 g in total), that is a 28.7% yield (w L-FOS/w sucrose) over a period of 288 h.

At a 1.5 L bioreactor-level, growth considerably increased and, after 59 h and two sucrose additions, 72.9 g of monosaccharide-free L-FOS and 22.77 gDCW of biomass were obtained from a total of 160 g of sucrose fed, corresponding to a 45.5% yield (w L-FOS/w sucrose), 1.6 higher than the flask system. The L-FOS obtained at flask-level had a DP lower than 20 fructose units, while at bioreactor-level smaller oligosaccharides were obtained, with a DP lower than 10, as a consequence of the lower endolevanase activity in the flask-level.

Conclusion We demonstrate here in a novel system, that *P. pastoris* cultures can simultaneously be used as comprehensive system to produce the enzyme and the enzymatic L-FOS synthesis with growth sustained by sucrose by-products. This system may be now the center of an optimization strategy for an efficient production of glucose and fructose free L-FOS, to make them available for their application as prebiotics. Besides, *P. pastoris* biomass also constitutes an interesting source of unicellular protein.

*Correspondence:

Agustín López Munguía
agustin.lopez@ibt.unam.mx

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Keywords Levan-FOS, Fructans, Prebiotics, *Pichia pastoris*, Levansucrase, Endolevanase

Background

Fructans are fructose polymers which include inulin and levan, the most abundant structures synthesized by plants or microorganisms respectively. Inulin-type fructooligosaccharides (I-FOS) bearing β 2-1 linkages have been recognized as one of the most effective prebiotics due to their demonstrated beneficial health effects in various physiological functions of the human gut microbiota [1]. These I-FOS are commercially available either by enzymatic hydrolysis of inulin extracted from *Chicorium intybus* or by enzymatic synthesis from sucrose by fungal fructosyltransferases [2] and have become common ingredients of functional foods [3, 4]. More recently, it has become clear that alternative fructooligosaccharides, such as levan-type FOS or fructans extracted from agave despite their β 2-6 linkages or eventual branching, also bear interesting prebiotic properties [5, 6]. In effect, it is now clear that levan-type FOS, may be used selectively as carbon and energy sources by the beneficial intestinal microbiota [7, 8]. However, unlike I-FOS, which can be produced by a fungal fructosyltransferase (FTF) from sucrose, no FTF-type of enzyme able of synthesizing L-FOS directly has been reported. The closest approach to L-FOS synthesis has been the specific synthesis of low molecular weight (LMW) levan by levansucrases under controlled reaction conditions, as reported by Santos-Moriano et al. [9]. Efforts directed to modify the specificity of levansucrases by site-directed mutagenesis to produce L-FOS have been also carried out without much success [10]. An alternative synthesis of L-FOS consists in a process analogous to chicory I-FOS production [11] where microbial levan is hydrolyzed using an endo-type levanase. Porrás-Domínguez et al. (2014) reported a sequential process to produce L-FOS that first involved the synthesis of LMW levan from sucrose using SacB, the levansucrase from *B. subtilis* in *E. coli* as host, which once recovered by precipitation with ethanol was subsequently hydrolyzed using LevB1, the endolevanase from *B. licheniformis* [8]. The L-FOS synthesized were finally recovered in the reaction medium. In order to improve the process, avoiding the step of levan recovery after its synthesis, the same authors studied the possibility of carrying out both enzymatic reactions simultaneously. This resulted in a bi-enzymatic synthesis of L-FOS from sucrose with a DP lesser than 10, with levanobiose and blastose as the main products when an equimolar concentration (1 μ M) of both enzymes were used in the reaction [12]. The process was further improved through the design of a new biocatalyst fusing both enzymes

(LevB1SacB). This option was advantageous considering that the two enzymatic reactions could be handled as one, with a single biocatalyst to produce the L-FOS, bearing the same properties and resulting in the same product profile reported for the bi-enzymatic process [12]. After purification, the L-FOS were assayed in a digestive track simulator reactor with interesting results in terms of the regulation of a microbiota taken from patients suffering from overweight (data not shown).

Nevertheless, a major drawback of any enzymatic L-FOS synthesis with FTFs using sucrose as fructosyl donor is the requirement to eliminate residual glucose, a by-product after the sucrose fructosyl unit is transferred to increase L-FOS or levan chain length. Glucose is also produced as by-product from sucrose hydrolysis, also catalyzed by FTFs. For this purpose, several strategies have been proposed, including the formation of glucose complexes with boronic acids to facilitate its separation [13]. On the other hand, *E. coli* is not a GRAS organism, so the application of products of recombinant enzymes may be limited in the food or pharmaceutical industry or may require complex regulatory procedures. In this context *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) could be an alternative to solve both issues: the expression of enzymes in a GRAS microorganism, and the elimination of glucose through its selective consumption (elimination) by the host (*P. pastoris*) in the same system where it is being produced by levansucrase.

P. pastoris is an excellent host for recombinant proteins production due, among other reasons, to the availability of strong promoters, both constitutive and inducible [14–16]: to its ability to secrete processed proteins [14, 17, 18]; to its strong preference for respiratory growth, a key physiological trait that greatly facilitates high cell density cultures [15, 16]; to the low levels of endogenous protein secretion into the culture medium [16, 19]; and its GRAS status [14, 17, 18]. Finally, *P. pastoris* does not have invertase activity, making this system idoneous for sucrose transformations.

Based on this background, the objective of this work was to synthesize L-FOS from sucrose through a simultaneous bioprocess based on the yeast *P. pastoris* which served as both, the host for recombinant protein expression and as a cellular purification system consuming the free monosaccharides (glucose and fructose), that result from the enzymatic reaction catalyzed by LevB1SacB. We demonstrate here, both at flask and bioreactor level and through several batches of sucrose addition that *P. pastoris* can produce the active fusion enzyme LevB1SacB,

which in turn synthesizes L-FOS from sucrose, while the yeast consumes the monosaccharides generated during the reaction as carbon source for growth. All these processes are carried out in a single reactor as illustrated in Fig. 1.

Results and discussion

Expression and selection of transformants expressing the fusion enzyme LevB₁SacB

The plasmids pPICZαA-LevB₁SacB and pGAPZαA-LevB₁SacB, under the control of the methanol inducible pAOX1 promoter and the constitutive pGAP promoter respectively, were used to transform the *P. pastoris* X-33 strain. Five transformants of both X-33/pPICZαA-LevB₁SacB and X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB were selected in YPDS + Zeocin. The five transformants with the inducible system resulted in the Mut⁺ phenotype, according to their ability to metabolize methanol. The transformants were analyzed in terms of their kinetic performance in 120 h cultures, and the amount of LevB₁SacB enzyme evaluated (data not shown). The five transformants of the inducible system X-33/pPICZαA-LevB₁SacB, reached an OD₆₀₀ between 20 and 21 while the pH decreased from 6 to 5.5. Although the activity was detected after 24 h of culture, 776 and 117 U/L for two of the most active transformants, levansucrase activity reached 12,890 and 23,820 U/L of activity after 120 h,

with a total protein content of 208–405 mg/L of total protein, respectively.

As far as the constitutive system transformants is concerned (X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB), growth was similar for the five transformants which reached an OD₆₀₀ between 22 and 24 after 120 h when growth had already reached the stationary phase and the pH decreased from 6 to 5.5. The enzymatic activity was quantified after 48 h of fermentation when glucose was exhausted to avoid overestimation of the enzyme activity. Unlike the inducible system, all the constitutive transformants showed a similar behavior, reaching maximums between 2700 and 3076 U/L of levansucrase activity and between 122 and 131 mg/L of protein at 120 h of culture.

The transformants with the highest levansucrase activity of both the inducible and constitutive systems were selected to evaluate the simultaneous expression of enzymes, enzymatic reaction and glucose remotion concept for L-FOS production in fed-batch. Although higher activities were obtained with the inducible strain, a constitutive transformant was selected as it is more appropriate for the designed fed-batch system, avoiding also the need for methanol in the culture.

Endolevanase activity of LevB₁SacB inducible and constitutive

The efficiency of the simultaneous enzymatic reaction (synthesis/hydrolysis) for the synthesis of L-FOS from sucrose, particularly the reaction time for a given L-FOS profile, depends on the levansucrase/endolevanase ratio used [12]. Therefore, the ratio of the levansucrase/endolevanase activities of LevB₁SacB of the fusion enzyme produced by *P. pastoris* throughout the culture was evaluated.

It was found that the ratio of levansucrase/endolevanase activities of LevB₁SacB produced in both heterologous expression systems with *P. pastoris* as host were much higher than the ratio observed when LevB₁SacB was produced in *E. coli* (1.39 U of levansucrase/ U of endolevanase). Considering that both enzymes are part of the same protein, these unexpected large ratio, resulting from a low endolevanase activity, maybe either due to the effect of pH fluctuations on endolevanase stability during the prolonged fermentation time, or to biochemical factors derived from the new host, such as protein glycosylation, partial proteolytic degradation, or incorrect folding of the enzyme, among others [20, 21], affecting exclusively the N-terminal region of the three domain fusion construction. However, as shown by zymography, LevB₁SacB bears an important endolevanase activity as also measured in the purified LevB₁SacB forms, so that an additional explanation may be the eventual effect of compounds in the culture medium (methanol or an

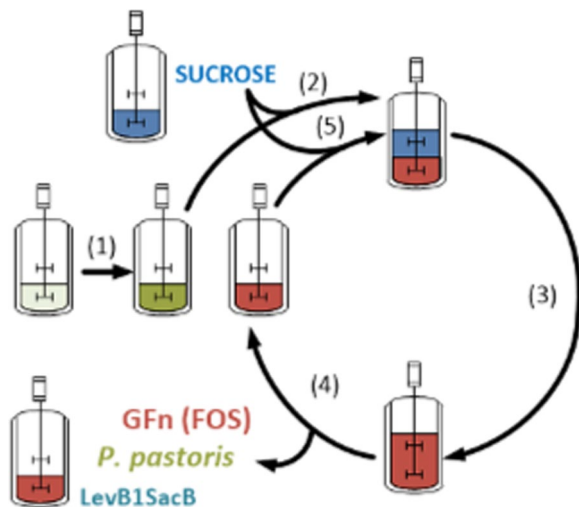


Fig. 1 Layout of the simultaneous enzyme production, enzymatic reaction, and glucose elimination fermentation system. (1) Glucose induced Enzyme production (EP) stage; (2) First enzyme production (EP) and enzyme reaction (ER) stages; (3,4,5) Productive fed batch (FB) stages: the enzyme is now induced by residual glucose from the reaction. Half of the culture is retired after each batch and replenished with fresh culture medium containing sucrose. See text for a detailed description

extracellular metabolite) inhibiting the enzyme or affecting the activity assay.

In Fig. 2, levansucrase activity zymograms from constitutive LevB₁SacB in *P. pastoris* compared to LevB₁SacB produced in *E. coli* are shown. A band demonstrating the levansucrase enzymatic activity with a molecular weight corresponding to a 130 kDa protein was clearly observed, both in the culture medium, as well as in the purified protein solutions obtained from the constitutive *P. pastoris* culture media. Interestingly, the equivalent molecular weight of the band (around 130 kDa) was slightly higher than that of the fusion enzyme expressed in *E. coli* Rosetta 2. This difference in molecular weight is a common feature when expressing proteins in *P. pastoris* [19, 22], and a probable explanation to an endolevanase behavior.

As already mentioned, the endolevanase activity assay measured in the LevB₁SacB fusion protein produced in *P. pastoris* was lower than the activity expected when compared to the activity of both enzymes in the LevB₁SacB construction expressed in *E. coli*. However, the zymography obtained from the same solutions showed that the endolevanase activity of both LevB₁SacB produced in *E. coli* and LevB₁SacB produced in the constitutive *P. pastoris* strain were comparable, as also shown in Fig. 2.

Design of a simultaneous enzyme production, enzymatic reaction, and glucose elimination system

Once we were able to demonstrate that LevB₁SacB produced in the constitutive *P. pastoris* culture system possesses both enzymatic activities and behaves similarly than the enzyme from *E. coli* [12] a process scheme was designed to take advantage of several physiological

properties of the *P. pastoris* culture for the synthesis of L-FOS from sucrose as the following:

- *Enzyme production (EP)*. The enzyme is produced constitutively with the pGAP promoter without requirement of methanol induction as in the case of the inducible system, which in spite of the higher amount of enzyme produced could limit further applications of the culture product as food supplement or would impose intensive purification.
- *Enzyme reaction (ER)*. Enzyme reaction will take place by addition of sucrose as substrate to the culture medium where the enzyme is constitutively produced.
- *Batch Culture (BC)*. *P. pastoris* will continue growing at the expense of glucose (and eventually fructose), by-products of the enzymatic reaction. More enzyme will be synthesized by *P. pastoris*. Neither sucrose nor the synthesized L-FOS are consumed by the yeast, so that the former will be exclusively used as substrate by LevB₁SacB, while the product, L-FOS, will accumulate in the supernatant.
- *Fed batch operation (FB)*. Sucrose is provided in a fed-batch mode together with the medium components to allow for further growth, enzyme production associated to growth and L-FOS synthesis with the concomitant liberation of glucose, as long as sufficient enzyme is available. After each sucrose and medium addition, the same amount of medium containing the accumulated L-FOS may be simultaneously withdrawn as product.

Considering that experiments were performed initially at Erlenmeyer and later at bioreactor level of a defined

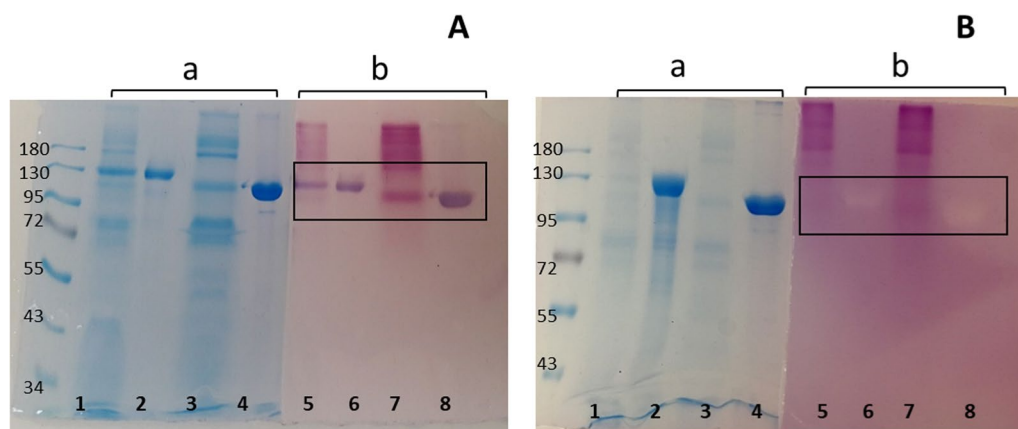


Fig. 2 LevB₁SacB activities: levansucrase (A) and endolevanase (B). **a** SDS-PAGE and **b** zymography. Lines 1 and 5, proteins in the *P. pastoris* X-33/pGAPZaA-LevB₁SacB culture supernatant; lines 2 and 6, LevB₁SacB purified from the culture supernatant; lines 3 and 7, control culture supernatant of *P. pastoris* with X-33/pGAPZaA without the LevB₁SacB gene; lines 4 and 8, purified LevB₁SacB expressed in *E. coli* culture

volume (V_f), the following is a general layout of the production system also illustrated in Fig. 1:

- 1) *EP stage*. Culture of *P. pastoris* X-33 in glucose for the constitutive production of LevB₁SacB in an initial fermentation volume of 0.5V_f.
- 2) *EP and ER stages*. After 72 h of culture in glucose, addition of 0.5V_f L of fresh culture medium containing 200 g/L of sucrose, to reach a volume of V_f L containing 100 g/L of sucrose. *P. pastoris* will continue to grow, at this stage at the expense of the by-products of L-FOS synthesis by LevB₁SacB from sucrose. Associated to *P. pastoris* growth, the constitutive production of the fusion enzyme will continue.
- 3) *Productive FB stages*. As sucrose is depleted, the step-wise withdrawal of 0.5V_f L from the culture medium proceeds with the concomitant addition of the same volume (0.5V_f L) of fresh culture medium containing 200 g/L of sucrose. The number of production stages can be as large as the process allows. Theoretically, at the end of each productive stage, the 0.5V_f L withdrawn containing biomass, LevB₁SacB, and the synthesized product (L-FOS) without glucose, fructose or residual sucrose are collected as product.

As observed, the proposed process is an innovative simultaneous enzyme production, enzymatic reaction and glucose elimination system, also providing *P. pastoris* unicellular biomass protein as an interesting product.

Process evaluation at flask-level

Figure 3a shows that at the Erlenmeyer flask level, growth was associated to glucose consumption during the first 72 h of culture, reaching 4.57 gDCW/L of biomass. At this point, the limiting substrate (glucose) had been consumed (Fig. 3b) and 4100 U/L of LevB₁SacB (quantified as levansucrase activity) had been produced constitutively and secreted to the culture medium. The yeast resumes growth after each addition of sucrose in a fresh culture medium, using the free monosaccharides that result from the enzymatic reaction. Interestingly, similar amounts of biomass were obtained at the end of each stage, that is 5.35, 5.23 and 5.27 gDCW/L of biomass collected at 120, 168 and 288 h, respectively. Along this process, the culture pH decreased from 6 to 4 a consequence of the organic acids produced probably due to the increased oxygen limitation as biomass increased, compared to the first hours of fermentation.

Figure 3b also shows that in the L-FOS production stages, the sucrose fed dropped to lower values than the theoretical 100 g/L, probably due to the high levansucrase activity. This is confirmed by the simultaneous increase in glucose as a by-product of both the transferase and the

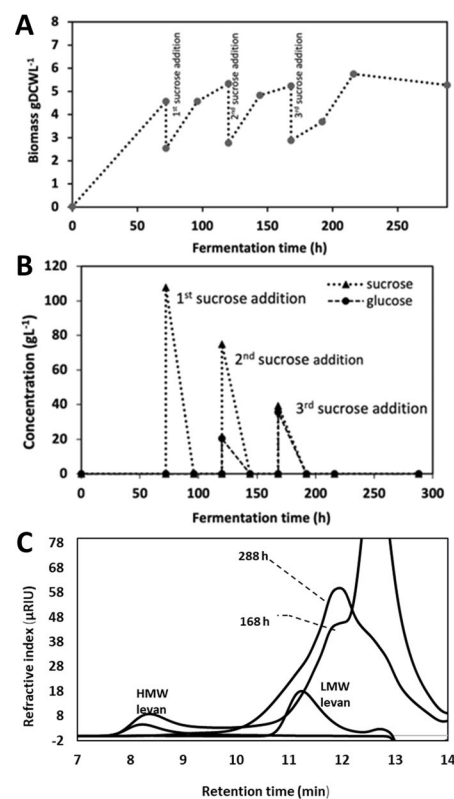


Fig. 3 **A** Growth kinetics of recombinant *P. pastoris* X-33/pGAPZ α A-LevB₁SacB system at flask-level on BMY medium with three sucrose additions at 72, 120 and 168 h. Reaction conditions: 28 °C, 200 rpm, final volume of 0.1 L and total sucrose concentration of 300 g/L supplied in three stages. **B** Sucrose and monosaccharides consumption along the culture. **C** GPC of levan molecular weight distribution of the final products compared to the 3rd sucrose addition

hydrolytic SacB reactions. Surprisingly, after each step of the batch cultures, all sucrose added with the fresh culture medium was consumed, reaching 100% conversion after 24 h of culture. Even more interesting was the fact that no free fructose was detected in the reaction medium, implying either a minimum enzymatic hydrolysis of sucrose by SacB during the process, and/or that fructose was consumed as fast as glucose as carbon source by *P. pastoris*. An additional possibility was that fructose is used by SacB in the fusion enzyme as a fructose acceptor to produce levanbiose and from this acceptor, oligo-levans eventually.

The kinetics of products formation, particularly the L-FOS profile, were evaluated throughout the process under two different perspectives. One was the possibility of accumulation of SacB synthesis products (levan of either low or high molecular weight distribution), a consequence of insufficient endolevanase activity. Through GPC analysis of the products from samples collected after

each batch, we found that HMW levan was hydrolyzed by endolevanase only at the end of the process (Fig. 3c), while no LMW levan accumulated indicating its rapid hydrolysis after synthesis. These results confirmed the higher affinity of endolevanase reported for LevB1SacB towards small levan polymers, preventing their accumulation [8]. The second perspective involves directly the dynamics of the L-FOS profile obtained throughout the process. We found that 24 h after the first sucrose addition, L-FOS with a maximum DP of 20 were obtained and the profile remained unchanged all throughout the process until the last batch explored (Fig. 4). This may be the consequence of a process controlled by yeast growth leaving enough time for the parallel process of L-FOS synthesis by the secreted enzyme. The main product of the system (an F2) was identified from a commercial I-FOS standard (Raftylose P95 from Orafti) as levanbiose, as also found in the batch synthesis of L-FOS using the simultaneous reaction with the biocatalyst LevB1SacB produced in *E. coli* [12]. Levanbiose results mainly from

the direct hydrolysis by endolevanase from the levan chains, as demonstrated by Porras-Domínguez et al. in kinetic experiments analyzed by TLC [8]. The presence of larger L-FOS molecules was clearly defined in the chromatogram, mainly F3, F4, F5 and F6 and to a lesser extent F7, F8, F9 and so on up to F20. Finally, the small signals that appear between each of the products of this series, known as the Fn series, could correspond to FOS of the 1-kestose, 6-kestose, blastose series and those including branches in β 2–1 [23].

At the end of the process, 8.62 g of total L-FOS were obtained from 30 g of sucrose added during the 3 stages, which was equivalent to a yield of 28.7 g of L-FOS per 100 g of sucrose, free of monosaccharides and residual sucrose. In Table 1 the batch and fed batch L-FOS production processes in flask and bioreactor systems are reported.

Evaluation of the process at bioreactor scale

In order to scale up the process, and as a proof of concept, the simultaneous fermentation/reaction process was carried out in a 1.5 L stirred bioreactor, with a 0.8 L of final working volume (V_f). A similar procedure and culture conditions already reported for the flask-level experiments were maintained, as well as the culture feeding and removal strategy. Unlike the flask process, the fermenter allowed for the control of pH and dissolved oxygen.

Figure 5a shows that *P. pastoris* growth reached 4.95 gDCW/L in the initial culture stage. Subsequently, when growth was based on monosaccharides as carbon an energy sources, biomass increased to 17.05 and 17.48 gDCW/L, in the next two stages after 18 and 6 h respectively. These results clearly show that the fermenter was more efficient in terms of biomass production than shake-flasks cultures due to the extent of oxygen availability. In the same way, pH control favors the stability of the enzymes in the fusion peptide, allowing for a better operation in optimal pH conditions. As far as the enzymatic reaction is concerned, the volumetric activity of

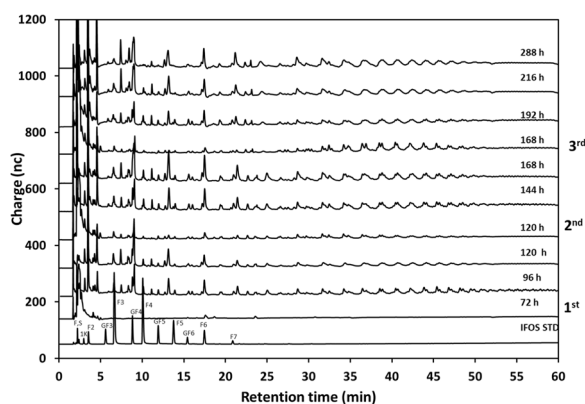


Fig. 4 HPAEC-PAD. Profile of L-FOS produced by the system at flask-level. The process was developed for three sucrose additions (100 g/L) 1st at 72, 2nd at 129, and 3rd at 168 h, 28 °C and 200 rpm in a volume of reaction of 0.1 L. F:fructose, S:sucrose, 1 K: 1-kestose, F2:inulobiose, GF3:nistose, F3:inulotriose, GF4:fructosyl-nistose, F4:inulotetraose, GF5:kestohexaose, F:inulopentaose, GF6:kestohptaose, F6:inulohexaose y F7: inuloheptaose

Table 1 Comparison of the reaction medium composition at the end of the Fed batch flask and the bioreactor *P. pastoris* cultures expressing LevB₁SacB under the GAP promoter, and the reaction using LevB₁SacB produced by *E. coli*

	Time (h)	L-FOS/Sucrose (g/ g)	Glucose (g)	Fructose (g)	Residual sucrose (g)	Maximum L-FOS DP	Total <i>P. pastoris</i> biomass (g)
X-33/pGAPZaA-LevB ₁ SacB (Flask-level)	288	0.28	0	0	0	20	1.05
X-33/pGAPZaA-LevB ₁ SacB (Bioreactor scale)	59	0.45	0	0	6.83	10	21.85
Rosetta 2/PET-22 (+) LevB ₁ SacB *	6	0.41	54 g/L	234 g/L	65 g/L	10	–

Data taken from Porras-Domínguez, 2017

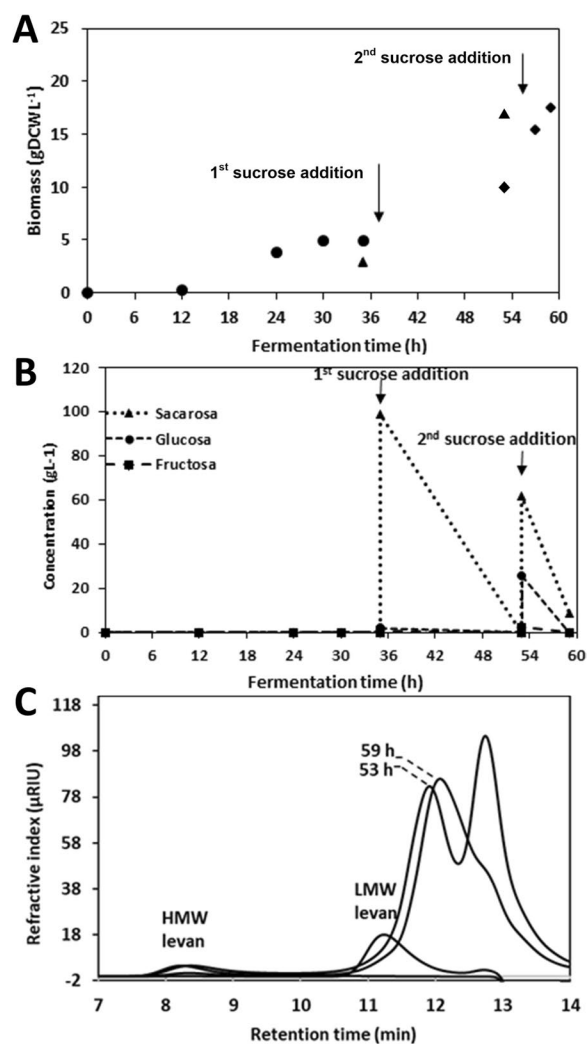


Fig. 5 **A** Growth kinetics of recombinant *P. pastoris* X-33/pGAPZaA-LevB1SacB system. Bioreactor scale on BMY medium with two sucrose additions at 35 and 53 h. Reaction conditions: 28 °C, 200–1200 rpm, final volumen of 0.8 L and total sucrose concentration of 200 g/L supplied in two stages. **B** Sucrose and monosaccharides consumption along the culture. **C** GPC. Levan molecular weight distribution of the final products compared to the 2nd sucrose addition

the synthesized fusion enzyme, increased throughout the fermentation time, reaching a total of 15,120 U/L measured as levansucrase activity at the end of the process. Figure 5b shows that sucrose was completely consumed after 18 h of the first sucrose addition, while no glucose or fructose were detected in the medium. Similarly, as in the flask assay, we observed that in the second stage, sucrose was rapidly consumed after addition, releasing glucose into the reaction medium. After 59 h of the total process a certain amount of residual sucrose was still present, but as in the previous experiments in erlenmeyer, all monosaccharides had been consumed (Table 1). In the

same Table a comparison is made with the previous *E. coli* batch process, where residual sugars are present. Considering that the enzyme remained active in the collected medium, all sucrose is eventually consumed. Therefore, the final L-FOS profile may be defined both, by the preferential final products of the endolevanase and the last stage reaction time.

It was also observed that HMW levan polymer and large DP L-FOS did not accumulate at the end of the process (Fig. 5c), as a consequence of enough endolevanase activity to deal with the levan synthesized by levansucrase. As far as the L-FOS profile is concerned, products with a maximum DP of 8 are observed after 18 h of reaction following the first addition of sucrose (Fig. 6). These are mainly L-FOS of the Fn series, that is, those resulting from the endo-type hydrolysis on levan, without a glucose molecule in one end of the chain. Subsequently, immediately after the second sucrose addition, the synthesis of higher DP L-FOS, associated to high levansucrase activity, are observed. At this point, the accumulated volumetric levansucrase activity reached 11.42 U/mL, 5 times higher than the activity measured when the reaction started (2.22 U of levansucrase activity/mL). Interestingly, at the end of the second stage, the highest L-FOS DP was 10, with a product profile different from the one observed in the first stage, as a result of the lower time available for the reaction leading to a less extensive levan hydrolysis. These results demonstrate the complex dynamics of this reaction system, particularly in terms of the L-FOS final profile, which depends on the endolevanase specificity, as well as on reaction time and exposure to endolevanase after collection. When the reaction time is limited, as in the previous stages, even when sucrose is no longer available, intermediate hydrolysis products are observed.

Finally, at the end of the 59 h process developed at a bioreactor level an accumulation of 72.9 g of L-FOS were obtained from 160 g of sucrose fed in two stages. This is equivalent to a global yield of 45.5 g of L-FOS per 100 g of sucrose, a 1.6 times higher yield than the yield obtained in flask level. However, the novelty of this process relies on the fact that the products are obtained in a glucose and fructose free medium. In terms of monosaccharide-free L-FOS production, at the bioreactor level, the process behaved similarly as in the Erlenmeyer flask experiments, as shown in Table 1. However at the bioreactor level, another major advantage is that *P. pastoris* reaches a higher cell density since it is possible to simultaneously monitor and control pH and dissolved oxygen [15, 16, 19, 22]. At the fermenter level, we obtained a higher efficiency for the constitutive production of SacBLEvB, the fusion enzyme, as the concentration of secreted heterologous proteins is proportional to cell concentration [15,

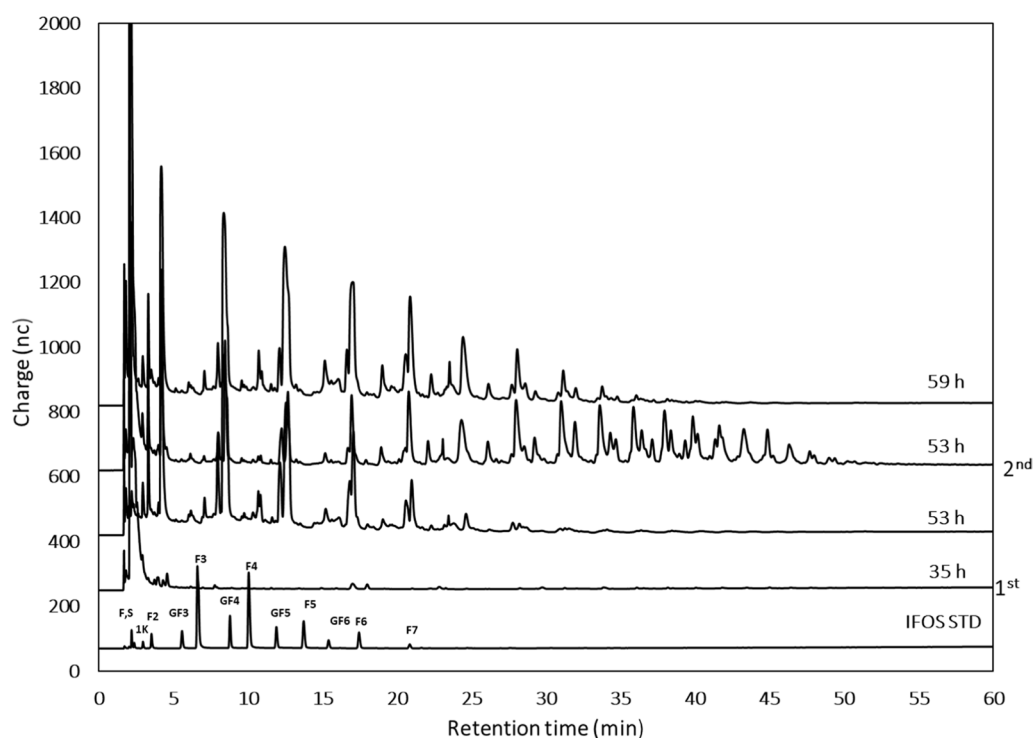


Fig. 6 HPAEC-PAD. Profile of L-FOS produced by the system at bioreactor scale. The process was run with two sucrose additions (100 g/L) 1st at 35 and the 2nd at 53 h, 28 °C and 200–1200 rpm in a final volume of reaction of 0.8 L. F:fructose, S:sucrose, 1 K: 1-kestose, F2:inulobiose, GF3:nistose, F3:inulotriose, GF4:fructosyl-nistose, F4:inulotetraose, GF5:kestoheptaose, F5:inulopentaose, GF6:kestoheptaose, F6:inulohexaose y F7: inuloheptaose

16]. The amount of secreted and accumulated enzyme is essential for a successful conduction of the project, as it is critical in one hand to provide sugars from the reactions for *P. pastoris* growth, and in the other hand, to eliminate them, which is one of the main objectives of the system. The glucose synthesis/consumption rates should be adequately balanced to avoid growth limitation by the carbon source or excessive accumulation.

Another advantage of conducting the process in a fermenter relies on the higher productivity of L-FOS, as the synthesis occurs almost 5 times faster than in shaken flask and with an almost double production yield, equivalent to 45.5 vs 28.7 g of L-FOS/ 100 g of sucrose. Namely, L-FOS were produced at 0.26 g/L/h in flasks, compared to 1.24 g/L/h in bioreactor.

The main advantage of this novel *P. pastoris* fermentation/reaction system for the synthesis of L-FOS over the previously reported process where the gene coding for the fusion protein biocatalyst was expressed in *E. coli*, is that L-FOS are obtained free from glucose and fructose, while the sugars must be removed in the process based in the *E. coli* recombinant enzyme [12]. In addition, the continuous elimination of glucose and fructose allow a reaction without product inhibition, so that total sucrose conversion is rapidly reached, as summarized

in the results presented in Table 1. It is also worth mentioning that although the fusion biocatalyst produced in *E. coli* has a higher endolevanase activity compared to *P. pastoris* as previously discussed, the endolevanase in the *P. pastoris* biocatalysts, is enough to assure the continuous hydrolysis of levan, even after collection of the culture and until enzyme deactivation for further processing. This was the case in the *E. coli* biocatalysts which require a limited reaction time to prevent modifications of the final L-FOS profile due to endolevanase hydrolysis. The extension of the reaction time also allows for the hydrolysis of residual high molecular weight levan.

Conclusions

We have demonstrated here the technical feasibility of a simultaneous system performing a fermentation and an enzymatic reaction, where the growth of a recombinant *P. pastoris* strain results in the synthesis of an enzyme whose activity provides sugars as by-products used as a carbon source in the fermentation. This system allows the production of glucose and fructose free L-FOS with a DP between 2 and 10, with levanobiose (F2) as the most abundant product. The system may be optimized in order to increase its efficiency and define process conditions according to a particular L-FOS profile. Minimum media

will be designed and optimized in order to decrease production costs. Nevertheless, the elimination of glucose and fructose in this novel one reactor fermentation/reaction system for the synthesis of L-FOS is an innovative approach for the synthesis of these and other oligosaccharides required in a purified form for application as prebiotics. This could also be the case for gluco-oligosaccharides and galacto-oligosaccharides that could be produced by glucosyltransferases and beta-galactosidases respectively from disaccharides as substrate donating a glycosyl unit using a similar approach.

Methods

Strains and plasmids

The sequence Lev_{B1}SacB was synthesized with the codon usage optimized to *P. pastoris* by GenScript USA Inc and cloned into the plasmids pPICZαA and pGAPZαA using the EcoRI and XbaI restriction sites. *E. coli* Top 10 (Invitrogen, CA, USA) was used as maintenance strain for the plasmids, while *P. pastoris* X-33 (Invitrogen, CA, USA) was used as the production strain.

P. pastoris transformations

pPICZαA-Lev_{B1}SacB and *pGAPZαA-Lev_{B1}SacB* were linearized using the restriction enzymes Sac I and Avr II, respectively. 80 μL of *P. pastoris* X-33 electrocompetent cells were electroporated using the linearized plasmid and recovered in sorbitol 1 M at 28 °C for 2 h without agitation. Transformants were selected in YPDS + Zeocin Agar (Yeast extract 10 g/L, Peptone 20 g/L, Glucose 20 g/L, Sorbitol 182 g/L, Bacto agar 20 g/L and Zeocin 100 μg/mL), cultivated in liquid YPD + Zeocin (Yeast extract 10 g/L, Peptone 20 g/L, Glucose 20 g/L, and Zeocin 100 μg/mL), cryopreserved with 40% (v/v) glycerol and stored at -70 °C. *pPICZαA* and *pGAPZαA* without the *Lev_{B1}SacB* gene were linearized and used to transform *P. pastoris* X-33 electrocompetent cells using the same conditions. The *P. pastoris* X-33/*pPICZαA* and X-33/*pGAPZαA* transformants were used as control.

Expression of the fusion enzyme Lev_{B1}SacB

A single transformant of *P. pastoris* X-33/*pPICZαA-Lev_{B1}SacB* or X-33/*pGAPZαA-Lev_{B1}SacB* was inoculated in 3 mL YPD + Zeocin and incubated at 28 °C and 200 rpm for 24 h as pre-inoculum.

P. pastoris X-33/*pPICZαA-Lev_{B1}SacB* pre-inoculum was used to inoculate 25 mL BMGY (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, YNB 13.4 g/L, biotin 4*10⁻⁴ g/L, 1% glycerol, and pH 6.0, 0.1 M phosphate buffer) at 0.1 OD₆₀₀. The culture was incubated at 28 °C and 200 rpm until an OD₆₀₀ of 2 was reached. Cells were then recovered by

centrifugation at room temperature (2500 g × 5 min) and washed twice with 0.1 M, pH 6 phosphate buffer. Cells were resuspended in 50 mL BMMY (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, YNB 13.4 g/L, biotin 4*10⁻⁴ g/L in pH 6, 0.1 M phosphate buffer) with 0.5% methanol as inducer of Lev_{B1}SacB production in the culture, starting with an OD₆₀₀ of around 1 and replenishing methanol every 24 h for a total of 120 h.

Alternatively, a *P. pastoris* X-33/*pGAPZαA-Lev_{B1}SacB* pre-inoculum was used to inoculate 50 mL BMY + Glucose (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, YNB 13.4 g/L, biotin 4 × 10⁻⁴ g/L, 2% glucose and 0.1 M pH 6 phosphate buffer) at 0.1 OD₆₀₀. The culture was incubated at 28 °C and 200 rpm for 120 h.

In both cases, growth (OD₆₀₀), pH and enzymatic activities (levansucrase y endolevanase) were measured daily. *P. pastoris* X-33/*pPICZαA* or X-33/*pGAPZαA* transformant cells treated under the same conditions were used as controls.

Standard levansucrase (SacB) and endolevanase (Lev_{B1}) activity assays

Levansucrase (SacB) and endolevanase (Lev_{B1}) initial reaction rates were determined in the fusion enzyme Lev_{B1}SacB following the initial reducing sugar release by the DNS method [24] from the corresponding substrates as described below, both reactions at 37 °C and 500 rpm in 50 mM pH 6.0. acetate buffer containing 1 mM CaCl₂. Levansucrase activity was assayed in 600 μl reactions and 100 g/L sucrose as substrate while endolevanase in 500 μl reactions and 10 g/L of 8.3 KDa average molecular weight levan as substrate. Levan was produced enzymatically with *B. subtilis* SacB as described by Porrás-Domínguez et al. (2015) [25]. One unit of levansucrase or endolevanase activity (U) was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of glucose or fructose equivalents per minute, respectively. All activity assays were carried out by duplicates.

Protein concentration and zymography

Total and purified proteins from the culture media were measured by the Bio-Rad protein assay using bovine serum albumin (BSA) as standard. 10% SDS-PAGE gels were prepared as described by Laemmli [26]. For the endolevanase activity assay, gels included 1% w/v LMW SacB levan (8.3 kDa) in the formulation. Purified Lev_{B1}SacB (10 μg) was charged in control gels as well as gels containing levan. After migration, gels were washed at room temperature three times for 30 min in a refolding buffer (1% v/v Tween 80 in pH 6.0, 50 mM sodium acetate buffer). Finally, gels were incubated in the same buffer overnight, in order to visualize

the endolevanase activity in situ. An additional set of experiments were performed to visualize levansucrase activity, incubating overnight the levan-free gels in the buffer containing 10% (w/v) sucrose. The use of reducing agents was avoided during SDS-PAGE.

The lanes containing the molecular weight standard were cut off and stained with Gel Blue Stain Reagent (Thermo Scientific), while those containing LevB₁SacB were stained with the Schiff reagent (Sigma, St. Louis, MO). For this purpose, the gels were incubated for 30 min in a 75% v/v ethanol solution, followed by a 1 h incubation in a periodic (0.7%) and acetic (5%) acids solution. Afterwards, several washing steps were performed with a 0.2% sodium bisulfite and 5% acetic acid solution until the gels became clear. Finally, the gels were placed in contact with the Schiff reagent. LevB₁ activity is observed when the whole gel is stained except for the regions where endolevanase activity degraded the levan polymer in the gel, while SacB activity is observed as a single stained band corresponding to the polymer synthesized by the enzyme.

Recombinant *P. pastoris* growth, LevB₁SacB production and L-FOS synthesis in Erlenmeyer flasks

In a first step a single transformant of *P. pastoris* X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB was inoculated in 3 mL YPD + Zeocin and incubated at 28 °C and 200 rpm for 24 h. This pre-inoculum was used to inoculate 50 mL BMY + Glucose at 0.1 OD₆₀₀, incubated in the same conditions for 72 h. Up to this point glucose supported growth and LevB₁SacB production. Afterwards, a fed batch culture was started when the 50 mL of the culture containing the induced enzyme were complemented with 50 mL of fresh BMY medium but this time containing 200 g/L sucrose to complete 100 mL with a final sucrose concentration of 100 g/L in a 250 mL Erlenmeyer flask and incubated. Twice after 48 h, a volume of 50 mL of culture broth was withdrawn and replenished with 50 mL of fresh medium (BMY + 200 g/L sucrose). After the last withdraw/replenish procedure, the medium was incubated for an additional period of time (120 h) to allow for sucrose conversion and further cell growth on glucose and fructose, issued from the enzymatic reaction. Therefore L-FOS were produced in three stages, the first two lasting 48 h and the last one 120 h. If the initial 72 h of culture in glucose are considered, then the whole process lasted 288 h.

P. pastoris growth, LevB₁SacB production and L-FOS synthesis in Bioreactor

A single transformant of *P. pastoris* X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB was inoculated in 20 mL YPD + Zeocin and

incubated at 28 °C and 200 rpm for 24 h. This culture was then used to inoculate a 1.5 L Applikon bioreactor (Applikon ADI 1010/ ADI 1025, Delft, The Netherlands), containing 400 mL BMY + Glucose at 0.1 OD₆₀₀. In the reactor, the initial culture conditions were 28 °C, 330 rpm with an aeration rate of 0.5 vvm. pH was adjusted by automatic addition of 4 M KOH; the concentration of dissolved oxygen was not allowed to decrease from 40%, increasing the agitation rate up to 1200 rpm. After 35 h the fed batch culture was started with the addition of 400 mL BMY + 200 g/L sucrose to reach 800 mL of total volume in the reactor, then the culture proceeded for 18 h. Again, 400 mL of culture were withdrawn and replenished with 400 mL of fresh BMY + 200 g/L sucrose for an additional 6 h. During this time, the aeration rate increased to 1.0 vvm. At each stage the biomass and the enzyme activity were measured. If the initial 35 h of culture in glucose are considered, then the whole process lasted 59 h.

Identification and quantification of carbohydrates

Glucose, fructose, residual sucrose, levan and L-FOS were measured at the different stages of the process. Glucose, fructose and sucrose in the culture medium were quantified in a HPLC system (Ultimate 3000, Dionex) equipped with a refractive index detector (RefractoMax 520) using a Gold Amino (4.6 × 250 mm) column at 30 °C and 1 mL/min acetonitrile:water (75:25) as eluent. Levan was quantified by gel permeation chromatography (GPC) using the same system but equipped with an Ultrahydrogel™ Linear (7.8 × 300 mm) column at 35 °C and using 0.1 M sodium nitrate 0.8 mL/min as eluent. High and low molecular weight SacB Levan produced as described by [25], were used as standard. L-FOS were identified in a HPAEC-PAD system (Dionex) equipped with an electrochemical detector (ED50 Dionex) using a CarboPac PA-200 (2 × 250 mm) column equilibrated at 30 °C with 0.5 mL/min of 0.1 M NaOH. Fructans were eluted with a sodium acetate gradient (5 mM for 5 min, followed by a 5–230 mM linear gradient in 95 min). I-FOS (Raftilosa P95 de Orafiti) with DP from 2 to 7 was used as standard to identify some of the products.

Abbreviations

BC	Batch Culture
DP	Degree of polymerization
EP	Enzyme production
ER	Enzyme reaction
FB	Fed batch operation
FTF	Fungal fructosyltransferase
GPC	Gel Permeation Chromatography
GRAS	Generally recognized as safe

HPAEC-PAD	High-performance anion-exchange chromatography/pulsed amperometric detection
HPLC	High-performance liquid chromatography
I-FOS	Inulin-type fructooligosaccharides
L-FOS	Levan fructooligosaccharides
LevB1	<i>Bacillus licheniformis</i> Endolevanase
LevB1SacB	<i>Bacillus licheniformis</i> Endolevanase (LevB1) and <i>Bacillus subtilis</i> levansucrase (SacB) fusion
LMW	Low molecular weight
OD	Optical density
SacB	<i>Bacillus subtilis</i> Levansucrase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Acknowledgements

We thank Fernando Gonzalez Muñoz for technical assistance, as well as Mario Trejo and Martin Patiño for support in intellectual property rights management.

Author contributions

AAF and ALM conceived and designed the research; SMS, MERA and LC performed the experiments; SMS, MERA and ALM analyzed the data; AAF and ALM wrote and edited the manuscript and AAF, SMS, MERA and LC prepared the figures. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by CONACYT projects CB16-288403 and CB AI-S-21209, as well as DGAPA UNAM project IT200326.

Data availability

All data are included in the manuscript. Further queries or additional information can be requested to the corresponding author.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Centro de Investigación, DACS-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Av. Gregorio Méndez No. 2838-A. Col. Tamulté, 86150 Villahermosa, Centro, Tabasco, Mexico. ²Departamento de Ingeniería Celular Y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad, 2001 Chamilpa, Cuernavaca, Mor., Mexico.

Received: 31 October 2022 Accepted: 21 December 2022

Published online: 26 January 2023

References

- Kolida S, Gibson GR. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *J Nutr.* 2007;137:2503–6.
- Sangeetha PT, Ramesh MN, Prapulla SG. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci Technol.* 2005;16:442–57.
- Franck A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br J Nutr.* 2002;87:S287–91.
- Lafraya A, Sanz-Aparicio J, Polaina J, Marín-Navarro J. Fructo-oligosaccharide synthesis by mutant versions of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:6148–57. <https://doi.org/10.1128/AEM.05032-11>.
- Phengnoi P, Charoenwongpaiboon T, Wangpaiboon K, Klawekla M, Nakapong S, Visessanguan W, et al. Levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens* KK9 and its Y237S variant producing the high bioactive levan-type fructooligosaccharides. *Biomolecules.* 2020;10:78.
- Espinosa-Andrews H, Urías-Silvas JE, Morales-Hernández N. The role of agave fructans in health and food applications: a review. *Trends Food Sci Technol.* 2021;114:585–98.
- Marx SP, Winkler S, Hartmeier W. Metabolization of β -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;182:163–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08891.x>.
- Porras-Domínguez JR, Ávila-Fernández Á, Rodríguez-Alegría ME, Miranda-Molina A, Escalante A, González-Cervantes R, Olvera C, López-Munguía A. Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochem.* 2014;49:783–90.
- Santos-Moriano P, Fernandez-Arrojo L, Poveda A, Jimenez-Barbero J, Bal-lersteros AO, Plou FJ. Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of reaction conditions. *J Mol Catal B Enzym.* 2015;119:18–25.
- Ortiz-Soto ME, Porras-Domínguez JR, Rodríguez-Alegría ME, Morales-Moreno LA, Díaz-Vilchis A, Rudiño-Piñera E, Beltrán-Hernández NE, Rivera HE, Seibel J, López-Munguía A. Implications of the mutation S164A on *Bacillus subtilis* levansucrase product specificity and insights into protein interactions acting upon levan synthesis. *Int J Biol Macromol.* 2020;161:898–908.
- Singh RS, Singh RP, Kennedy JF. Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. *Int J Biol Macromol.* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.026>.
- Porras-Domínguez JR, Rodríguez-Alegría ME, Ávila-Fernández Á, Montiel-Salgado S, López-Munguía A. Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrase-endolevanase fusion enzyme (LevB1SacB). *Carbohydr Polym.* 2017;177:40–8.
- Porras-Domínguez JR, Rodríguez-Alegría ME, Miranda A, Alvarez Berber LP, Edmundo C, López MA. Fructooligosaccharides purification: Complexing simple sugars with phenylboronic acid. *Food Chem.* 2019;285:204–12.
- Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98:5301–17. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>.
- Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24:45–66. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 2000;16:23–52. <https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23>.
- Damasceno LM, Huang C-J, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;93:31–9. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3654-z>.
- Spohner SC, Müller H, Quitmann H, Czermak P. Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *J Biotechnol.* 2015;202:118–34.
- Macaulay-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 2005;22:249–70.
- Ge F, Zhu L, Aang A, Song P, Li W, Tao Y, et al. Recent advances in enhanced enzyme activity, thermostability and secretion by N-glycosylation regulation in yeast. *Biotechnol Lett.* 2018;40:847–54. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2526-3>.
- Raschmanová H, Weninger A, Knejzlik Z, Melzoch K, Kovar K. Engineering of the unfolded protein response pathway in *Pichia pastoris*: enhancing production of secreted recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021;105:4397–414. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11336-5>.
- Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit.* 2005;18:119–38.
- Raga-Carbajal E, López-Munguía A, Alvarez L, Olvera C. Understanding the transfer reaction network behind the non-processive synthesis of low molecular weight levan catalyzed by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Sci Rep.* 2018;8:15035. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32872-7>.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 1959;31:426–8.
- Porras-Domínguez JR, Ávila-Fernández Á, Miranda-Molina A, Rodríguez-Alegría ME, López-Munguía A. *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB)

activity affects average levan molecular weight. *Carbohydr Polym.* 2015;132:338–44.

26. Laemmli UK. SDS-page Laemmli method. *Nature.* 1970;227:680–5.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

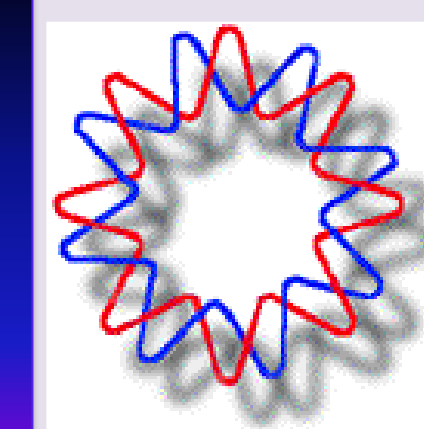
At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions





Levan-type fructooligosaccharides production by enzymatic synthesis.

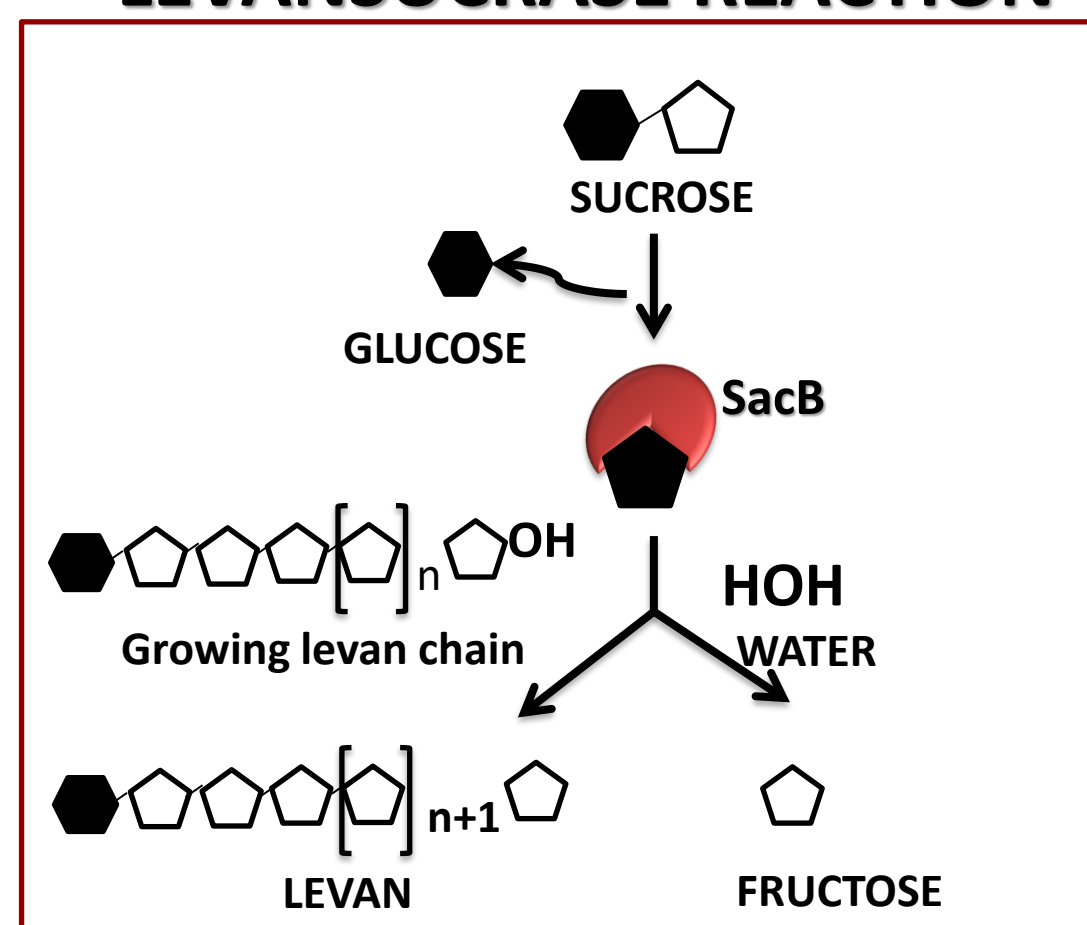


Jaime R. Porras-Domínguez^a, María Elena Rodríguez-Alegría^a, Ángela Ávila-Fernández^b, Silvia Montiel-Salgado^a, Agustín López-Munguía^a. ^a Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, México ^b Centro de Investigación, DACS-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Av. Gregorio Méndez no. 2838-A, Col. Tamulte, CP 86150, Villahermosa, Centro, Tabasco, Mexico. maelena@ibt.unam.mx.

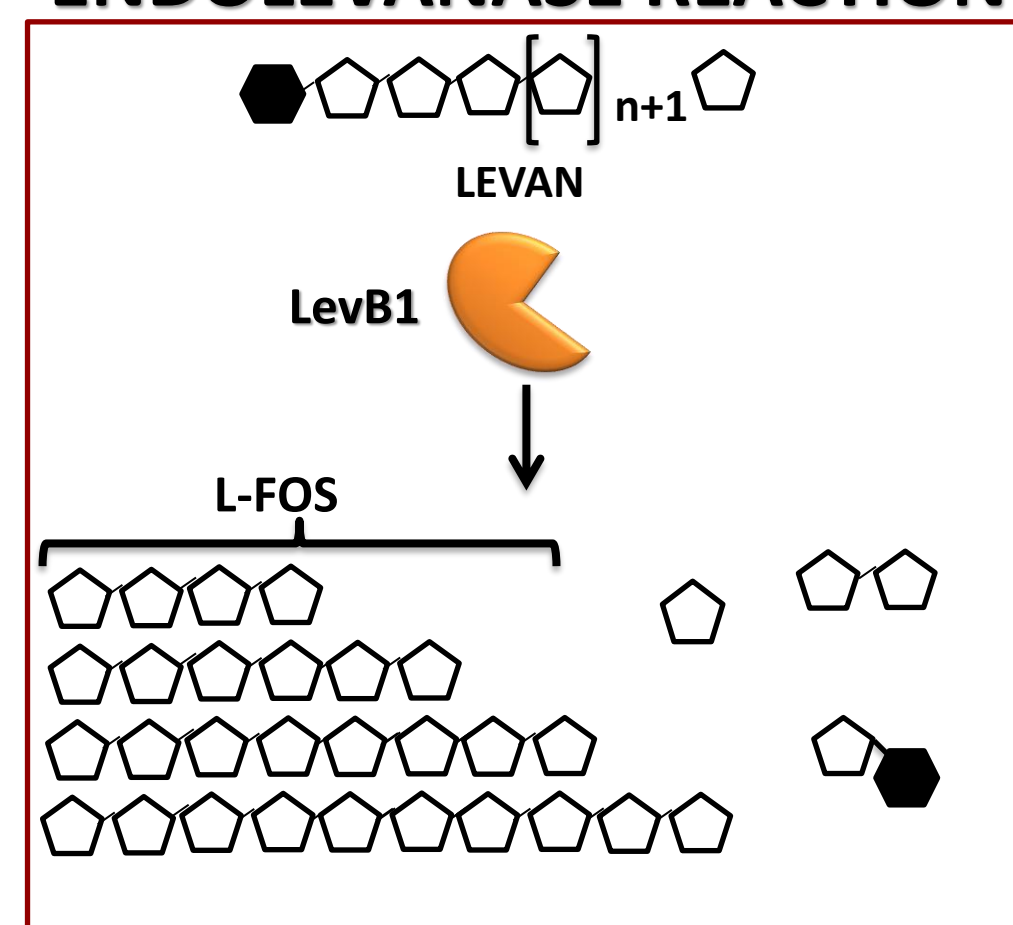
INTRODUCTION

Fructooligosaccharides (FOS) are complex sugars with polymerization degree (DP) 2-10 fructosyl residues bearing either β -1 (inulin-type) or β -2-6 (levan-type or L-FOS). Although both have been recognized as prebiotic, levan-type (L-FOS) have not yet been fully characterized as they are not commercially available. In this work we describe an enzymatic production process for L-FOS with a DP from 2 to 10, through simultaneous levan synthesis (levansucrase, SacB) and levan hydrolysis (endolevanase, LevB1) reactions. The reaction was accomplished with a fusion protein named LevB1SacB, a new enzyme resulting from the expression of the gene coding for SacB, a levansucrase from *Bacillus subtilis*, and the gene coding for LevB1, an endolevanase from *B. licheniformis*, with a 6 peptide linker. (1)

LEVANSUCRASE REACTION

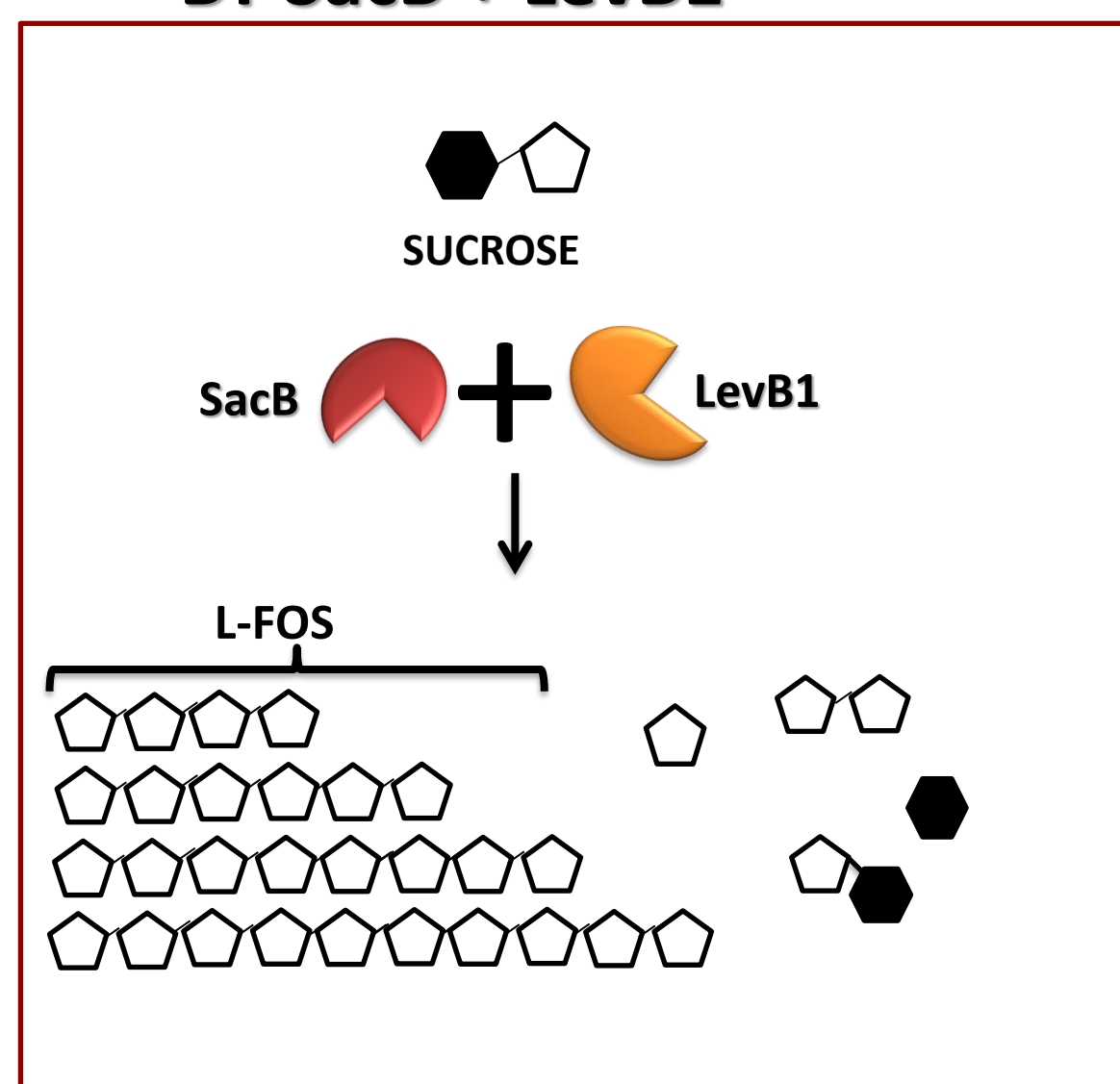


ENDOLEVANASE REACTION

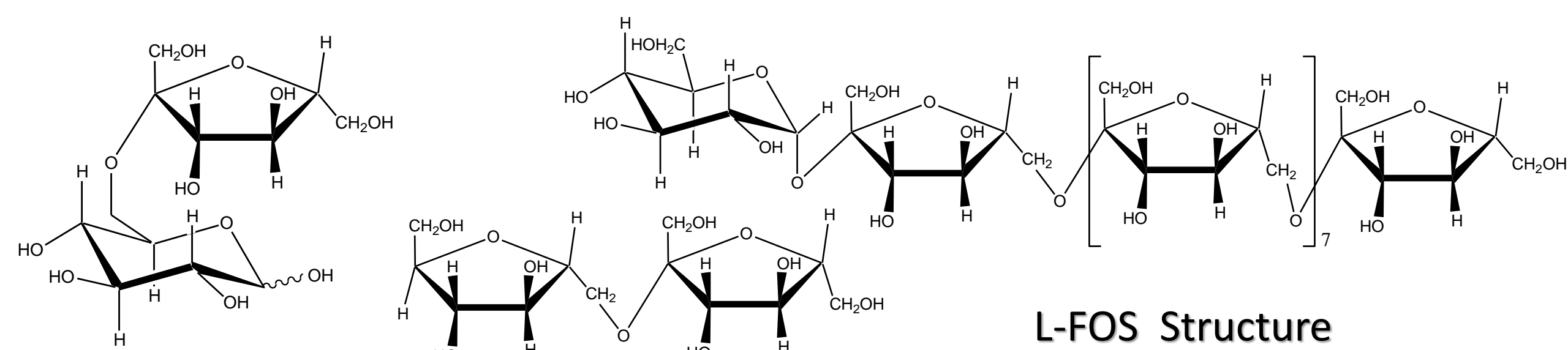
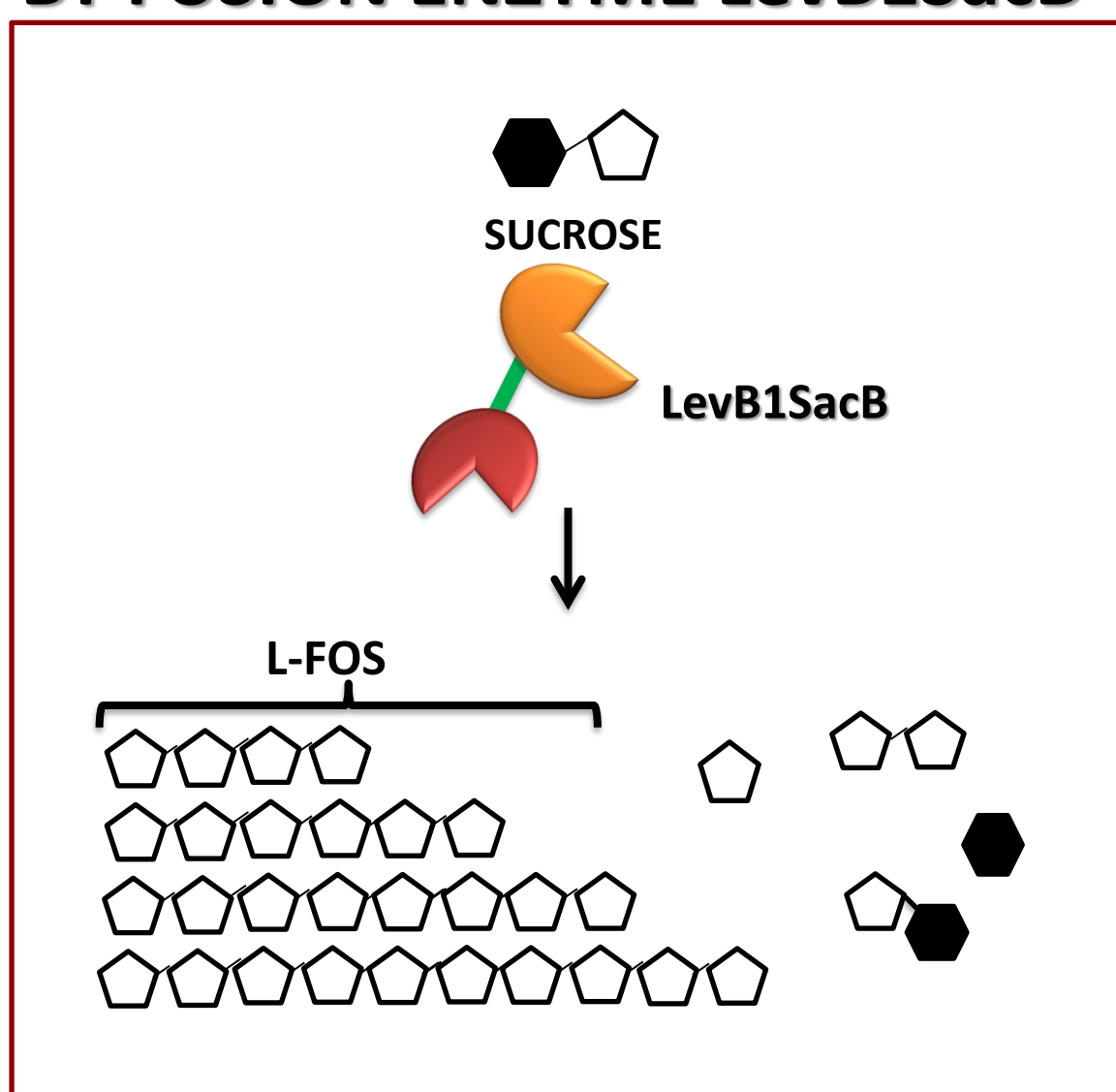


SIMULTANEOUS LEVAN SYNTHESIS AND LEVAN HYDROLYSIS

BY SacB + LevB1



BY FUSION ENZYME LevB1SacB



RESULTS

L-FOS synthesis by simultaneous SacB & LevB1 reactions.

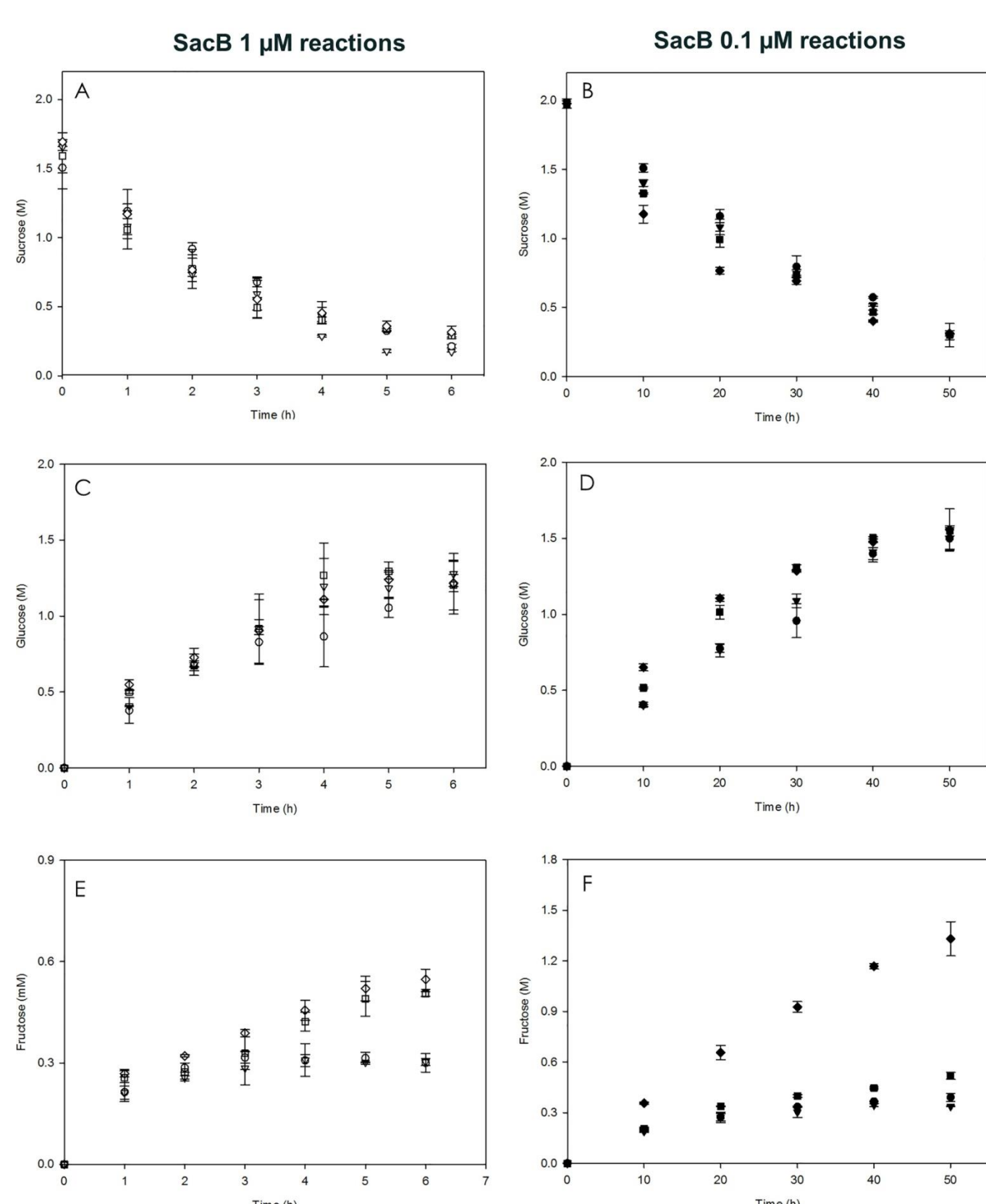


Fig. 1. Evolution of sucrose (A & B) consumption, glucose (C & D) and fructose (E & F) release at different SacB/LevB1 ratios from 600 g/l sucrose at 37 °C, pH 6.0, 50 mM acetate buffer 1 mM CaCl₂. Open symbols correspond to reactions at 1 mM of SacB at different SacB/LevB1 ratios 1-0 (○), 1-1 (Δ), 1-10 (□) and 1-20 (◇). Closed symbols correspond to reactions at 0.1 mM of SacB at different SacB/LevB1 ratios 1-0 (●), 1-1 (▲), 1-10 (■) and 1-20 (◆).

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 SacB and LevB1 concentration ratio on the product profile was studied.

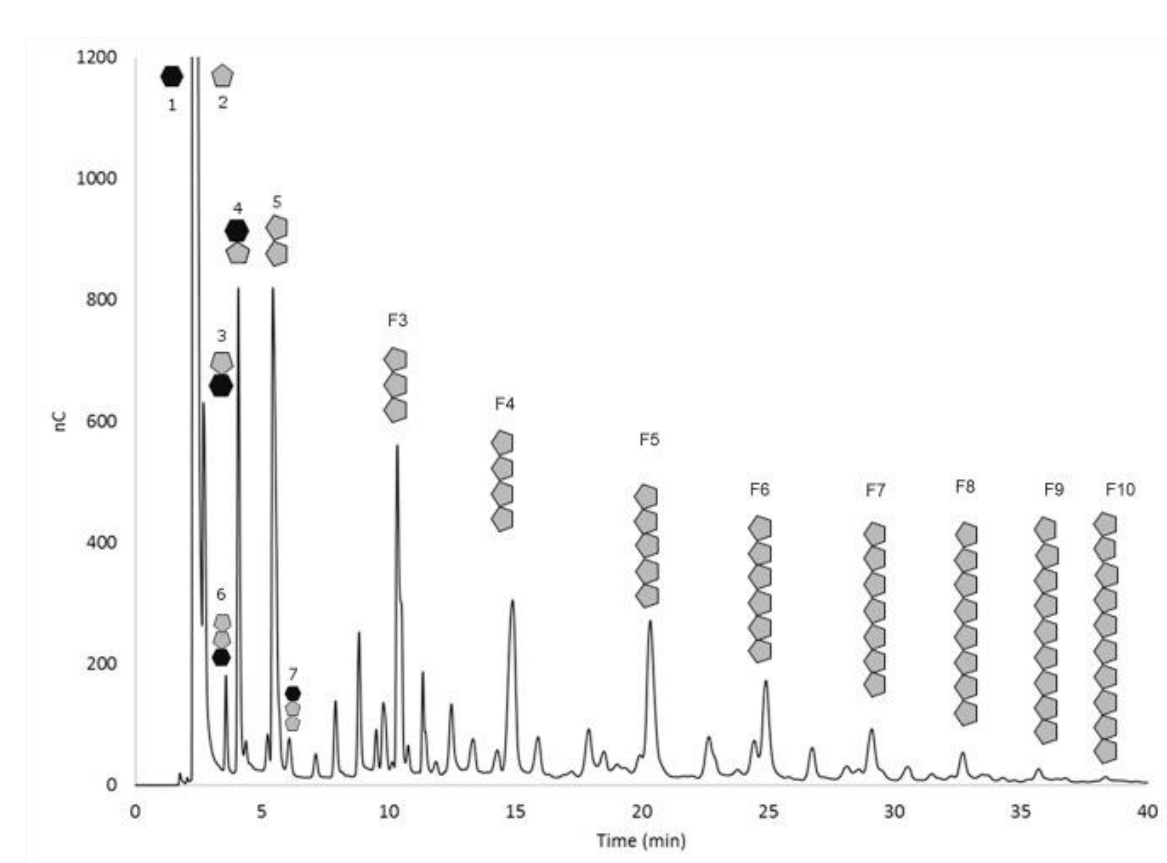


Fig. 2. L-FOS product profile observed by HPAEC-PAD, as obtained from SacB/LevB1 reactions with 1 μM of each enzyme, 600 g/l sucrose, 37 °C, pH 6.0, 50 mM acetate buffer 1 mM CaCl₂. The figures over the signals are drawn to give an idea of the most probable polymerization degree as concluded from standards. Grey pentagons represent fructose molecules (oligofructans) β -2-6 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.

Table 1. L-FOS synthesis yields obtained at different SacB/LevB1 ratios.

SacB (μM)	LevB1 (μM)	SacB/LevB1 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 of polymerization was determined from HPAEC-PAD standards.

L-FOS production by the fusion enzyme: LevB1SacB

Considering the advantages of a LevB1SacB 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 fusion enzyme. For this purpose, the genes coding for LevB1 and SacB were included in a single construction linked with a short sequence, consisting of the hexapeptide: GGSGGS.

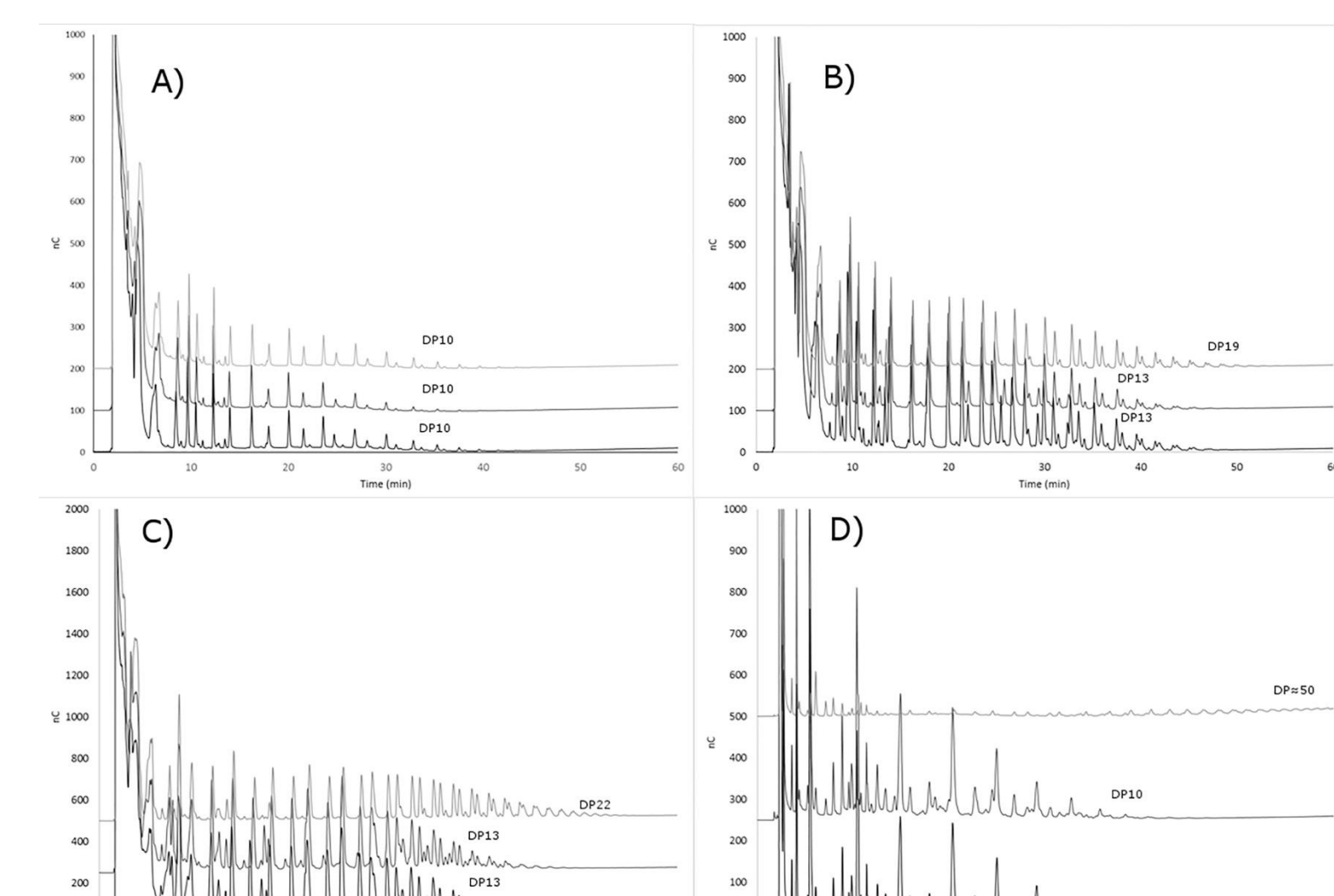
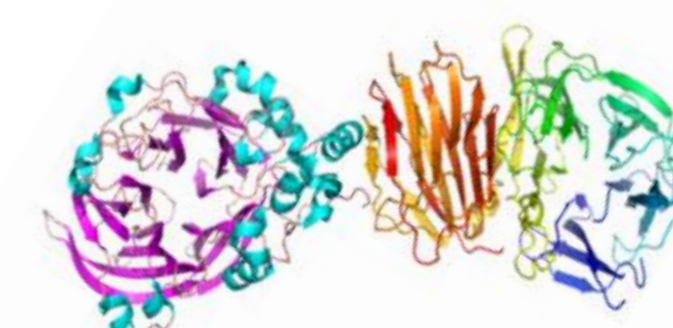


Fig. 3 L-FOS product profile during initial reaction conditions as observed by HPAEC-PAD obtained with SacB (light gray), simultaneous SacB and LevB1 (dark gray) and LevB1SacB (black). Reaction conditions: 10 U/ml, 600 g/l sucrose, 37 °C, pH 6.0, 50 mM acetate buffer. A) 10 min, B) 30 min and C) 50 min. D) 6 h. DP # represents the maximum degree of polymerization observed.

Table 2. Final yields of the main products obtained in the simultaneous LevB1 and SacB and the fusion enzyme (LevB1SacB) reaction systems.

	Yield (w/w) %	L-FOS g/l	Blastose g/l	Levanbiose g/l	Maximum DP
LevB1:SacB 1:1	36.9	235±7.6	16.39±4.3	57.01±4.8	10
LevB1SacB	41.1	245±9.3	11.04±2.7	48.90±5.2	10



L-FOS production by LevB1SacB in a 2l reactor

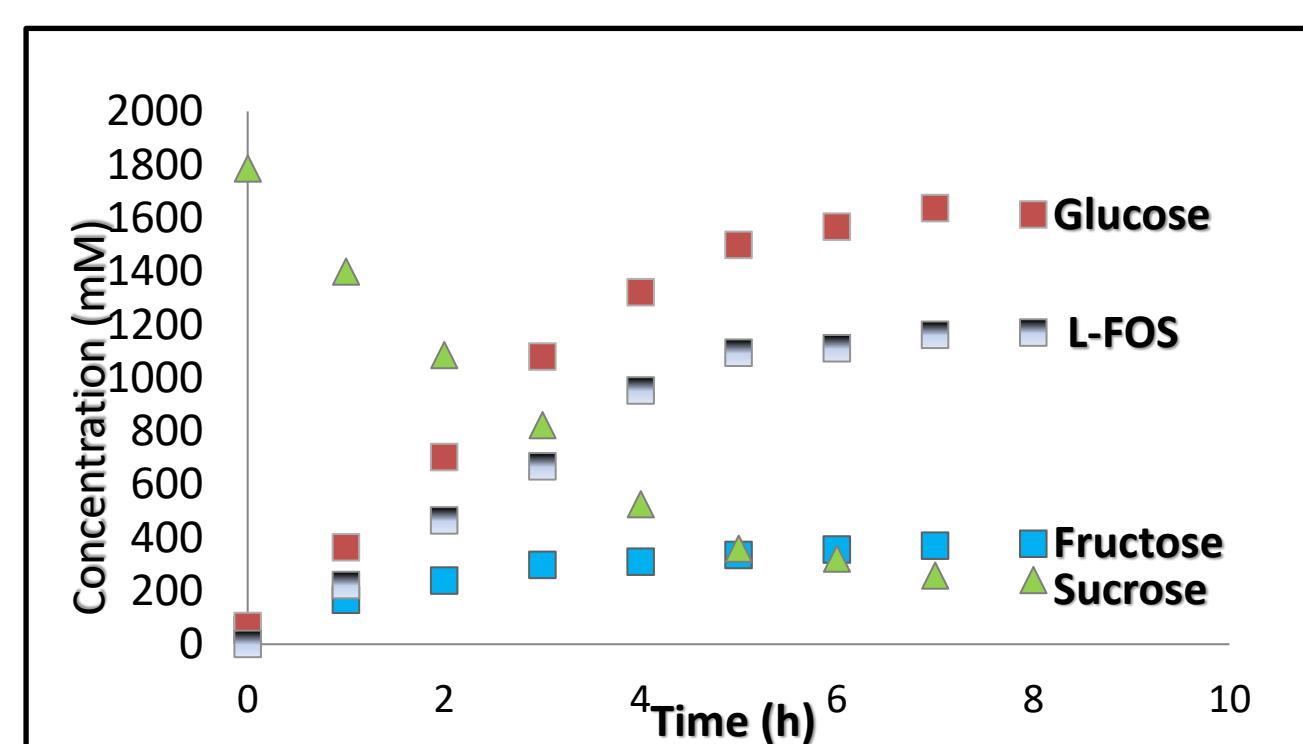


Fig. 4. Production kinetics of L-FOS in a 1.7 l reaction using the enzyme LevB1SacB (7.5 U / mL), 600 g/l of sucrose buffer acetatos pH 6.0 50mM, 1 mM CaCl₂, 37 °C and 300 rpm.

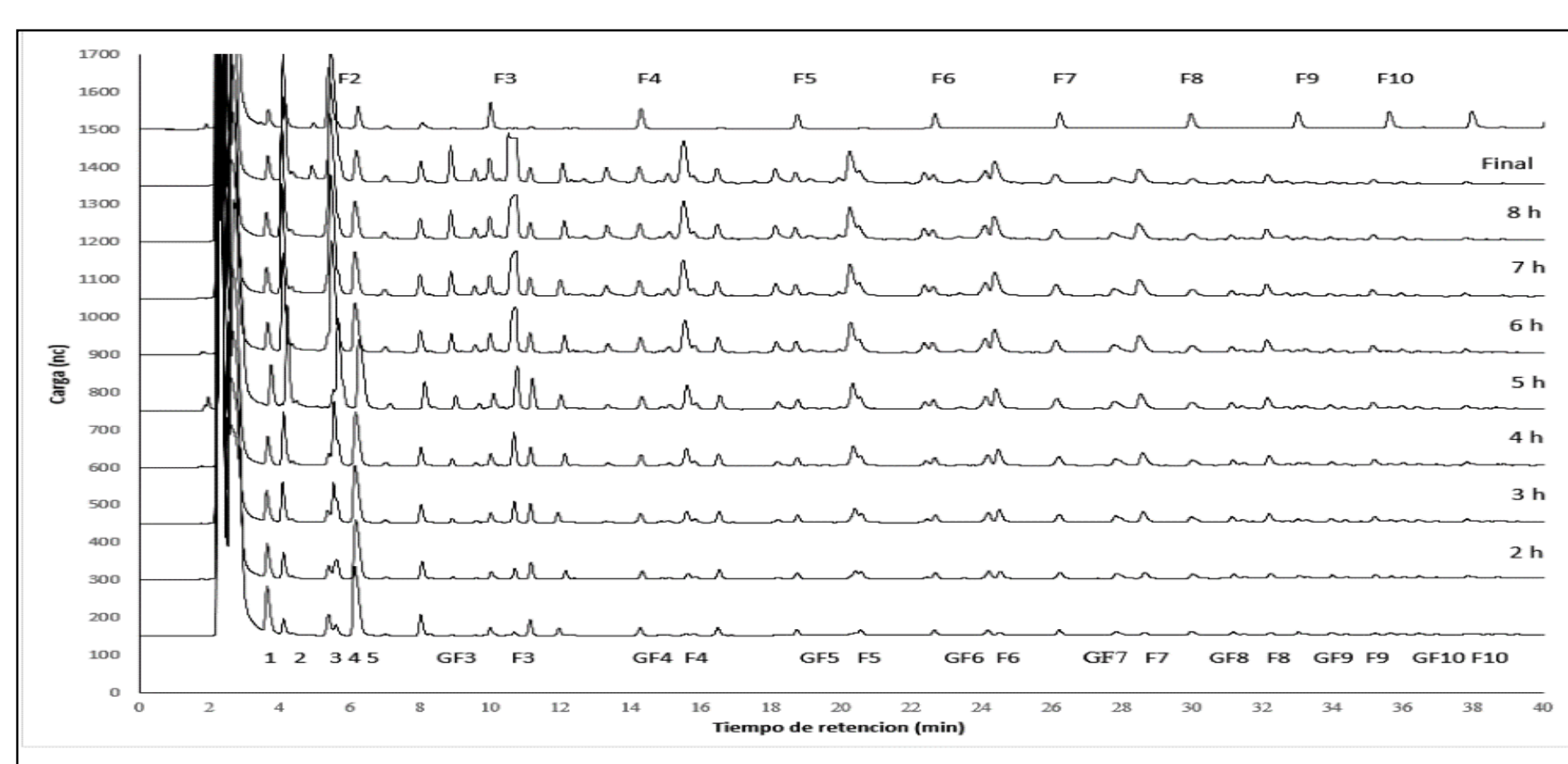


Fig 5. Evolution of the L-FOS profile as observed by HPAEC-PAD in a 1.7 l reaction, samples taken during a 6 h synthesis from sucrose(600 g/L) in the presence of LevB1SacB at 37 °C, buffer acetatos pH 6.0 50mM, 1 mM CaCl₂. 1) 1-kestose, 2) blastose, 3) 6-kestose 4) levanbiose 5)neo-kestose

Reaction Volume (l)	Reaction Time (h)	Fructose (M)	Glucose (M)	L-FOS (mM)	Yield (w/w) %
1.7	8	0.454	1.63	1.16	32.5
0.6	8	0.376	1.6	1.17	33.0

Table 3. Scale up yield and product concentration in reactions carried out at 0.6 and 1.7 l.

METHODS

Cloning and expression of SacB, LevB1 and LevB1SacB and enzymes purification were made as previously reported (Porras-Domínguez et al., 2017). The reaction products were analyzed by HPLC in three chromatographic systems; (A) Oligofructosides by anion exchange chromatography with a detector electrochemical / amperometric using a CarboPac-200 column (2x250mm) (B) Polymer (Fructans) by gel permeation chromatography coupled to an index detector refraction using system of gel permeation columns connected in series: Ultrahydrogel Linear (7.8x300mm) and Ultrahydrogel 500 (7.8x300mm). (C) Fructose, Glucose and Sucrose by ion exchange chromatography with a refractive index detector using a column for carbohydrate analysis Prevail Carbohydrate.

CONCLUSIONS

Two alternative procedures to obtain levan-type prebiotics are here described, involving either the individual enzymes (SacB and LevB1) in a single one-pot reaction containing equimolar concentrations of both enzymes, or the fusion enzyme LevB1SacB containing both activities. L-FOS structures with DP from 2 to 10 are synthesized. As demonstrated, a very similar reaction evolution, product profile and reaction yield are observed in both systems. The levan-type FOS include levanbiose, blastose and 6-kestose as main products. The process is readily scaled with a similar kinetic behavior observed in 1 ml assay tubes and 2 l agitated reactions.

BIBLIOGRAPHY

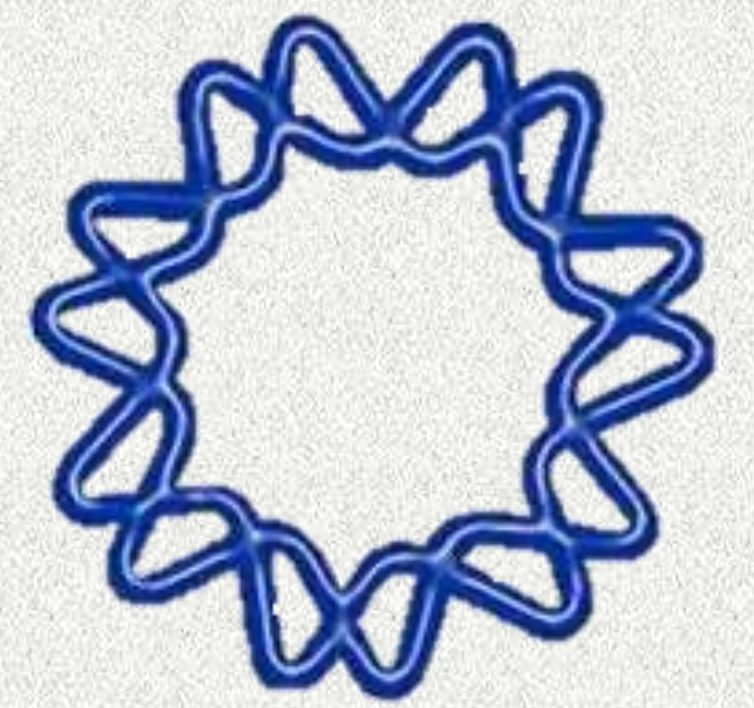
1. Porras-Domínguez, J.R. Rodríguez-Alegría, M.E. Ávila-Fernández, A. Montiel-Salgado S, López-Munguía A. 2017. Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrase-endolevanase fusion enzyme (LevB1SacB). *Carbohydrate Polymers*, 177, 40-48.

ACKNOWLEDGEMENT

DGAPA-UNAM for the financial support of project PAPIIT No. IT200316 and CONACYT C0013-2015-06, project 267620.



Expresión de una enzima de fusión en *Pichia pastoris* para la síntesis de fructooligosacáridos

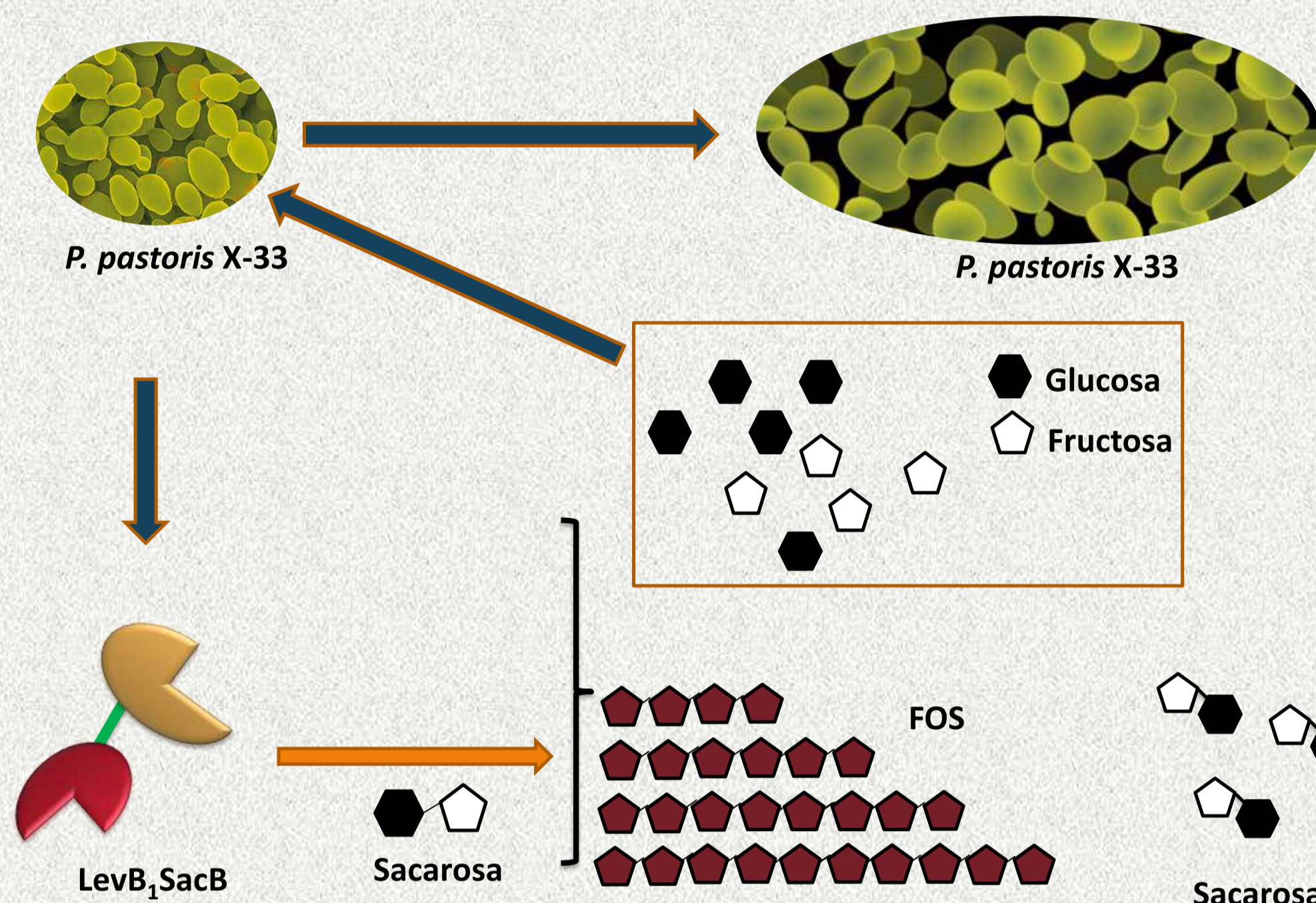


Montiel-Salgado Silvia, Rodríguez-Alegría María Elena, Ávila-Fernández Ángela, Porrás-Domínguez Jaime Ricardo & López-Munguía Agustín.
Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa. Cuernavaca, Mor 62240, México.

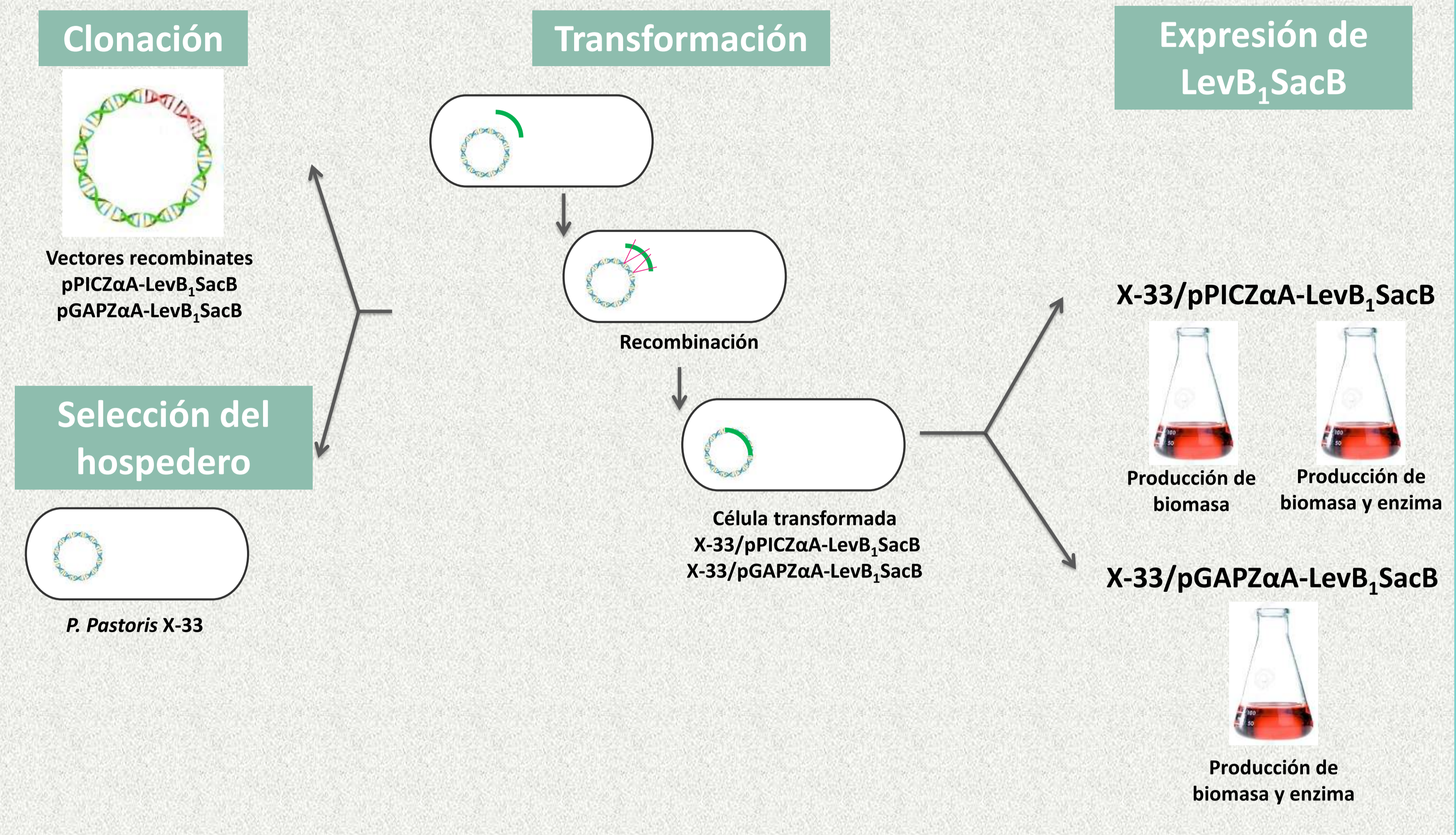
INTRODUCCIÓN

Los fructooligosacáridos (FOS) son azúcares complejos de gran importancia en la industria alimentaria debido a sus propiedades prebióticas. Porrás-Domínguez y col., (1) diseñaron y expresaron en *E. coli* el gen que codifica para la enzima de fusión formada por la endolevanasa de *B. licheniformis* (LevB₁) y la levansacarasa (SacB) de *B. subtilis* para sintetizar L-FOS a partir de sacarosa. La presencia de glucosa y fructosa, subproducto de la reacción, son monosacáridos no prebióticos, por lo que es necesario removerlos.

P. pastoris, un microorganismo GRAS metaboliza glucosa y fructosa pero no L-FOS y sacarosa (2). El objetivo del presente estudio es producir la enzima de fusión LevB₁SaB en el sistema de expresión *P. pastoris*, con el objetivo de realizar un proceso simultáneo de síntesis de L-FOS y de consumo de monosacáridos por la propia *P. pastoris*.



MÉTODOS



RESULTADOS

Evaluación de *P. pastoris* X-33/pPICZαA-LevB₁SacB y X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB

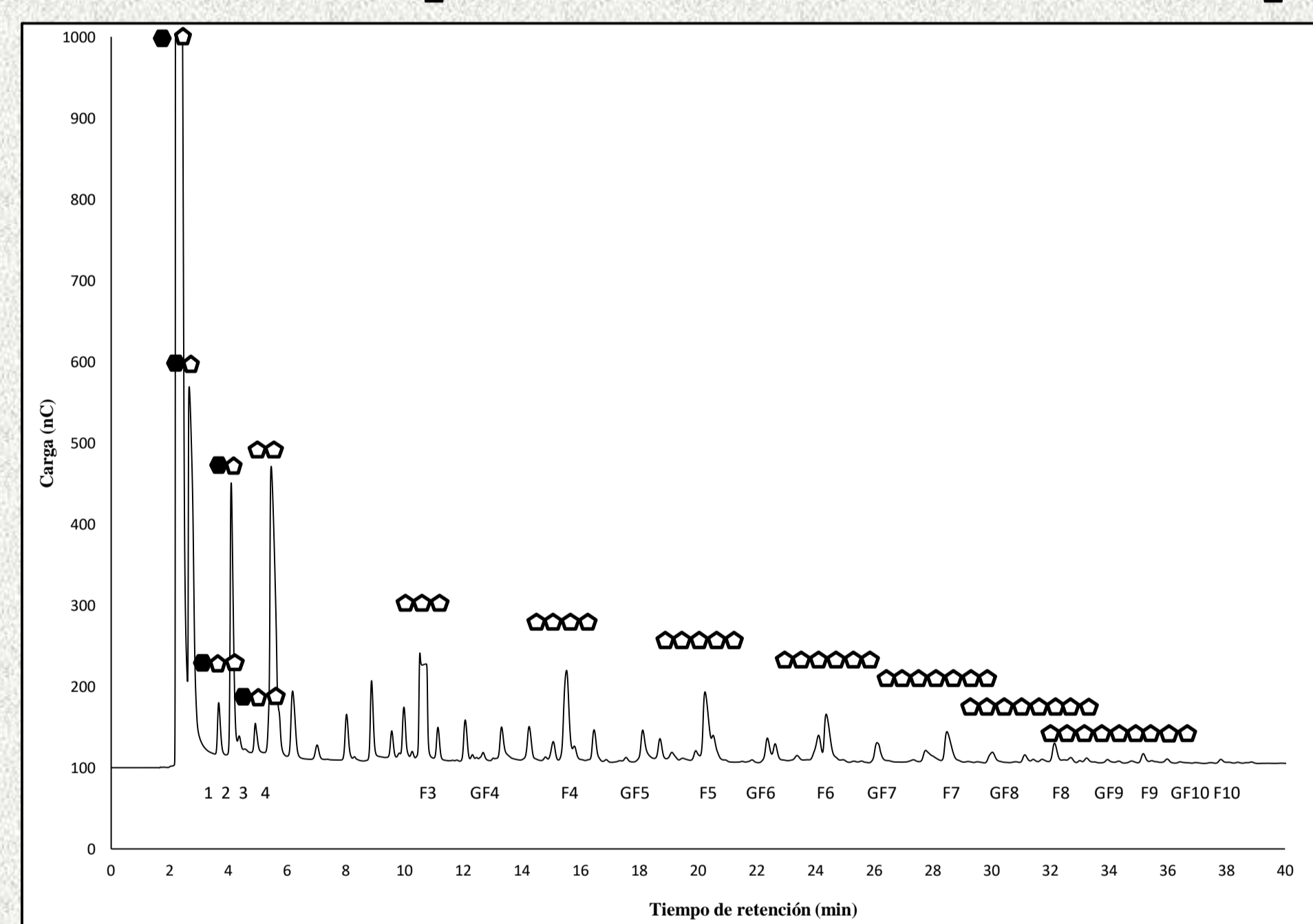


Fig 1. Perfil de L-FOS producidos por LevB₁SacB expresada por *P. pastoris* X-33 recombinante. 1) 1-kestosa, 2) blastosa, 3) 6-kestosa, 4) levnobiosa.

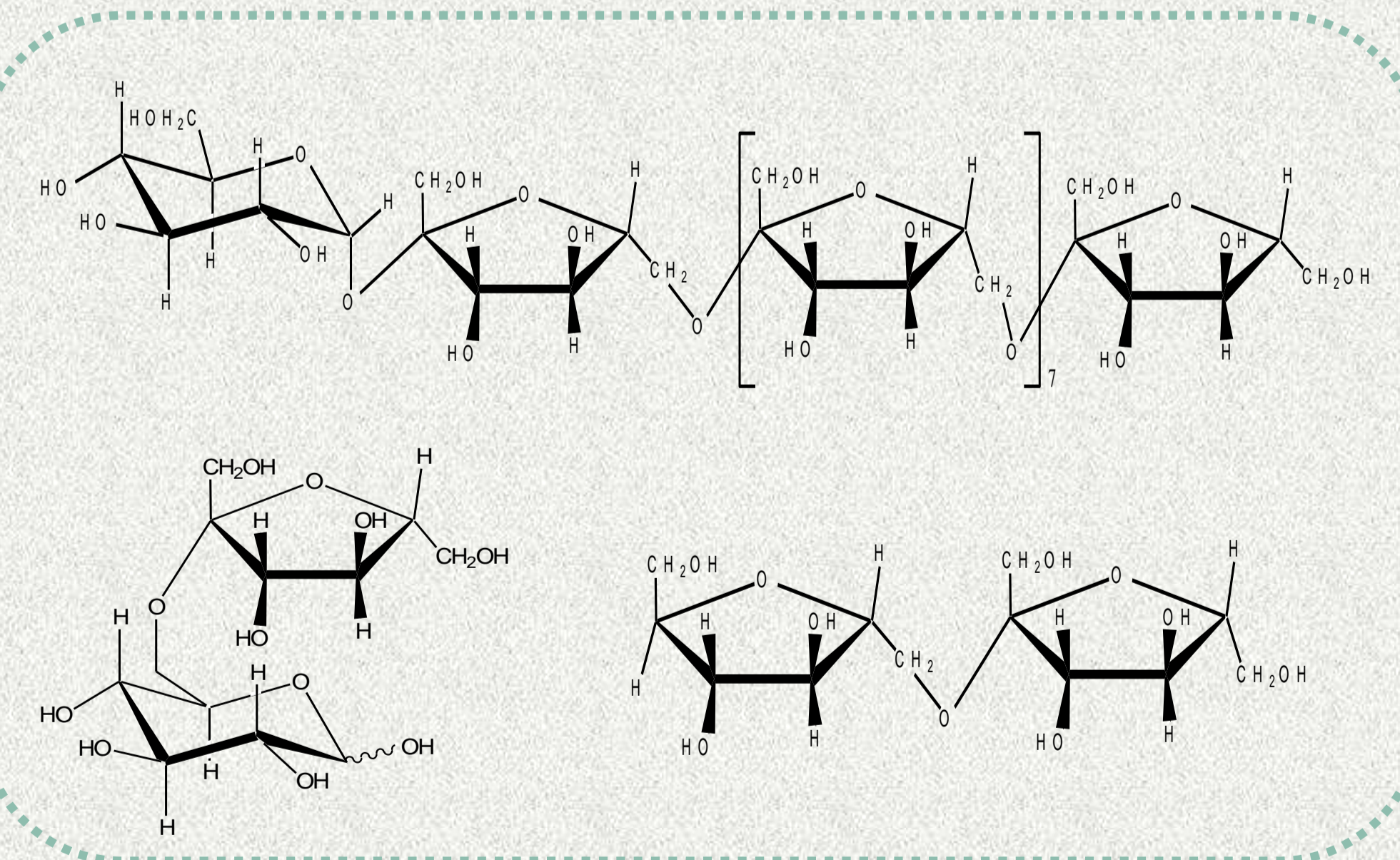
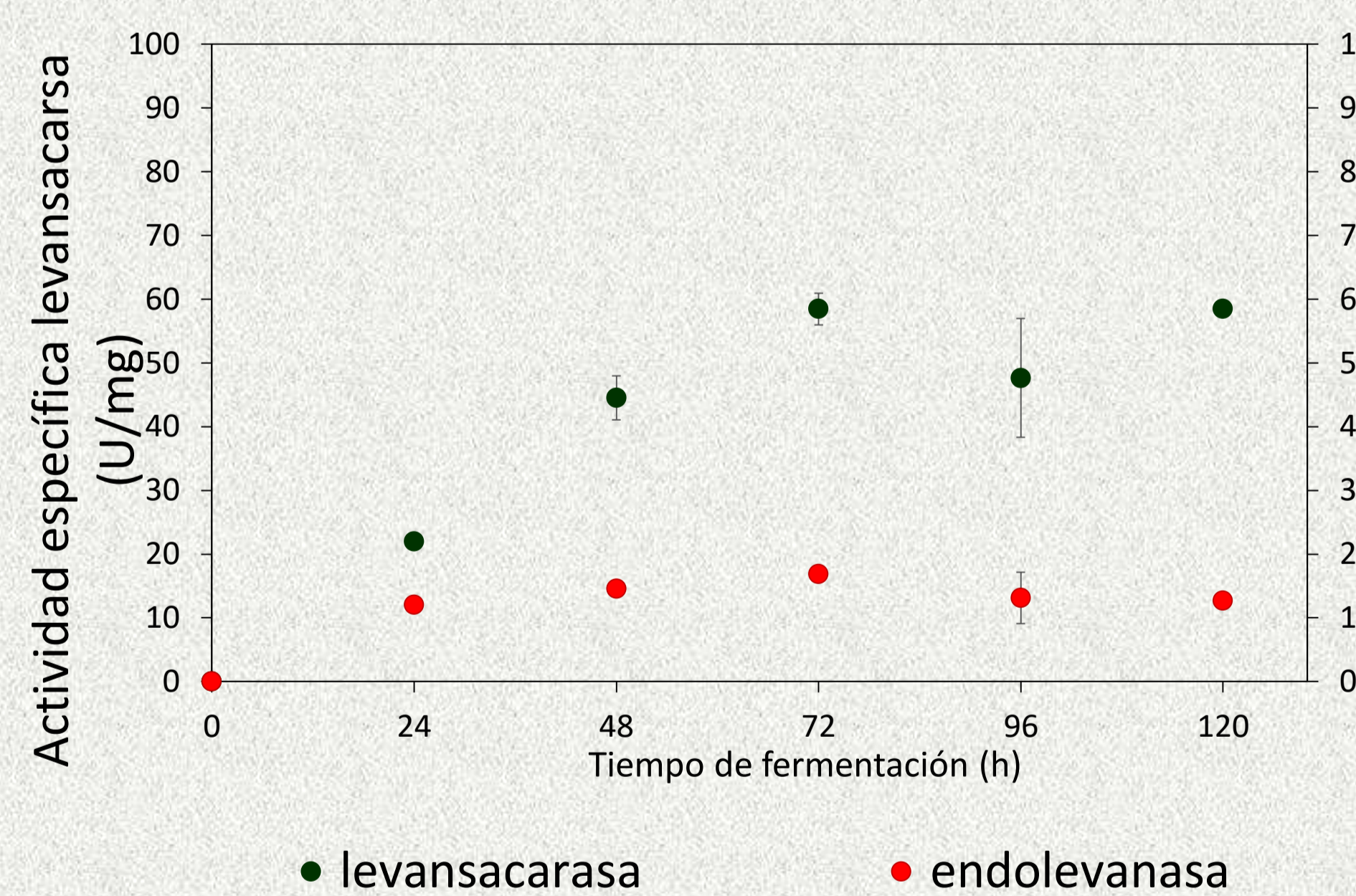
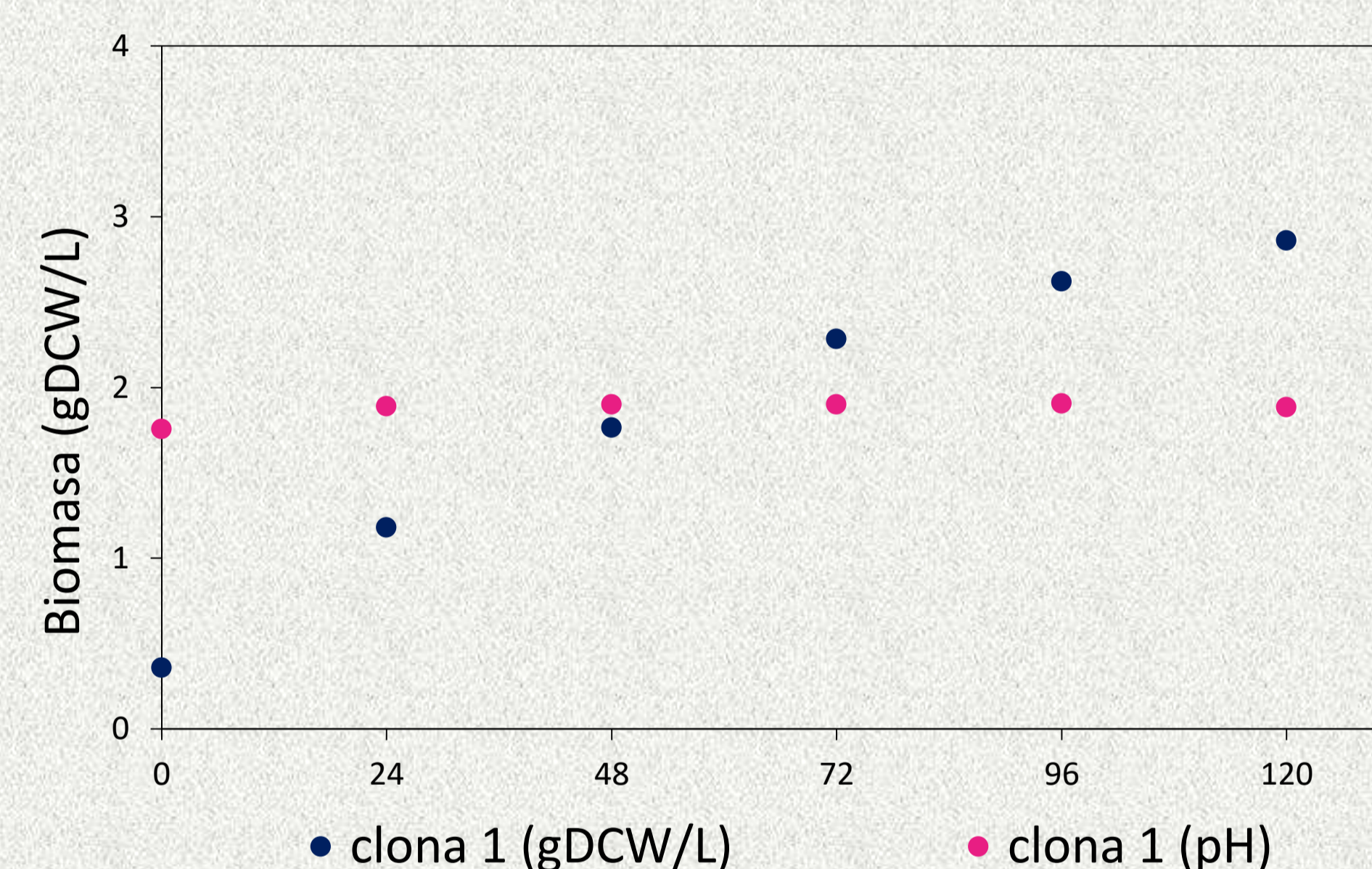


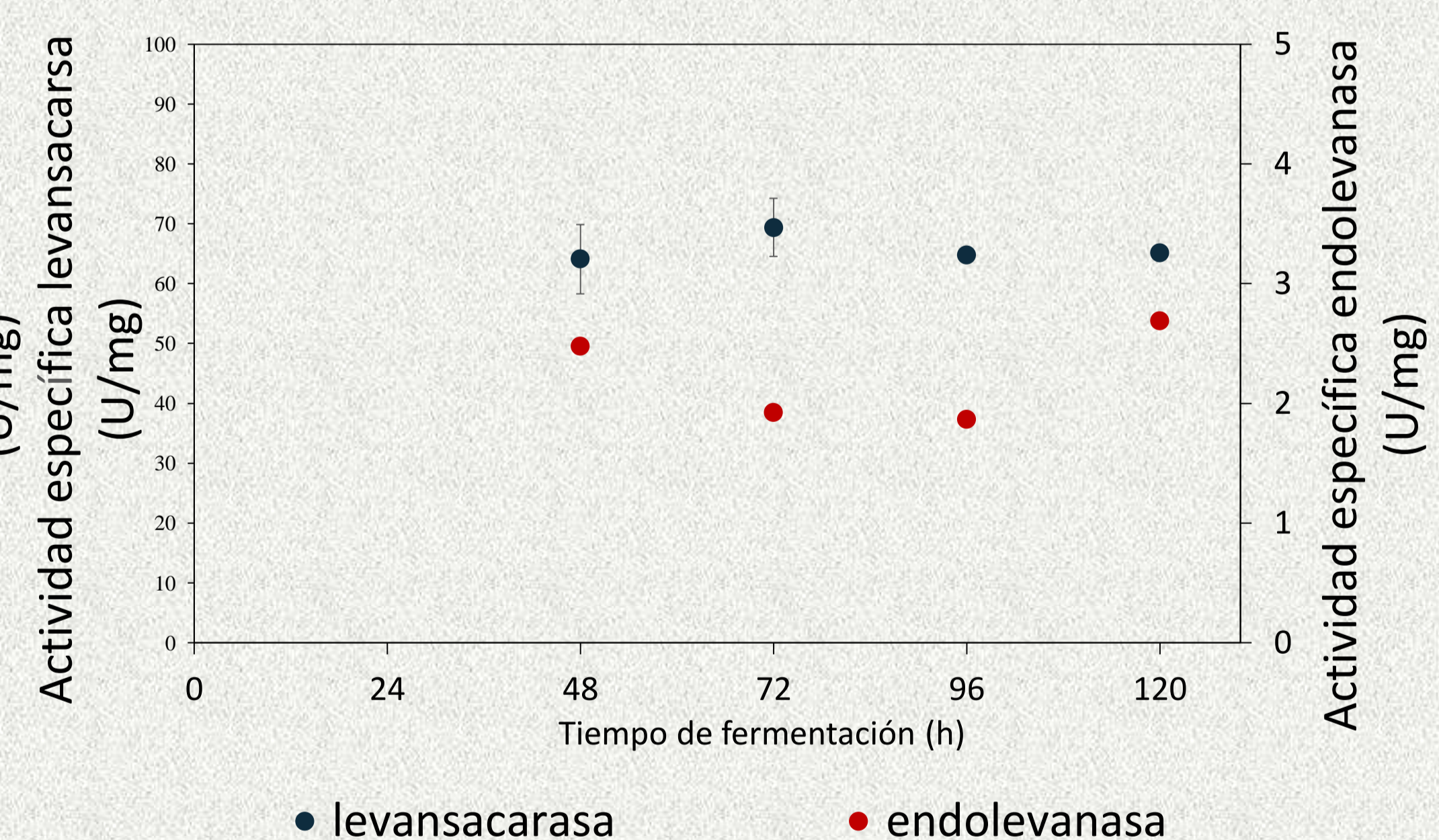
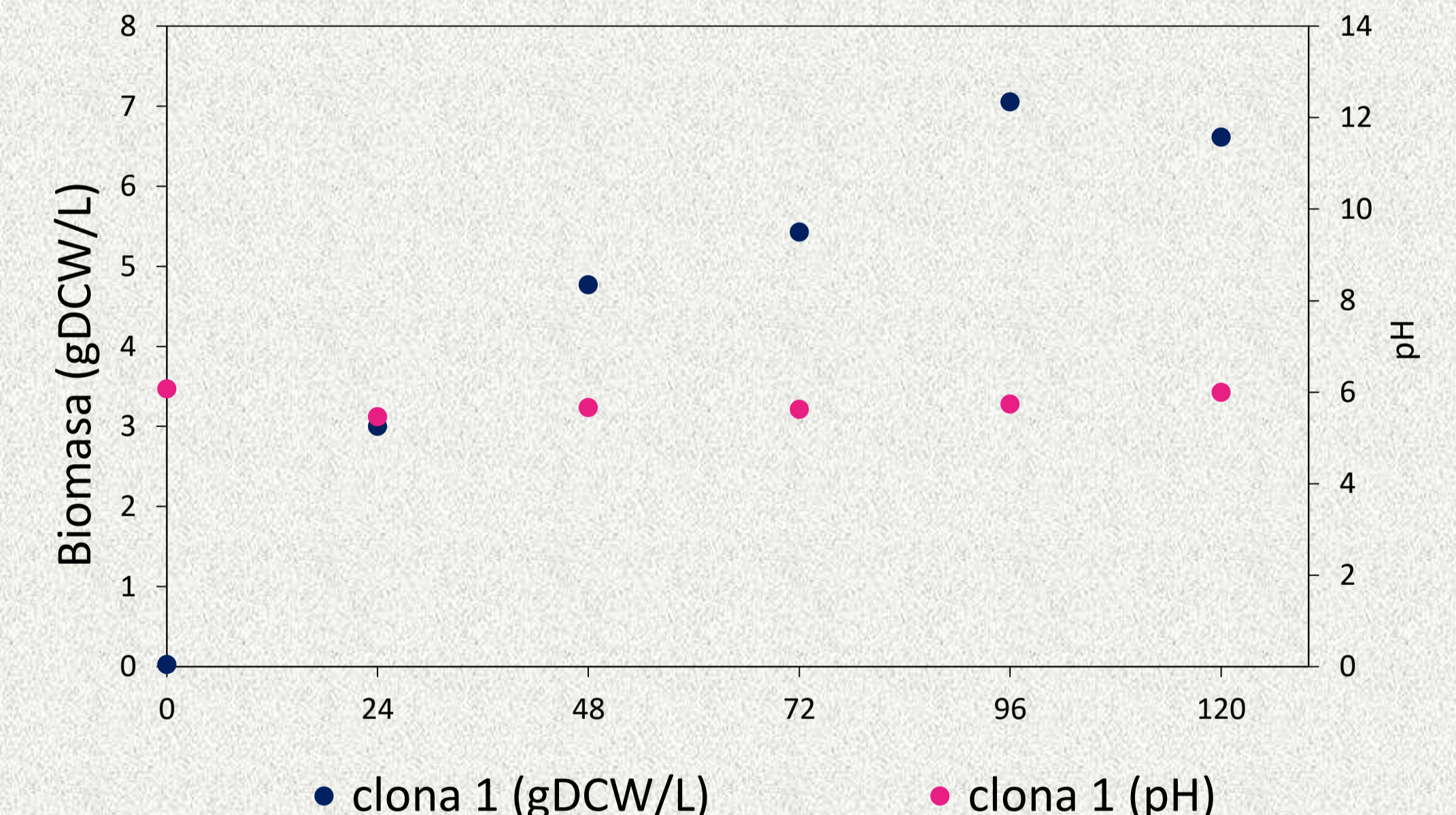
Tabla 1. Comparación entre el sistema de expresión *P. pastoris* X-33 y *E. coli* Rosetta 2.

Sistema de expresión	Tiempo de fermentación (h)	Biomasa (gDCW/L)	pH	Actividad levansacarasa (U/L)	Actividad endolevanasa (U/L)	Proteína (mg/L)	Actividad específica levansacarasa (U/mg)	Actividad específica endolevanasa (U/mg)	Relación SacB/LevB ₁
X-33/pPICZαA-LevB ₁ SacB	120	2.86	6.5	41347	241	707	58	1.3	56
X-33/pGAPZαA-LevB ₁ SacB	120	6.6	5.5	4256	225	65	65	2.5	24
Rosetta2/pET22+LevB ₁ SacB							60.9	43.7	1.39

Sistema de expresión inducible X-33/pPICZαA-LevB₁SacB



Sistema de expresión constitutivo X-33/pGAPZαA-LevB₁SacB



CONCLUSIONES

El sistema de producción LevB₁SacB en *P. pastoris* X-33 es más eficiente en el sistema de expresión inducible con metanol bajo el control del promotor AOX1 que en el sistema de expresión constitutivo bajo el control del promotor GAP. Se obtuvo una relación de actividad SacB/LevB₁ en el sistema de expresión de *P. pastoris* X-33 menor que el sistema de expresión *E. coli* Rosetta 2. Es decir, la actividad endolevanasa (LevB₁) de la enzima de fusión LevB₁SacB, no está siendo producida eficientemente por *P. pastoris* X-33. Si bien se tienen varias hipótesis como pueden ser un plegamiento deficiente un efecto negativo de glicosilación, aún no se determina el origen del problema.

AGRADECIMIENTOS

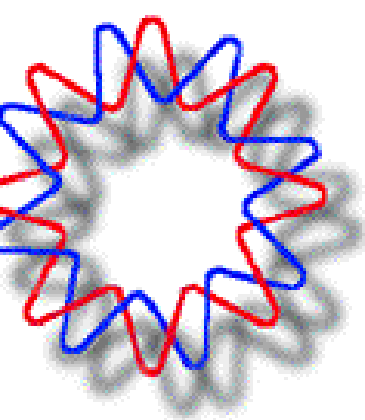
CONACYT

BIBLIOGRAFIA

- Porrás-Domínguez, J. R. y col., (2017). Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrose-endolevanase fusion enzyme (LevB₁SacB). Carbohydrate polymers, 177:40-48.
- Yang Y. y col., (2008). Preparation of High-Purity fructooligosaccharides by *Aspergillus japonicus* β-fructofuranosidase and successive cultivation with yeast. Journal Agricultural and Food Chemistry, 56: 2805-2809.



Fed batch levan-type FOS synthesis and sugar by-products elimination by a recombinant *Pichia pastoris* strain expressing a gene coding for a levansucrase-endolevanase fusion protein.



María Elena Rodríguez-Alegría^a, Silvia Salgado Montiel, Ángela Ávila-Fernández^b, Luis Caspeta^a, Agustín López-Munguía^a. ^a Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, México ^b Centro de Investigación, DACS-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Av. Gregorio Méndez no. 2838-A, Col. Tamulte, CP 86150, Villahermosa, Centro, Tabasco, Mexico. maelena@ibt.unam.mx

INTRODUCTION

Levan-type fructooligosaccharides (L-FOS) have been shown to exhibit prebiotic properties, but no efficient methods for their large-scale production have been proposed. One alternative relies on the simultaneous levan synthesis by levansucrase from sucrose, followed by a controlled endolevanase hydrolysis (Fig 1A). In this context, we have previously proposed the direct synthesis of L-FOS through a single reaction catalyzed by a fusion quimeric protein (LevB1SacB) combining *Bacillus licheniformis* endolevanase (LevB1) and *Bacillus subtilis* levansucrase (SacB) produced in a transformed *E.coli* strain¹. In this work we describe *Pichia pastoris* fed batch cultures in which the synthesis of L-FOS from sucrose by LevB1SacB and the elimination of the residual monosaccharides by *P.pastoris* are carried out simultaneously (Fig1 C)

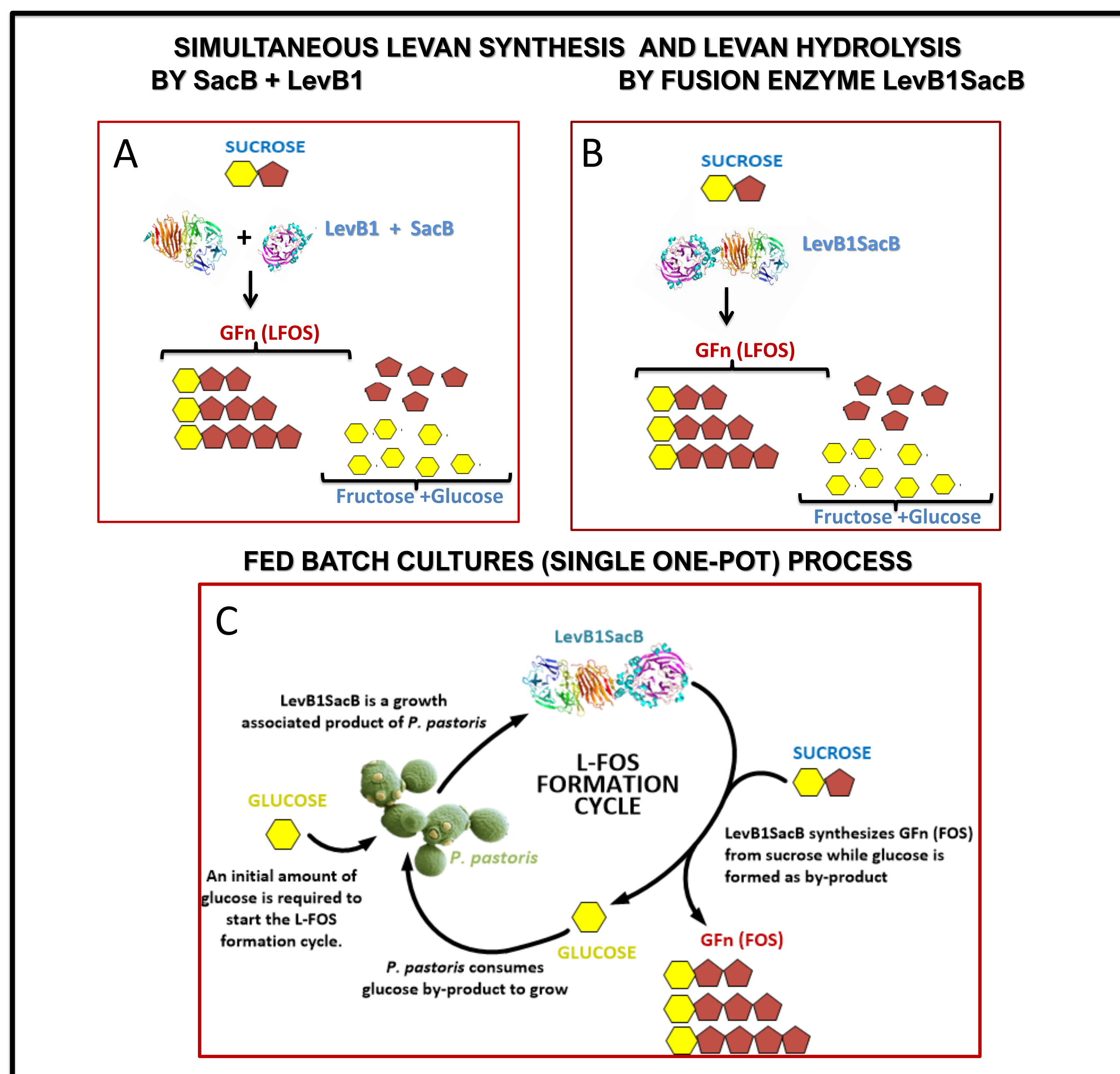


Fig 1. L-FOS synthesis by different strategies combining Levansucrase (SacB) and Endolevanase (LevB1)

RESULTS

Selection of constitutive transformants expressing the fusion enzyme LevB1SacB

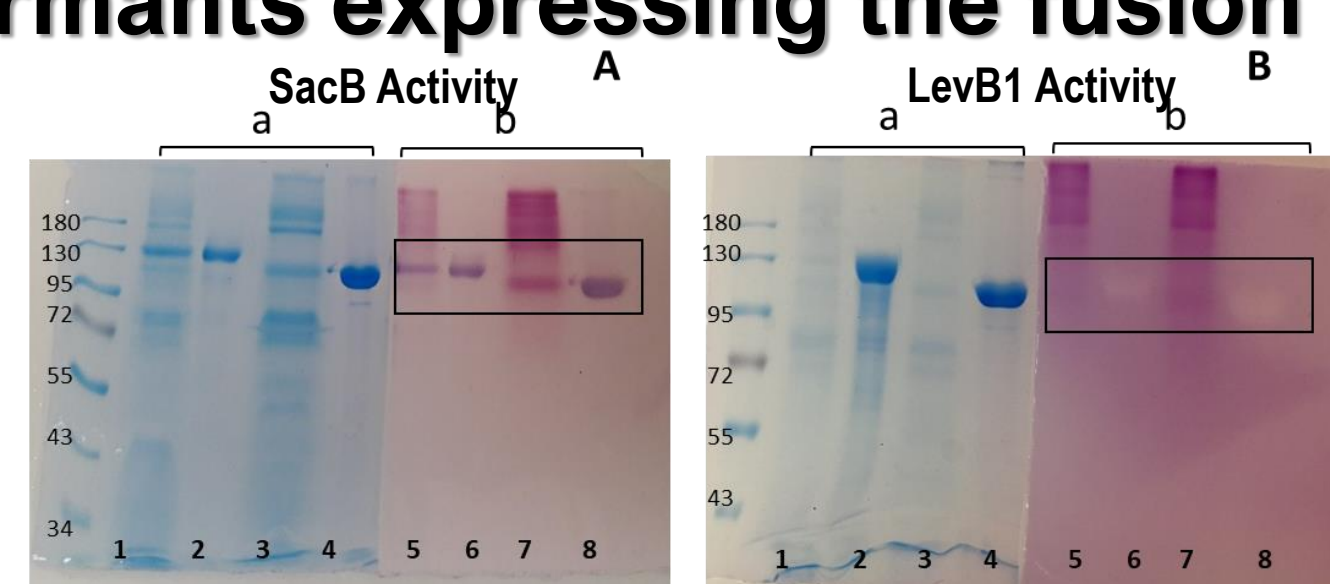
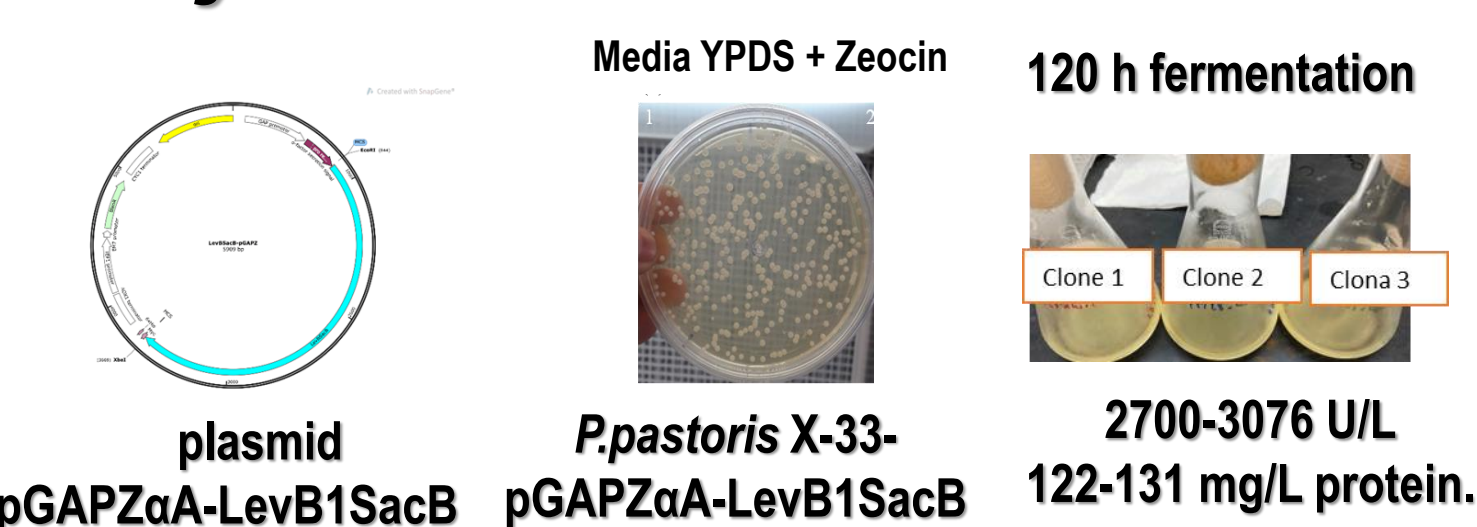


Fig. 2 (a) SDS-PAGE and (b) zymography. Lines 1 and 5, proteins in the *P. pastoris* X-33/pGAPZαA-LevB1SacB culture supernatant; lines 2 and 6, LevB1SacB purified from the culture supernatant; lines 3 and 7, control culture supernatant of *P. pastoris* with X-33/pGAPZαA without the LevB1SacB gene; lines 4 and 8, purified LevB1SacB expressed in *E. coli* culture.

Design of a simultaneous enzyme production, enzymatic reaction, and glucose elimination system.

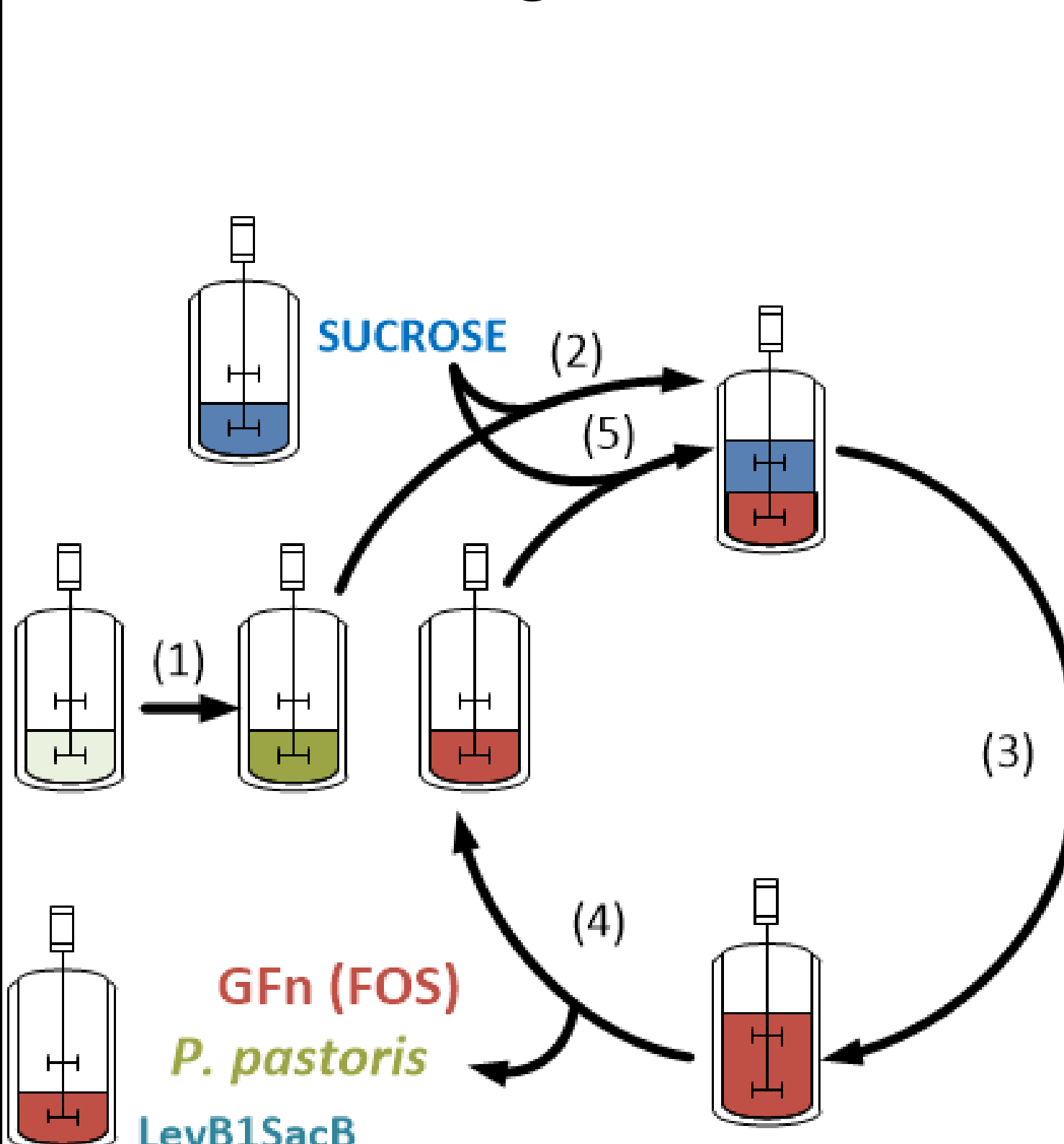


Fig. 3 Layout of the simultaneous enzyme production, enzymatic reaction, and glucose elimination fermentation system

1) **EP stage.** Culture of *P. pastoris* X-33 in glucose for the constitutive production of LevB1SacB in an initial fermentation volume of 0.5Vf.

2) **EP and ER stages.** After 72 h of culture in glucose, addition of 0.5Vf L of fresh culture medium containing 200 g/L of sucrose, to reach a volume of Vf L containing 100 g/L of sucrose. *P. pastoris* will continue to grow, at this stage at the expense of the by-products of L-FOS synthesis by LevB1SacB from sucrose. Associated to *P. pastoris* growth, the constitutive production of the fusion enzyme will continue.

3) **Productive FB stages.** As sucrose is depleted, the stepwise withdrawal of 0.5Vf L from the culture medium proceeds with the concomitant addition of the same volume (0.5Vf L) of fresh culture medium containing 200 g/L of sucrose. The number of production stages can be as large as the process allows. Theoretically, at the end of each productive stage, the 0.5Vf L withdrawn containing biomass, LevB1SacB, and the synthesized product (L-FOS) without glucose, fructose or residual sucrose are collected as product.

Process evaluation

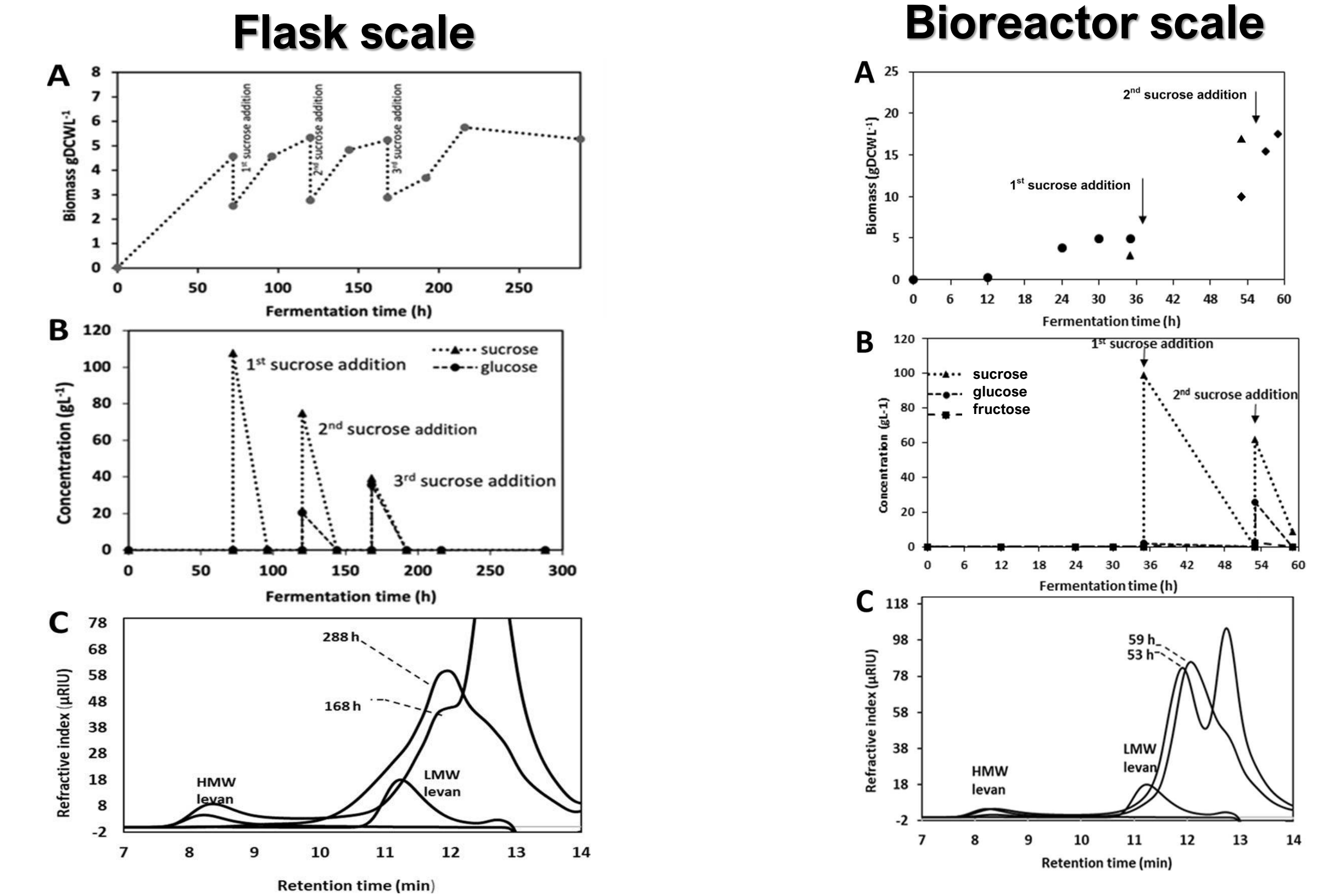


Fig. 4a. (A) Growth kinetics of recombinant *P. pastoris* X-33/pGAPZαA-LevB1SacB system at flask-level on BMY medium with three sucrose additions at 72, 120 and 168 h. Reaction conditions: 28 °C, 200 rpm, final volume of 0.1 L and total sucrose concentration of 300 g/L supplied in three stages. (B) Sucrose and monosaccharides consumption along the culture. (C) GPC levan molecular weight distribution of the final products compared to the 3rd sucrose addition.

Bioreactor scale

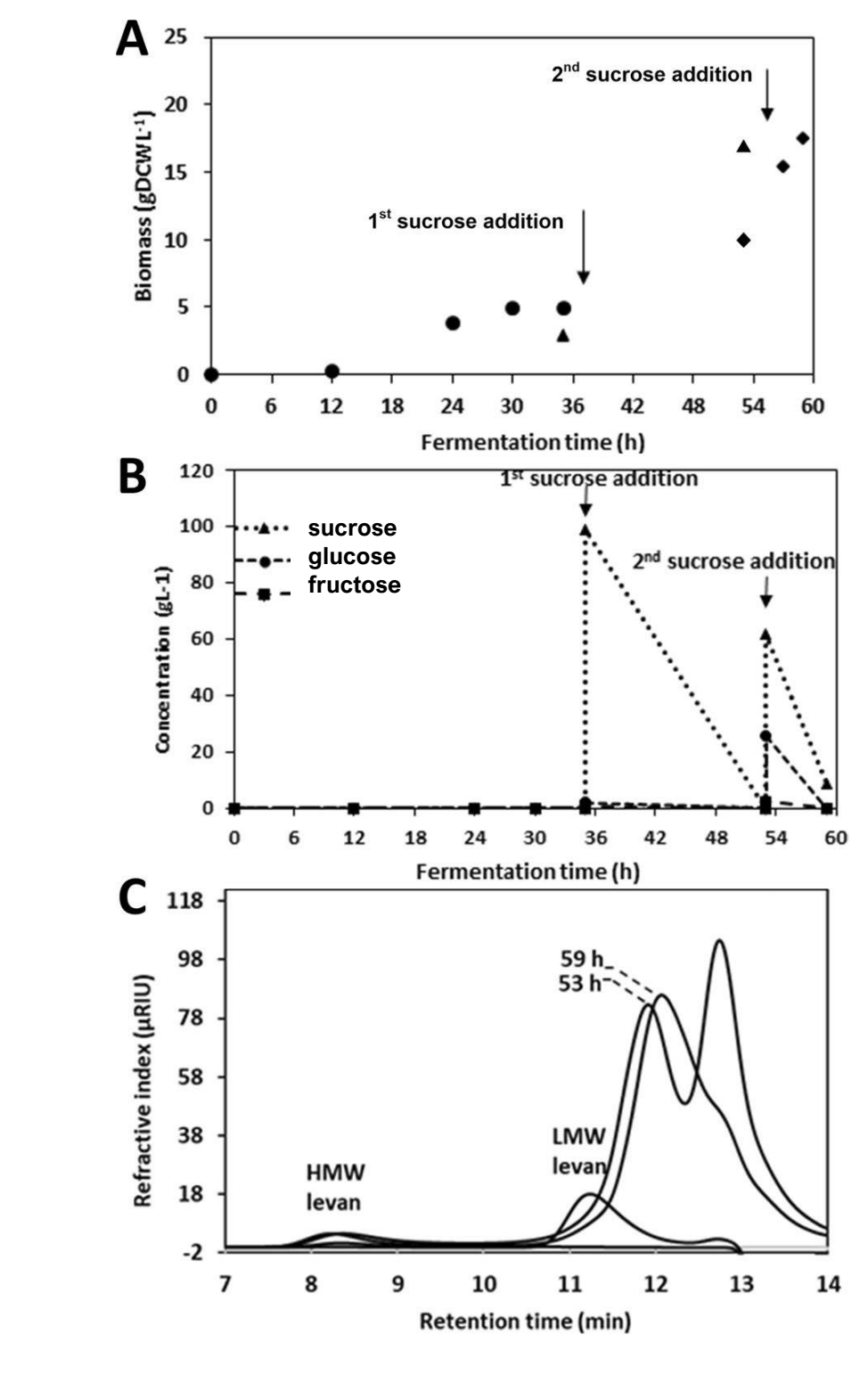


Fig 4b.(A) Growth kinetics of recombinant *P. pastoris* X-33/pGAPZαA-LevB1SacB system. Bioreactor scale on BMY medium with two sucrose additions at 35 and 53 h. Reaction conditions: 28 °C, 200–1200 rpm, final volumen of 0.8 L and total sucrose concentration of 200 g/L supplied in two stages. (B) Sucrose and monosaccharides consumption along the culture. (C) GPC levan molecular weight distribution of the final products compared to the 2nd sucrose addition.

L-FOS HPAEC-PAD Profile.

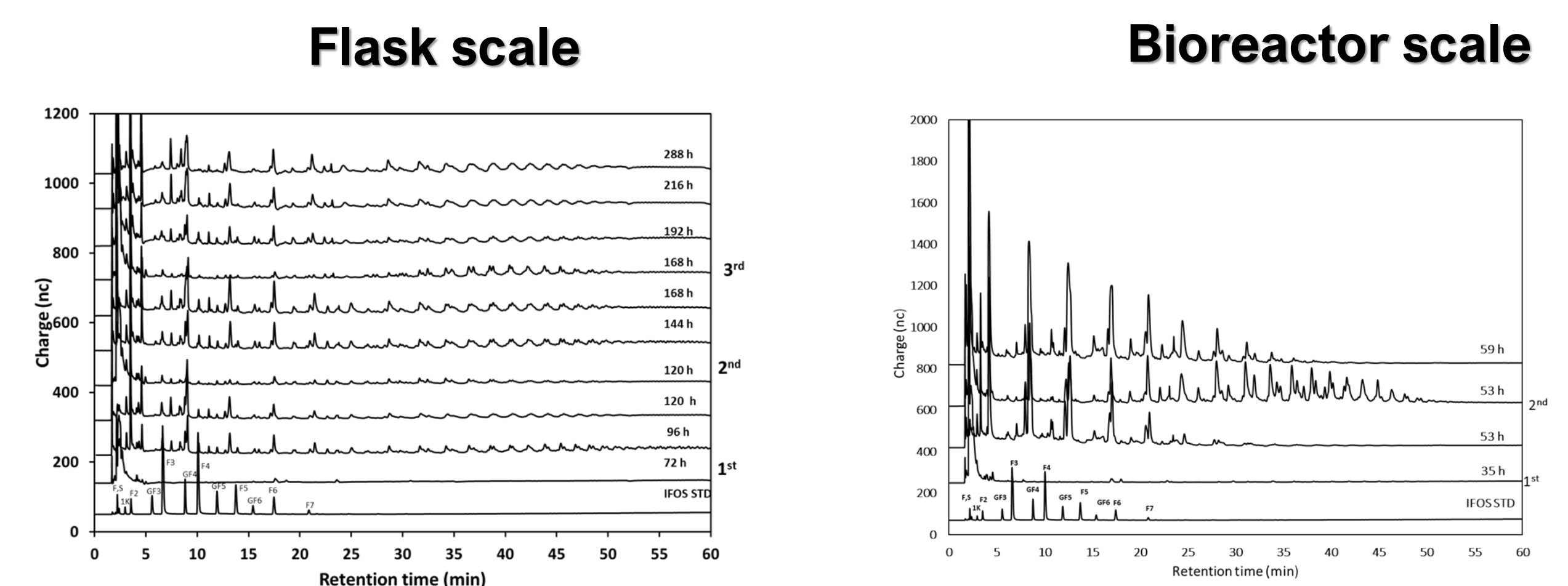


Fig. 4a HPAEC-PAD. Profile of L-FOS produced by the system at flask-level. The process was developed for three sucrose additions (100 g/L) 1st at 72, 2nd at 129, and 3rd at 168 h, 28 °C and 200 rpm in a volume of reaction of 0.1

Fig. 4b HPAEC-PAD. Profile of L-FOS produced by the system at bioreactor scale. The process was run with two sucrose additions (100 g/L) 1st at 35 and the 2nd at 53 h, 28 °C and 200–1200 rpm in a final volume of reaction of 0.8 L

F:fructose, S:sucrose, 1K: 1-kestose, F2:inulobiose, GF3:nistose, F3:inulotriose, GF4:fructosyl-nistose, F4:inulotetraose, GF5:kestohexaose, F:inulopentaose, GF6:kestheptaose, F6:inulohexaose y F7: inuloheptaose

Table 1 Comparison of the reaction medium composition at the end of the Fed batch flask and the bioreactor *P. pastoris* cultures expressing LevB,SacB under the GAP promoter, and the reaction using LevB,SacB produced by *E. coli*

	Time (h)	L-FOS/ Sucrose (g/ g)	Glucose (g)	Fructose (g)	Residual sucrose (g)	Maximum L-FOS DP	Total <i>P. pastoris</i> biomass (g)
X-33/pGAPZαA-LevB,SacB (Flask-level)	288	0.28	0	0	0	20	1.05
X-33/pGAPZαA-LevB,SacB (Bioreactor scale)	59	0.45	0	0	6.83	10	21.85
Rosetta 2/PET-22 (+) LevB,SacB *	6	0.41	54 g/L	234 g/L	65 g/L	10	—

Data taken from Porras-Dominguez, 2017

METHODS

P. pastoris X-33/pGAPZαA-LevB1SacB growth was carried out in culture medium BMGY (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, YNB 13.4 g/L, biotin 4*10⁻⁴ g/L, 1% glycerol, and pH 6.0, 0.1 M phosphate buffer). The culture was incubated at 28 °C and 200 rpm. The reaction products were analyzed by HPLC in three chromatographic systems; (A) Oligofructosides by anion exchange chromatography with a detector electrochemical / amperometric (HPAEC-PAD) using a CarboPac-200 column (2x250mm) (B) Polymer (Fructans) by gel permeation chromatography coupled to an index detector refraction using system of gel permeation column Ultrahydrogel Linear (7.8x300mm) (C) Fructose, Glucose and Sucrose by ion exchange chromatography with a refractive index detector using a column for carbohydrate analysis Prevail Carbohydrate. SacB, LevB1 and LevB1SacB activities and enzymes purification were made as previously reported¹.

CONCLUSIONS

- We have demonstrated the technical feasibility of a simultaneous system performing a fermentation and an enzymatic reaction, where the growth of a recombinant *P. pastoris* strain results in the synthesis of an enzyme whose activity provides sugars as by-products used as a carbon source in the fermentation.
- This system allows the production of glucose and fructose free L-FOS with a DP between 2 and 10, with levanobiose (F2) as the most abundant product.
- The elimination of glucose and fructose in this novel one reactor fermentation/reaction system for the synthesis of L-FOS is an innovative approach for the synthesis of these and other oligosaccharides required in a purified form for application as prebiotics.
- The system may be optimized in order to increase its efficiency and define process conditions according to a particular L-FOS profile.

BIBLIOGRAPHY

1. Porras-Dominguez, J.R. Rodríguez-Alegría, M.E. Ávila-Fernández, A. Montiel-Salgado S, López-Munguía A. 2017. Levan-type fructooligosaccharides synthesis by a levansucrase-endolevanase fusion enzyme (LevB1SacB). *Carbohydrate Polymers*, 177, 40-48.

4th International Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability 2023. May 14-17, 2023 LAKE GARDE ITALY.