

LEVANASACARASA MODIFICADA PARA LA PRODUCCION OPTIMIZADA DE FRUCTOOLIGOSACARIDOS

Campo de la técnica

La presente invención se relaciona con el campo de la ingeniería de enzimas y la biotecnología industrial, en particular con la modificación de la secuencia de aminoácidos de la levanasacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (LsdA) para obtener variantes modificadas con alta actividad específica y mayor rendimiento de fructooligosacáridos (FOS), en base a la pérdida de la capacidad de formación del polisacárido levana. La invención tiene su principal aplicación en el establecimiento y el mejoramiento de procesos enzimáticos destinados a la producción de distintos tipos de FOS de cadenas cortas, fibras prebióticas solubles de amplia demanda comercial.

Estado de la técnica anterior

Los FOS son fibras prebióticas naturales de alta demanda en el mercado de los alimentos funcionales. El consumo de FOS favorece el aumento de la población de microorganismos probióticos (ej. bifidobacterias y lactobacilos) en el colon, lo que trae asociado beneficios a la salud de humanos y animales (Singh y col., Appl. Biochem. Biotechnol. 184: 613-635, 2017). Los FOS son fructanos de cadenas cortas, que contienen entre 2 y 10 unidades de fructosas donde pueden predominar enlaces β -(2 $\rightarrow$ 1) (FOS del tipo inulina) o β -(2 $\rightarrow$ 6) (FOS del tipo levana). En la actualidad solo se comercializan los FOS del tipo inulina. De ellos, 1-kestotriosa [α glu(1,2) β fru(1,2) β fru] es el de mayor valor comercial, porque ejerce una eficiente acción prebiótica en el colon proximal y su poder endulzante es superior al de los FOS que contienen 3 o más unidades de fructosa (Tochio y col., Foods 7: 140, 2018). Los FOS del tipo levana tienen una alta acción prebiótica demostrada en humanos y animales, pero no están aún disponibles en el mercado, por lo que adquiere un especial interés el establecimiento de un proceso de producción a escala industrial, que haga económicamente factible su comercialización (Porrás-Domínguez y col., Carbohydrate Polymers 177: 40-48, 2017). En la actualidad, la producción comercial de FOS a partir de la sacarosa se realiza con el empleo de β -fructofuranosidasas (EC 3.2.1.26) o β -fructosiltransferasas (EC 2.4.1.100) de origen fúngico. La incubación de cualquiera de estas enzimas a altas concentraciones (600-800 g/L) de sacarosa (GF) produce 1-kestotriosa (GF₂), 1,1-kestotetraosa (GF₃) y

1,1,1-kestopentaosa (GF₄), cuya suma alcanza a representar el 55-60% (peso/peso) de los carbohidratos totales en la mezcla de reacción (Flores-Maltos y col., Critical Rev. Biotechnol. 36: 259-267, 2016). En los productos comerciales Meiologo® y Actilight®, la proporción de GF₂:GF₃:GF₄ es aproximadamente 37:53:10. Otra enzima particularmente

5 atractiva para la conversión de la sacarosa en 1-kestotriosa es la sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST, EC 2.4.1.99) de la planta *Schedonorus arundinaceus* producida en la levadura *Pichia pastoris* (Hernández y col., J. Biotechnol. 266: 59-71, 2018). La enzima recombinante, denominada Sa1-SSTrec, es estable y convierte la sacarosa en una mezcla de GF₂ y GF₃ en proporción 9:1, con un rendimiento total de

10 FOS (55-60%, p/p). La enzima recombinante Sa1-SSTrec aún no se encuentra disponible en el mercado.

Las fructosiltransferasas de hongos y plantas presentan, como inconveniente común, actividad exofructanasa intrínseca e hidrolizan sus propios productos FOS, a medida que se agota el sustrato sacarosa (Hernández y col., J. Biotechnol. 266: 59-71, 2018). En los

15 procesos que emplean estas enzimas con fines comerciales, se hace necesario detener la reacción cuando el rendimiento de FOS alcanza 50-60% (p/p) y la sacarosa oscila aún entre 15 y 25% (p/p) de la composición total de azúcares. La sacarosa remanente y los monosacáridos (glucosa y fructosa) presentes en la mezcla de reacción (sirope FOS-55%) son contaminantes energéticos, que deben eliminarse en los productos

20 hipocalóricos destinados a diabéticos.

En la actualidad, la purificación industrial de FOS hasta un grado de pureza del 95% (p/p) se realiza mediante técnicas de cromatografía, basadas en el principio de exclusión molecular, donde la remoción del disacárido sacarosa constituye el principal factor de pérdida en el recobrado del trisacárido 1-kestotriosa. No existe informe de un

25 procedimiento enzimático que permita la conversión total de la sacarosa remanente en las mezclas de reacción de fructosiltransferasas eucariontes, sin que ello conlleve a la hidrólisis de los productos FOS.

La levanasacarasa (EC 2.4.1.10) y la inulosacarasa (EC 2.4.1.9), secretadas por ciertas bacterias, pudieran emplearse en la producción de diferentes tipos de FOS a partir de la

30 sacarosa (Díez-Municio y col., Appl. Microbio. I Biotechnol. 100: 6251-6263, 2016; Kirtel y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 102: 9207-9220, 2018). El tipo de enlace, el grado de

polimerización y el rendimiento de FOS varían en dependencia del origen de la enzima y de las condiciones de reacción (Öner y col., *Biotechnol. Advances* 34: 827-844, 2016). De forma general, las fructosiltransferasas bacterianas transforman en FOS de cadenas cortas menos de la mitad del contenido inicial de sacarosa (50-70%, p/v) presente en la reacción. El resto del sustrato se consume vía hidrólisis directa (actividad invertasa) y, en gran medida, por la polimerización procesiva de los productos FOS (actividad polimerasa). La formación de los polisacáridos levana o inulina de alto peso molecular, además de disminuir el rendimiento final de FOS de cadena cortas, provoca un aumento notable de la viscosidad de la mezcla de reacción, lo que complejiza el proceso de operación del biocatalizador y la separación de los productos por cromatografía. Por tal motivo, las levanasacarasas e inulosacarasas bacterianas se consideran candidatos poco atractivos para la producción industrial de FOS (Öner y col., *Biotechnol. Advances* 34: 827-844, 2016).

La levanasacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (denominada LsdA; GenBank: L41732.5), ya sea obtenida del sobrenadante de cultivo de la bacteria nativa (Hernández y col., *Biochemical J.* 309: 113-118, 1995), o producida de forma recombinante en la levadura *P. pastoris* (Trujillo y col., *Enzyme Microbial Technol.* 28: 139-144, 2001), se distingue particularmente por acumular los productos 1-kestotriosa y 1,1-kestotetraosa [α glu(1,2) β fru(1,2) β fru(1,2) β fru] durante el curso de transformación de la sacarosa. LsdA también sintetiza 6-kestotriosa [α glu(1,2) β fru(6,2) β fru], trisacárido que actúa como precursor directo de la formación del polisacárido levana. Este homopolímero alcanza 10^4 unidades de fructosa y está estructurado en cadenas principales enlazadas β -(2 $\rightarrow$ 6), con puntos de ramificaciones β -(2 $\rightarrow$ 1). La formación del polisacárido levana ocurre por un mecanismo procesivo, donde la enzima queda unida al producto fructosilado, lo que favorece su continua elongación sin que medie la liberación de los oligofructanos intermediarios (Raga-Carbajal y col., *Glycobiology* 26: 377-385, 2016). En ausencia del sustrato sacarosa, LsdA muestra actividad exolevanasa, pero no hidroliza fructanos del tipo inulina (Hernández y col., *Biochemical J.* 309: 113-118, 1995).

En la actualidad, no se dispone de una fructosiltransferasa modificada de cualquier origen que se pueda emplear, ya sea como enzima única o enzima complementaria, en un proceso de producción comercial de FOS con conversión total del sustrato sacarosa.

La elongación sucesiva de los productos FOS para formar el polisacárido levana es el principal impedimento catalítico que presenta la enzima LsdA para su empleo industrial en la producción directa de FOS, o en la conversión de la sacarosa remanente en las mezclas de reacción de fructosiltransferasas eucariontes.

5

Explicación de la invención

La presente invención resuelve los problemas antes planteados, al proveer una levanasacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (LsdA) modificada que se caracteriza porque comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo de secuencias compuesto por SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 34. Esta variante modificada de LsdA sintetiza FOS de cadenas cortas, que muestran variación en el tipo de enlace fructosilo, y no forma el polisacárido levana. Además, no hidroliza 1-kestotriosa ni 1,1-kestotetraosa, productos que tienden a acumularse durante el curso de transformación de la sacarosa.

10

15

20

25

30

El empleo de un método químico de mutagénesis al azar, como herramienta inicial de trabajo, unido al cribado masivo por fenotipo de las librerías de clones recombinantes de *Escherichia coli*, permitió identificar varios aminoácidos del sitio activo de la LsdA involucrados en la reacción de polimerización (síntesis del polímero levana). Varios de estos aminoácidos presentan equivalentes estructurales en otras fructosiltransferasas bacterianas, pero su función permanece aún inexplorada. De los aminoácidos identificados, se seleccionaron R141, H142, F274, N276 y R304 (numeración referida a la secuencia de la enzima madura, o sea no se consideran los primeros 30 aminoácidos que forman el péptido señal presente en la proteína precursora y que se escinden durante la secreción) como dianas para trabajos de evolución dirigida por mutagénesis de saturación. Por esta vía, se construyeron bibliotecas de variantes de LsdA que contienen todas las sustituciones posibles en estos cinco aminoácidos, que interactúan de forma directa o indirecta con el sustrato donante y/o el sustrato aceptor del residuo fructosilo. La optimización del cambio de los aminoácidos diana permitió obtener grupos de LsdA modificada de alta actividad específica, que no produce el polisacárido levana y que difieren entre sí en el rendimiento y el espectro de los productos FOS.

En la invención se identificaron 25 aminoácidos diseminados en la secuencia de LsdA que están involucrados de forma directa, o indirecta, en la formación del polisacárido levana (reacción de polimerización). Para lograr este resultado, se realizó la construcción del plásmido pALS200 que expresa un gen quimérico que codifica la proteína precursora LsdA fusionada a una cola 6xHis bajo el promotor *nptII* de expresión constitutiva. El reconocimiento y el procesamiento proteolítico del péptido señal de LsdA por el hospedero *E. coli* permite secretar la proteína madura (secuencia desprovista de los primeros 30 amino ácidos presentes en la proteína precursora) al periplasma de la célula, donde penetra la sacarosa exógena y sirve de sustrato a la enzima recombinante. La actividad de LsdA no mutada en el espacio periplasmático le confiere a la bacteria hospedera la capacidad de utilizar la sacarosa del medio (fenotipo Sac⁺) y en consecuencia la colonia adquiere una apariencia mucosa (fenotipo Lev⁺) asociada a la formación del polisacárido levana. El plásmido pALS200 se incubó con una solución acuosa de hidroxilamina bajo condiciones no drásticas de mutagénesis con el objetivo de generar una biblioteca de variantes de LsdA con sustitución de un solo aminoácido en posiciones aleatorias de la secuencia de la proteína. La secuenciación del plásmido recuperado de cada colonia transformante de *E. coli* con actividad sacarolítica, y poca o nula mucosidad (fenotipo Lev⁻), permitió identificar cambios puntuales en 14 aminoácidos ubicados en la cavidad o vecindad del sitio activo, con posible función directa en la reacción de polimerización. También así se identificaron 11 aminoácidos en posiciones alejadas del sitio activo, cuya función aparente es mantener la estabilidad del plegamiento de la enzima. En todos los casos, la mutación al azar provocó una reducción de la actividad enzimática, medida por liberación de glucosa, en comparación con LsdA no mutada. Los aminoácidos del sitio activo R141 y H142 (subsito -1), F274 y N276 (subsito +2), y R304 (subsito +3) se seleccionaron como dianas para experimentos de evolución dirigida, mediante mutagénesis por saturación. Estos cinco aminoácidos están ubicados en regiones de la proteína que interactúan con la fructosa del sustrato donante (subsito -1) o con el segundo (subsito +2) o tercer (subsito +3) monosacárido de la molécula aceptora del residuo fructosilo.

En la invención, los experimentos de mutagénesis dirigida permitieron establecer cual sustitución de aminoácido en las posiciones 141, 142, 274, 276 y 304 resulta óptima, en

aras de obtener variantes modificadas de LsdA no productoras del polisacárido levana y de actividad específica similar o superior a la enzima no mutada. Las variantes modificadas más activas dentro de cada una de las cinco librerías de mutantes se purificaron, a partir del extracto celular de *E. coli*, y se estudiaron sus propiedades catalíticas. El análisis del perfil de productos después de la incubación con sacarosa reveló un comportamiento diferencial entre las variantes modificadas de LsdA, en cuanto al rendimiento y la composición de FOS. La relación de la actividad de fructosilación *versus* actividad de hidrólisis y la relación de los productos 1-kestotriosa *versus* 6-kestotriosa variaron en dependencia de la posición y la naturaleza del aminoácido sustituto.

La mutación por saturación de H142 reveló que la preservación o la pérdida de la capacidad de polimerizar FOS a levana varían según el tipo de aminoácido incorporado en esta posición. Las variantes modificadas H142A, H142G y H142N formaron levana de alto peso molecular, igual que la enzima no mutada. Las variantes modificadas H142E y H142P transformaron el sustrato sacarosa vía hidrólisis con actividad específica superior a LsdA no mutada. La variante modificada H142S, también altamente activa, no mostró afectación notable en el rendimiento de FOS, pero no abolió totalmente la síntesis del polisacárido levana. La invención revela también las variantes modificadas dobles del subsitio -1 en las que se sustituye a saturación el aminoácido R141 y se mantiene fija la mutación H142S. Por esta vía, se obtuvieron las enzimas modificadas R141K-H142S, R141Y-H142S y R141F-H142S de alta actividad específica, afectadas en la capacidad de formar enlaces β -(2 $\rightarrow$ 6), pero que sí sintetizan 1-kestotriosa aunque en proporción inferior a la reacción de hidrólisis de la sacarosa.

Los aminoácidos F274 y N276 (subsitio +2) y R304 (subsitio +3) se ubican en lazo expuestos hacia la superficie de la cavidad del sitio activo, e interactúan exclusivamente con el sustrato aceptor del residuo fructosilo. El cambio de F274 por otro aminoácido aromático (Y o W) mantiene intacta la actividad polimerasa de LsdA. Las enzimas modificadas F274A y F274N sintetizaron FOS de cadenas cortas, y no los polimerizaron a levana. El análisis bioquímico de la librería de mutantes por saturación del aminoácido N276 reveló que la sustitución puntual de Asn (N) en la posición 276, por un aminoácido de carga positiva como His (H), Lys (K) o Arg (R) proporcionaron variantes modificadas

que no forman el polisacárido levana y difieren en el espectro de los productos FOS. La sustitución N276R destaca por sintetizar 6-kestotriosa como FOS mayoritario, a diferencia de la LsdA no mutada, que fructosila la sacarosa vía enlace β -(2→1), principalmente. Por otra parte, el cambio Arg (R) en la posición 304 por Lys (K) resultó en una variante de alta actividad específica. Esta enzima modificada sintetiza 1-kestotriosa y 1,1-kestotetraosa como FOS mayoritarios, además de una escalera en concentración decreciente de FOS lineales (GF₂₋₁₅) enlazados β -(2→6), cuya cadena se extiende por vía no procesiva. Las variantes de LsdA con las sustituciones dobles N276H-R304K, N276K-R304K y N276R-R304K presentan alta actividad específica, sintetizan 1-kestotriosa y 6-kestotriosa en diferentes proporciones, y no forman el polisacárido levana.

En una materialización de la invención, la enzima LsdA modificada que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo de secuencias compuesto por SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 34 se produce en un microorganismo hospedero genéticamente modificado. En una realización particular, el microorganismo hospedero genéticamente modificado es la levadura *P. pastoris* o la bacteria *E. coli*.

Por tanto, es objeto de la invención un microorganismo genéticamente modificado que se caracteriza porque produce una variante modificada que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo de secuencias compuesto por SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 34. En una materialización de la invención, esta provee clones recombinantes de la levadura no sacarolítica *P. pastoris* que secretan altos niveles de nueve variantes modificadas de LsdA (subsitos -1, +2 y +3) no productoras del polisacárido levana, seleccionadas en base a los criterios de mayor actividad específica y diferencias en el espectro de productos FOS. La levadura no sacarolítica *P. pastoris*, al igual que la bacteria *E. coli*, cumple el requisito de no presentar enzimas endógenas que pudieran reaccionar con el sustrato sacarosa o los productos FOS. La ocurrencia de *N*-glicosilación en la enzima recombinante no provoca variación en sus propiedades catalíticas, y sí incrementa su estabilidad térmica. El sistema de expresión constitutiva empleado no requiere la adición de inductor al medio de crecimiento, por lo que es adecuado para la producción de enzimas con aplicación en el procesamiento de alimentos. Esto, unido a la alta pureza inicial de la proteína recombinante en el

sobrenadante de cultivo de la levadura, hace posible obtener una preparación enzimática que cumple con los requerimientos técnicos y regulatorios para su aplicación comercial.

La invención, por tanto, también provee un preparado enzimático que se caracteriza porque comprende la enzima LsdA modificada que comprende una secuencia de

5 aminoácidos que se selecciona del grupo de secuencias compuesto por SEQ ID NO: 26-SEQ ID NO: 34. La elevada pureza inicial de cada proteína modificada, en el sobrenadante de cultivo de la levadura recombinante, permitió la obtención de crudos o preparados enzimáticos estables de alta actividad específica. El proceso de preparación del crudo o preparado enzimático es factible de escalar a nivel industrial, incluye pasos
10 de centrifugación, filtración, concentración, diálisis y liofilización, bien conocidos por los versados en este campo de la técnica. En una realización de la invención, el preparado enzimático se caracteriza por ser un líquido o un liofilizado.

En otro aspecto, la invención revela un proceso enzimático para la conversión de sacarosa en FOS que comprende el uso de la enzima LsdA modificada que comprende
15 una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias compuesto por SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 34 o del microorganismo genéticamente modificado que la produce.

La invención también revela un proceso bi-enzimático para la conversión de sacarosa en FOS donde en un primer paso del proceso se emplea una enzima con actividad
20 fructosiltransferasa y en un segundo paso se emplea la levanasacarasa modificada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias compuesto por SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 34, la levanasacarasa no mutada, o el microorganismo genéticamente modificado que produce la levanasacarasa modificada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias
25 compuesto por SEQ ID NO: 26 - SEQ ID NO: 34. En una realización particular, la enzima empleada en el primer paso es del tipo sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST). El establecimiento de un proceso bi-enzimático de reacción en cascada, en dos pasos, es un aspecto novedoso de la presente invención. Esta da solución a la principal limitación de los procesos actuales de obtención de siropes FOS, al permitir la conversión
30 total del sustrato sacarosa, producir una mezcla de FOS de cadenas cortas con diferentes tipos de enlaces, e incrementar el rendimiento de FOS totales. En una

realización particular de la invención, todo el proceso se realiza en un tanque agitado con control de temperatura, este es escalable y de fácil implementación industrial. A modo de ilustrar como ocurre el proceso, sin que constituya una limitación a la invención, en el primer paso de dicho proceso, la enzima recombinante Sa1-SSTrec cataliza la conversión inicial de la sacarosa a concentración de 700 g/L en FOS con enlaces β -(2 $\rightarrow$ 1). En el momento en que se inicia la hidrólisis del producto 1-kestotriosa, se procede a la inactivación irreversible de la enzima mediante el incremento progresivo de la temperatura del reactor, desde 45°C hasta 80°C. En el segundo paso del proceso, una variante modificada de LsdA cataliza la transformación de la sacarosa remanente, amplía el espectro de FOS de cadenas cortas e incrementa el contenido de FOS totales en la mezcla de reacción. A esta mejora del perfil de productos se une una importante ventaja tecnológica. Con la remoción enzimática de la sacarosa en la mezcla de reacción se elimina el principal contaminante del proceso de purificación industrial de los FOS, mediante técnicas de separación por cromatografía.

A modo de ejemplificar el proceso de la invención, una selección de variantes modificadas de LsdA altamente activas, con diferentes propiedades catalíticas, se emplearon en la conversión del sustrato sacarosa remanente al momento de detener la reacción de Sa1-SSTrec. Esta enzima sintetiza 1-kestotriosa y 1,1-kestotetraosa como únicos productos fructosilados. La magnitud del incremento en el rendimiento de FOS depende de la relación de la actividades fructosilación *versus* hidrólisis de la variante de LsdA seleccionada para la segunda reacción. La conversión de la sacarosa remanente por las variantes modificadas H142E y R141K-H142S (subsitio -1) ocurre principalmente vía hidrólisis, sin alterar el contenido y la composición de FOS tipo inulina obtenido en la primera reacción. El empleo, en la segunda reacción, de una variante modificada con sustitución en las posiciones F274, N276 (subsitio +2) y/o R304 (subsitio +3) incrementa el rendimiento final de FOS, mientras que la relación 1-kestotriosa y 1,1-kestotetraosa *versus* FOS con enlaces β -(2 $\rightarrow$ 6) varía en dependencia de la naturaleza del aminoácido sustituto.

La invención también revela el uso de la levanasacarasa modificada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias compuesto por SEQ

ID NO: 26 - SEQ ID NO: 34 o del microorganismo genéticamente modificado que la produce en un proceso enzimático para la conversión de sacarosa en FOS.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de muestras de siropes obtenidos en proceso bi-enzimático de reacciones en dos pasos para la producción de FOS. Los cromatogramas de los paneles A y C muestran el perfil de productos del sirope intermedio obtenido después de la incubación de la enzima Sa1-SSTrec con una solución de sacarosa (700 g/L; pH 5,5 y temperatura 45°C (paso 1). El cromatograma del panel B muestra el perfil de productos del sirope final obtenido después de la adición de un preparado soluble de LsdA modificada con las mutaciones R141K-H142S (paso 2). El cromatograma del panel D muestra el perfil de productos del sirope final obtenido después de la adición de células inmovilizadas de *P. pastoris* que expresan en periplasma la enzima LsdA modificada con las mutaciones R141K-H142S (paso 2). Leyenda: glucosa (G), fructosa (F), sacarosa (GF), kestotriosa (GF₂), kestotetraosa (GF₃) y kestopentaosa (GF₄).

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos de realización

Ejemplo 1. Mutagénesis al azar del gen de la levanasacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (*lsdA*) e identificación de aminoácidos involucrados en la formación del polisacárido levana.

La levanasacarasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (denominada LsdA) contiene un péptido señal de 30 aminoácidos, que se escinde durante el tránsito al periplasma (Hernández y col., Current Microbiology 39, 146-152, 1999). El transporte de la enzima madura (secuencia desprovista de los primeros 30 aminoácidos) al medio exterior está mediado por un mecanismo de secreción tipo II y no involucra procesamiento proteolítico (Arrieta y col., J. Bacteriol. 186: 5031-5039, 2014).

El plásmido pALS200 (25 µg), que contiene el gen *lsdA* codificante de la proteína precursora (aminoácidos 1-584) bajo el promotor constitutivo *nptII*, se incubó con una solución de 0,5 M hidroxilamina-HCl y 5 mM EDTA en 0,5 M tampón fosfato de sodio (pH 6), durante 30 min a 70°C. El plásmido mutagenizado se introdujo por electroporación en la cepa DH5α de *E. coli*. La selección de los transformantes se realizó

en placas Petri con medio sólido LB (pH 7) suplementado con 0,25% (v/v) glicerol, 5% (p/v) sacarosa y el antibiótico ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Después de 4-5 días de incubación a 30°C , se evaluó el fenotipo de los transformantes.

- De un total aproximado de 60 000 colonias resistentes al antibiótico de selección,
- 5 340 mostraron pérdida o disminución de la apariencia mucosa, asociada a la formación del polisacárido levana por la acción de la LsdA madura secretada al periplasma. Las colonias con afectación del fenotipo mucoso se sembraron de forma independiente en placas de 24 pocillos con medio sólido Luria Broth (LB) suplementado con 0,25% (v/v) glicerol, 5% (p/v) sacarosa y 0,025% (p/v) bromotimol azul (pH 7), y se incubaron por 4
- 10 días a 30°C . Un total de 47 colonias que contenían plásmido mutagenizado y el control positivo (*E. coli* con plásmido pALS200 no tratado con hidroxilamina) mostraron actividad sacarolítica (fenotipo Sac^+), evidenciada por la acidificación del medio de cultivo. En estos casos el color del medio cambió del verde inicial a amarillo. El resto de las colonias recombinantes no mucosas y el control negativo (*E. coli* con plásmido sin gen *lsdA*)
- 15 fueron incapaces de utilizar la sacarosa como fuente de carbono. Su crecimiento a expensas de extracto de levadura y triptona provocó la liberación de amonio, y la consecuente alcalinización del medio de cultivo. En estos casos el color del medio de cultivo cambió del verde inicial a azul. El intervalo de transición del indicador de pH bromotimol azul es amarillo ($\text{pH} < 6,0$), verde ($\text{pH } 6,0-7,6$) y azul ($\text{pH} > 7,6$).
- 20 En aras de diferenciar el grado de afectación en la formación del polisacárido levana de las 47 colonias que expresan variantes modificadas activas de LsdA, se estableció una escala de valores de mucosidad de la colonia entre 0 (colonia no mucosa) y 5 (colonia muy mucosa). La colonia de *E. coli* que produce LsdA no mutada presenta grado de mucosidad 5. De cada colonia con fenotipo Sac^+ y grado de mucosidad (fenotipo Lev)
- 25 entre 0 y 3 se purificó plásmido, y se secuenció la región correspondiente al gen *lsdA*. El análisis de los resultados de secuenciación de ácido desoxirribonucleico (ADN) reveló la obtención de 26 variantes modificadas independientes que poseen una sola sustitución de aminoácido en la estructura primaria de la proteína. En un caso coincidió el aminoácido sustituido pero cambió el aminoácido sustituto (R141C/H). Los
- 30 25 aminoácidos involucrados en la formación del polisacárido levana que fueron identificados vía mutagénesis al azar se mapearon en la estructura 3D de LsdA

disponible en bases de datos (PDB:1W18). La modelación estructural posicionó 14 aminoácidos (R141, H142, S198, R199, T213, F274, N276, E284, E297, R304, A339, D368, H389 y G402) en la cavidad o vecindad del sitio activo y 11 aminoácidos (S179, H255, G263, M294, G315, E324, P359, A394, R412, S413 y P417) en otras regiones de la proteína que no están directamente involucradas en el proceso catalítico.

Con el objetivo de evaluar el efecto de cada mutación sobre la actividad total de la enzima se procedió a la purificación de LsdA no mutada y de las 26 variantes modificadas producidas en *E. coli* (Tabla 1). Para ello, cada clon recombinante de *E. coli* se creció en matraz con 100 mL de medio LB suplementado con 2% (v/v) glicerol, hasta fase estacionaria, en zaranda rotatoria a 30°C. La biomasa se cosechó por centrifugación, y se resuspendió en 50 mM tampón acetato de sodio (pH 5,5). La ruptura celular se realizó por ultrasonido, con el empleo de un sonicador tipo Branson (Ultrasonics Corp. Danbury, CT, E.U), se recobró la fracción soluble. La proteína recombinante, que contiene una cola de polihistidina, se purificó a homogeneidad, mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC, según sus siglas en inglés), con el empleo de resina HisPur™ Ni-NTA (Thermo Scientific™, E.U). La actividad total de la enzima sobre el sustrato sacarosa se determinó mediante mediciones de glucosa, producto que se libera tanto en la reacción de hidrólisis como en la reacción de fructosilación. Una unidad (U) representa la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa por min, en una reacción a velocidades iniciales, con el sustrato sacarosa a concentración de 1,5 M en tampón acetato de sodio a 100 mM (pH 5,5) y a temperatura de 40°C. La cuantificación de glucosa se realizó con el kit GOPOD (Megazyme, Irlanda). La cuantificación de proteínas se realizó por el procedimiento de Bradford (Anal. Biochem. 72: 248-254, 1976), y como patrón se empleó la fracción V de la albúmina sérica bovina.

La Tabla 1 muestra las principales características de las variantes de LsdA obtenidas por mutagénesis al azar que mostraron afectación en la formación del polisacárido levana. Todas las variantes modificadas fueron menos activas que la enzima no mutada. Los aminoácidos del sitio activo cuya sustitución provocó la pérdida total o parcial de la mucosidad de la colonia (fenotipo Lev 0-2) y/o un menor detrimento de la actividad enzimática total fueron R141, H142, F274, N276 y R304. Los aminoácidos R141 y H142 se ubican en el lazo 1 (β IB- β IC), hacia el interior de la cavidad del sitio activo de LsdA,

- donde H142 interactúa de forma directa con el carbono 6 del residuo fructosilo del sustrato donante (subsitio -1) (Martínez-Fleites y col., Biochem. J. 390: 19-27, 2005). Los aminoácidos F274 y N276 se ubican en el lazo 4 (β IID- β IIIA) que avanza desde la superficie hacia el interior de la cavidad del sitio activo, donde pueden interactuar de forma directa o indirecta con el segundo monosacárido (glucosa o fructosa) de la molécula aceptora del residuo fructosilo (subsitio +2). El aminoácido R304 se ubica en el lazo 5 (IIIB-IIIC) localizado en la superficie de la cavidad del sitio activo, donde puede interactuar de forma directa o indirecta con el tercer monosacárido de la molécula aceptora del residuo fructosilo (subsitio +3).
- Los aminoácidos R141, H142, F274, N276 y R304 se seleccionaron como dianas para experimentos de evolución dirigida mediante mutagénesis por saturación.

Tabla 1. Características de variantes de LsdA obtenidas por mutagénesis al azar.

Variante de LsdA	Grado de mucosidad	Actividad Relativa (%)	Ubicación del aminoácido en la estructura 3D	Posición en la cavidad del sitio activo
no mutada	5	100	----	
R141C	1	45	lazo 1 β IB- β IC	interior (subsitio -1)
R141H	1	39	lazo 1 β IB- β IC	interior (subsitio -1)
H142Y	0	35	lazo 1 β IB- β IC	interior (subsitio -1)
S179N	2	27	lazo 2 β ID- β IIA	no*
S198L	3	23	β IIA	interior
R199H	3	19	β IIA	interior
T213I	0	9	β IIB	interior
H255Y	2	13	β IID	no*
G263D	3	28	lazo 4 β IID- β IIIA	no*
F274A	1	83	lazo 4 β IID- β IIIA	superficie (subsitio +2)
N276H	2	87	lazo 4 β IID- β IIIA	interior (subsitio +2)
E284K	3	40	β IIIA	superficie
M294I	2	9	β IIIB	no*
E297K	0	9	β IIIB	interior
R304C	2	89	lazo 5 IIIB-IIIC	superficie (subsitio +3)

G315D	2	23	lazo 5 β IIIB-IIIIC	no*
E324K	2	44	lazo 5 β IIIB-IIIIC	no*
A339V	0	8	β IIIC	superficie
P359S	3	15	β IIID	no*
D368V	2	37	lazo 6 β IIID- β IVA	interior
H389Y	0	16	lazo 7 β IVB- β IVC	interior (subsitio +1)
A394V	3	18	lazo 7 β IVB- β IVC	no*
G402S	2	8	β IVC	interior
R412H	3	43	β IVD	no*
S413R	0	8	β IVD	no*
P417L	1	13	β IVD	no*

El asterisco (*) indica que el aminoácido no se ubica en sitio activo.

Ejemplo 2. Mutagénesis por saturación del aminoácido H142 que pertenece al subsitio -1 de LsdA.

- 5 Las variantes modificadas R141C, R141H y H142Y, obtenidas por mutagénesis al azar, no producen el polisacárido levana, pero mostraron más de un 50% de reducción de la actividad total sobre la sacarosa respecto a la enzima no mutada (ver Tabla 1). El aminoácido H142 interactúa de forma directa con la posición Fru-O6' de la molécula de sacarosa donante del residuo fructosilo (subsitio -1) y es por tanto una diana interesante para estudios de mutagénesis.

Para evaluar el efecto de cada posible sustitución de aminoácido en la posición 142 sobre la reacción de síntesis del polisacárido levana, se construyó una biblioteca de variantes de LsdA mediante mutagénesis por saturación. En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mutagénica se empleó como templado el plásmido pALS200 y los cebadores directo 5' GGATCGTTTCCCATGGCGCATGTAC (SEQ ID NO: 1) y reverso 15 5' GATGCGGGCATGCACGTG(A/C/G/T)(A/C/G/T)(A/C/G/T)GTCGTCAAACC (SEQ ID NO: 2). Este último contiene la degeneración del triplete CAC (H142), y mantiene el sitio de restricción *SphI*. Las condiciones de la PCR fueron: 1) 5 min a 95°C, 2) 1 min a 95°C, 3) 1 min a 60°C, 4) 1 min a 72°C, 5) 5 min a 72°C, 30 ciclos del paso 2 al 4. El producto 20 amplificado se digirió *NcoI-SphI*, y la población de fragmentos (524 bp) se utilizó para remplazar el fragmento correspondiente en el plásmido pALS200. La mezcla de la

ligazón se introdujo en la cepa DH5 α de *E. coli*, por electroporación. Se realizaron 36 transformaciones independientes, y la selección de las colonias transformantes se realizó en placas Petri con medio sólido LB (pH 7), suplementado con 0,25% (v/v) glicerol, 5% (p/v) sacarosa y el antibiótico ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Después de 4-5 días de incubación a 30°C se evaluó el fenotipo de los transformantes.

Un total aproximado de 1 000 colonias resistentes a ampicilina, con diferentes grados de mucosidad, se sembraron de forma independiente en placas de 24 pocillos con medio sólido LB suplementado con 5% (p/v) sacarosa y 0,025% (p/v) bromotimol azul (pH 7,0), y se incubaron por 4 días a 30°C. De las colonias con fenotipo Sac⁺, se purificó plásmido y se secuenció toda la región correspondiente al gen *lsdA* mutado y ensamblado. El análisis de los resultados de secuenciación de ADN reveló la obtención de las 19 variantes modificadas posibles con sustitución del aminoácido H142. Cada variante de LsdA se purificó por IMAC, a partir del extracto celular del clon de *E. coli* correspondiente, y se cuantificó la actividad específica (U/mg) en base a la velocidad inicial de liberación de glucosa (V_G) a partir del sustrato sacarosa a concentración de 1,5 M en tampón acetato de sodio 100 mM (pH 5,5) y temperatura 40°C. La relación de las velocidades iniciales de síntesis de kestotriosa (V_K) y la liberación de fructosa al agua (V_F) permitió establecer la proporción de las actividades transferasa *versus* hidrolasa (T/H).

El perfil de productos de la reacción a tiempo final (24 h) se determinó mediante HPLC, con el empleo de una columna Aminex HPX-42 (Biorad) acoplada a un detector del tipo índice de refracción. Como solvente de corrida se utilizó agua destilada a un flujo de 0,5 mL min⁻¹, y la temperatura de operación fue 80°C. Se inyectaron 20 μL de muestra diluida diez veces. Como patrón de corrida se empleó una mezcla de glucosa (G), fructosa (F), sacarosa (GF), 1-kestotriosa (GF₂) y 1,1-kestotetraosa (GF₃), preparada a igual concentración (40 mg mL⁻¹) de cada azúcar. La composición final de carbohidratos en la mezcla de reacción fue glucosa (G), fructosa (F), sacarosa (GF), trisacárido (GF₂), tetrasacárido (GF₃), pentasacárido (GF₄), y oligofructanos de grado de polimerización entre 6 y 11 (GF₅₋₁₀).

La Tabla 2 muestra las principales características de las 19 variantes de LsdA obtenidas mediante la mutagénesis por saturación del aminoácido H142. Las colonias de *E. coli*

que expresan las variantes modificadas H142A, H142G y H142N mostraron igual grado de mucosidad (fenotipo Lev 5) que la bacteria que contiene el plásmido pALS200 no mutagenizado. Un total de 9 variantes modificadas produjeron colonias no mucosas (fenotipo Lev 0), donde sobresalen H142E y H142P, por presentar valores de actividad

5 específica ligeramente superiores a la enzima no mutada, aunque la transferencia de fructosa al agua es la reacción predominante. La sustitución H142S, aunque no inhibe totalmente la formación del polisacárido levana (fenotipo Lev 3), propicia el mayor rendimiento de FOS totales, y se mantiene la preponderancia de GF₂.

Tabla 2. Características relevantes de variantes de LsdA modificadas por sustitución del aminoácido H142.

Variante de LsdA	Grado de mucosidad (Lev 0-5)	Actividad específica (U/mg)	Relación T / H (V_K/V_F)	Perfil de productos al final de la reacción (% peso/peso)						
				G	F	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄	GF ₅₋₁₀
no mutada	5	1300	0,82	39,5	20,8	2,8	16,9	5,2	0,8	10,63
H142Y	1	455	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142L	1	72	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142K	0	325	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142R	0	262	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142A	5	1079	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142G	5	942	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142N	5	897	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142S	3	1289	0,64	39,2	22,5	1,8	20,2	6,7	4,2	4,85
H142P	0	1325	0,16	47,4	45,8	0,9	4,2	1,1	0	0
H142E	0	1390	0,14	48,2	46,4	0,5	3,9	0,9	0	0
H142M	3	301	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142C	0	134	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142D	0	988	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142Q	3	356	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142I	1	455	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142F	0	195	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142T	1	390	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

H142W	0	186	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H142V	0	99	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Leyenda: G, glucosa; F, fructosa; GF, sacarosa; GF₂, trisacárido; GF₃, tetrasacárido; GF₄, pentasacárido; GF₅₋₁₀ oligofructanos de grado de polimerización entre 6 y 11; nd, no se determinó. Los valores son medias (n=3) y la desviación estándar fue inferior a 10%.

Ejemplo 3. Mutagénesis por saturación del aminoácido R141 a la vez que se conserva fija la sustitución H142S.

Con el objetivo de obtener una variante de LsdA mutada en el sub sitio -1 que no produjera el polisacárido levana, mantuviera una alta actividad específica y lograra incrementar el rendimiento de FOS, se construyó una biblioteca de mutantes dobles donde se combina la sustitución H142S con cada uno de los posibles cambios de aminoácido en la posición 141. La mutagénesis por saturación del aminoácido R141 de LsdA se realizó mediante PCR, con el empleo del plásmido pALS200 como templado y los cebadores directo 5' GGATCGTTTCC**CCATGG**CGCATGTAC (SEQ ID NO: 1) y reverso 5'GATGCGGGGCATGCACGCT(A/C/G/T)(A/C/G/T)(A/C/G/T)GTCGTGAAACC (SEQ ID NO: 3) que mantiene el cambio del triplete CAC por AGC (H142S), presenta degeneración del triplete CGC (R141) y mantiene el sitio de restricción *SphI*. Las condiciones de la PCR se describen en el Ejemplo 2. La población de fragmentos amplificados de 593 bp se digirió *NcoI-SphI*, y se insertó en la región correspondiente del plásmido pALS200. La mezcla de la ligazón se introdujo por electroporación en la cepa DH5 α de *E. coli*. Se realizaron 36 transformaciones independientes, y la selección de las colonias transformantes se realizó en placas Petri con medio sólido LB (pH 7,0) suplementado con 0,25% (v/v) glicerol, 5% (p/v) sacarosa y el antibiótico ampicilina (100 μ g mL⁻¹). Después de 4-5 días de incubación, a 30°C, se evaluó el fenotipo de los transformantes.

Un total aproximado de 1 000 colonias resistentes a ampicilina se sembraron, de forma independiente, en placas de 24 pocillos con medio sólido LB suplementado con 5% (p/v) sacarosa y 0,025% (p/v) bromotimol azul (pH 7,0), y se incubaron por 4 días a 30°C. Todos los transformantes mostraron fenotipo Sac⁺, y el grado de mucosidad de las colonias osciló entre 0 y 3. La secuenciación de la región correspondiente al gen *lsdA* en los plásmidos recobrados de transformantes independientes reveló la obtención de las 19 variantes de sustitución del aminoácido R141 en combinación con la mutación fijada H142S. Cada variante modificada de LsdA se purificó por IMAC, a partir del extracto celular del clon de *E. coli* correspondiente. La actividad específica (U/mg), la relación de actividades transferasa *versus* hidrolasa (T/H) y la composición de los productos de la reacción se determinó según se describe en los Ejemplos 1 y 2.

La Tabla 3 muestra las principales características de las variantes de LsdA que contienen cada una de las 19 sustituciones posibles del aminoácido R141 y mantienen fija la sustitución H142S. Las colonias de *E. coli* que expresan los variantes con sustituciones dobles donde el aminoácido R141 cambió a N, G, C, Q, H, E, D, T o M mostraron similar

5 afectación de la mucosidad (fenotipo Lev 2-3) que la colonia que expresa la variante con sustitución simple H142S. El resto de las variantes dobles produjeron colonias no mucosas (fenotipo Lev 0), donde distinguen las combinaciones K141-S142, Y141-S142, F141-S142, V141-S142, L141-S142 y A141-S142 por presentar valores de actividad

10 específica similares a la enzima no mutada. Estas seis variantes modificadas no productoras del polisacárido levana fructosilan la sacarosa hasta trisacárido (GF₂) y en menor proporción tetrasacárido (GF₃), aunque la transferencia de fructosa al agua continúa siendo la reacción predominante. De ellas, la variante K141-S142 presenta un mayor valor en la relación de las actividades de transferencia *versus* hidrólisis.

Tabla 3. Características relevantes de variantes modificadas de LsdA obtenidas mediante mutagénesis por saturación del aminoácido R141 donde se mantiene fija la sustitución H142S.

Variante de LsdA	Grado de mucosidad (Lev 0-5)	Actividad específica (U/mg)	Relación T / H (V_K/V_F)	Perfil de productos al final de la reacción (% , peso/peso)						
				G	F	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄	GF ₅₋₁₀
R141-S142	3	1289	0,64	39,2	22,5	1,8	20,2	6,7	4,2	4,85
V141-S142	0	1270	0,27	45,9	42,7	2,2	7,6	0,9	0	0
K141-S142	0	1347	0,38	44,6	40,5	1,9	8,9	3,4	0	0
L141-S142	0	1240	0,21	45,8	42,4	3,3	7,1	0,6	0	0
Y141-S142	0	1265	0,32	45,1	41,1	2,9	8,2	2,7	0	0
P141-S142	0	266	0,12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N141-S142	3	701	0,66	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S141-S142	0	623	0,26	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A141-S142	0	1293	0,18	46,3	43,2	2,8	5,5	1,2	0	0
G141-S142	3	595	0,54	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F141-S142	0	1260	0,35	44,9	40,6	3,2	8,6	2,5	0	0
I141-S142	0	514	0,21	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
W141-S142	0	127	0,33	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C141-S142	3	645	0,47	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Q141-S142	3	795	0,61	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
H141-S142	3	673	0,72	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
E141-S142	3	534	0,48	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
D141-S142	2	351	0,31	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

T141-S142	3	843	0,42	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
M141-S142	2	480	0,33	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Leyenda: G, glucosa; F, fructosa; GF, sacarosa; GF₂, trisacárido; GF₃, tetrasacárido; GF₄, pentasacárido; GF₅₋₁₀ oligofructanos de grado de polimerización entre 6 y 11; nd, no se determinó. Los valores son medias (n=3) y la desviación estándar fue inferior a 10%.

Ejemplo 4. Mutagénesis dirigida del aminoácido F274 ubicado en el subsitio +2 de LsdA.

Las colonias de *E. coli* que expresan la variante modificada F274A de LsdA, obtenida por mutagénesis al azar, utilizan la sacarosa como fuente de carbono (fenotipo Sac⁺) y presentan una afectación notable de la apariencia mucosa asociada a la producción del polisacárido levana (fenotipo Lev 1) (ver Tabla 1). El aminoácido F274 ocupa una posición del sitio activo de posible interacción con el segundo monosacárido de la molécula aceptora del residuo fructosilo (subsitio +2) y es por tanto una diana interesante para estudios de mutagénesis dirigida.

La variante modificada F274A es un 17% menos activa que la enzima no mutada (ver Tabla 1). Con el objetivo de optimizar la mutación en la posición 274, se procedió a la sustitución dirigida del aminoácido original F por N, Y y W, mediante la técnica de PCR por superposición (del inglés “*overlapping PCR*”), con el empleo del plásmido pAL200 como templado, y los siguientes oligonucleótidos como cebadores, donde el triplete subrayado corresponde a la mutación diseñada.

*Bam*HI-Directo 5' CTGGGGC**GGATCC**ACGCCGACTTC (SEQ ID NO: 4)

F274N- Directo 5' GCGCAGAACGAA**AACTT**CAATTTCCGCGATCCG (SEQ ID NO: 5)

F274N-Reverso 5' CGGATCGCGGAAATTGA**AGA**ATTCGTTCTGCGC (SEQ ID NO: 6)

F274Y- Directo 5' GCGCAGAACGA**ATACTT**CAATTTCCGCGATCCG (SEQ ID NO: 7)

F274Y-Reverso 5' CGGATCGCGGAAATTGA**AGT**ATTCGTTCTGCGC (SEQ ID NO: 8)

F274W- Directo 5' GCGCAGAACGA**ATGGT**TCAATTTCCGCGATCCG (SEQ ID NO: 9)

F274W-Reverso 5' CGGATCGCGGAAATTGA**ACC**ATTCGTTCTGCGC (SEQ ID NO: 10)

*Kpn*I-Reverso 5' GGCGCCAG**GGTAC**CCCCGCGACGG (SEQ ID NO: 11)

Las condiciones de la PCR fueron: 1) 95°C 5 min, 2) 95°C 1 min, 3) 60°C 1 min, 4) 72°C 1 min, 5) 72°C 5 min, 30 ciclos del paso 2 al 4. El producto de la amplificación final que contiene cada mutación diseñada se digirió *Bam*HI-*Kpn*I, y el fragmento resultante (782 bp) se utilizó para reemplazar el fragmento correspondiente en el plásmido pALS200. Las tres nuevas construcciones se introdujeron de forma independiente en la cepa DH5α de *E. coli*. Todos los transformantes resistentes a ampicilina adquirieron la capacidad de utilizar sacarosa como fuente de carbono (fenotipo Sac⁺). El grado de mucosidad de las

colonias varió en dependencia del tipo de mutación. La ocurrencia de la sustitución F274 por N, Y y W se verificó mediante secuenciación del plásmido recuperado del transformante correspondiente. Las variantes F274N, F274Y, F274W y F274A fusionadas a la cola de polihistidina se purificaron a homogeneidad, a partir de los extractos de *E. coli*,
5 mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). La actividad específica (U/mg), la relación de actividades transferasa *versus* hidrolasa (T/H) y la composición de los productos de la reacción se determinó según se describe en los Ejemplos 1 y 2.

La Tabla 4 muestra el comportamiento catalítico de las cuatro variantes de LsdA con sustitución puntual del aminoácido F274 obtenidas. El perfil de productos de la reacción
10 con sacarosa a concentración inicial de 1,5 M se determinó mediante HPLC, según se describe en el Ejemplo 2. El cambio de F274 por otro aminoácido aromático (Y o W) no afectó la producción del polisacárido levana, ni incrementó el rendimiento de FOS totales respecto a la enzima no mutada. Las variantes F274A y F274N no producen el
15 polisacárido levana y sintetizan FOS de cadenas cortas, al reaccionar con sacarosa a concentración de 1,5 M.

Tabla 4. Características relevantes de variantes modificadas de LsdA con sustitución del aminoácido F274.

Variante LsdA	Grado de mucosidad (Lev 0-5)	Actividad específica (U/mg)	Relación T / H (V_K/V_F)	Perfil de productos al final de la reacción (% peso/peso)						
				G	F	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄	GF ₅₋₁₀
no mutada	5	1300	0,82	39,5	20,8	2,8	16,9	5,2	0,8	10,63
F274N	1	1020	0,59	40,6	31,5	3,1	17,1	5,4	1,1	0,3
F274Y	5	789	0,88	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F274W	5	556	0,77	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F274A	1	1079	0,64	39,8	29,1	3,3	19,2	6,1	1,2	0,8

Leyenda: G, glucosa; F, fructosa; GF, sacarosa; GF₂, trisacárido; GF₃, tetrasacárido; GF₄, pentasacárido; GF₅₋₁₀ oligofructanos de grado de polimerización entre 6 y 11; nd, no se determinó. Los valores son medias (n=3) y la desviación estándar fue inferior a 10%.

Ejemplo 5. Mutagénesis por saturación del aminoácido N276 ubicado en el subsitio +2 de LsdA.

Las colonias de *E. coli* que expresan la variante modificada N276H de LsdA, obtenida por mutagénesis al azar, utilizan la sacarosa como fuente de carbono (fenotipo Sac⁺) y presentan una afectación notable de la apariencia mucosa asociada a la producción del polisacárido levana (fenotipo Lev 2) (ver Tabla 1). El aminoácido N276 ocupa una posición del sitio activo de posible interacción con el segundo monosacárido de la molécula aceptora del residuo fructosilo (subsitio +2) y es por tanto una diana interesante para estudios de mutagénesis dirigida.

La variante modificada N276H es un 13% menos activa que la enzima no mutada (ver Tabla 1). Para evaluar el efecto de cada una de las posibles 19 sustituciones de aminoácido en la posición 276 sobre la reacción de síntesis del polisacárido levana se construyó una biblioteca de variantes de LsdA, mediante mutagénesis por saturación. En la PCR se empleó el plásmido pALS200 y los cebadores directo 5'CGCAGAACGAATTCTTC(A/C/G/T)(A/C/G/T)(A/C/G/T)TTCCGCG (SEQ ID NO: 12) (mantiene el sitio de restricción *EcoRI* y contiene la degeneración del triplete AAT que codifica N276) y reverso 5' GGCGCCAGGGTACCCCCGCGACGG (SEQ ID NO: 11) (mantiene el sitio de restricción *KpnI*).

Las condiciones de la PCR mutagénica fueron: 1) 95°C 5 min, 2) 95°C 1 min, 3) 60°C 1 min, 4) 72°C 1 min, 5) 72°C 5 min, 30 ciclos del paso 2 al 4. El producto amplificado se digirió *EcoRI-KpnI*, y la población de fragmentos resultantes de 616 bp se utilizó para remplazar el fragmento correspondiente en el plásmido pALS200. La mezcla de la ligazón se introdujo por electroporación en la cepa DH5α de *E. coli*. Se realizaron 20 transformaciones independientes, y la selección de las colonias transformantes se realizó en placas Petri con medio sólido LB (pH 7,0) suplementado con 0,25% (v/v) glicerol, 5% (p/v) sacarosa y el antibiótico ampicilina (100 µg mL⁻¹). Después de 4-5 días de incubación a 30°C se evaluó el fenotipo de los transformantes.

Un total aproximado de 1 000 colonias resistentes a ampicilina, con diferentes grados de mucosidad, se sembraron de forma independiente en placas de 24 pocillos con medio sólido LB suplementado con 5% (p/v) sacarosa y 0,025% (p/v) bromotimol azul (pH 7,0) y se incubaron por 4 días a 30°C. De las colonias con fenotipo Sac⁺ se purificó plásmido

y se secuenció la región correspondiente al gen *lsdA*. El análisis de los resultados de secuenciación de ADN reveló la obtención de las 19 variantes de sustitución del aminoácido N276. Cada variante de LsdA se purificó por IMAC, a partir del extracto celular del clon de *E. coli* correspondiente. La actividad específica (U/mg), la relación de actividades transferasa *versus* hidrolasa (T/H) y la composición de los productos de la reacción se determinó según se describe en los Ejemplos 1 y 2.

La Tabla 5 muestra las principales características de la biblioteca de variantes modificadas de LsdA obtenidas vía mutagénesis por saturación del aminoácido N276. El perfil de productos de la reacción con sacarosa a concentración inicial de 1,5 M se determinó mediante HPLC, según se describe en el Ejemplo 2. Los transformantes de *E. coli* mostraron grados de mucosidad contrastantes (fenotipo Lev 0-5). Las variantes que contienen la sustitución de Asn (N) por Pro (P), Asp (D), Gly (G) o Ala (A) en la posición 276 mostraron fenotipo Lev 5, por lo que se afectó la producción de levana. La variante modificada N276H fue ligeramente más activo que la enzima no mutada, y produjo colonias con menor grado de mucosidad (fenotipo Lev 2). Entre las variantes modificadas que produjeron colonias no mucosas (fenotipo Lev 0) sobresalen las variantes N276R y N276K, con actividad específica similar a la de la enzima no mutada y mayor rendimiento de FOS totales.

Tabla 5. Características relevantes de las variantes modificadas de LsdA obtenidas mediante mutagénesis por saturación del aminoácido N276.

Variante de LsdA	Grado de mucosidad (Lev 0-5)	Actividad específica (U/mg)	Relación T / H (V_K/V_F)	Perfil de productos al final de la reacción (%, peso/peso)						
				G	F	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄	GF ₅₋₁₀
no mutada	5	1300	0,82	39,5	20,8	2,8	16,9	5,2	0,8	10,63
N276R	0	1269	0,64	39,8	30,1	3,2	18,3	7,9	0,3	0
N276K	0	1260	0,63	40,4	30,9	3,2	17,7	7	0,2	0
N276Y	0	130	0,54	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276V	3	1025	0,63	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276M	2	1257	0,53	42,6	34,7	3,9	8,4	6,9	1,7	0,6
N276H	2	1397	0,72	40,1	28,2	1,6	19,4	9,3	1	0,2
N276A	5	1253	0,83	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276T	3	1019	0,61	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276C	4	1023	0,73	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276S	0	8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276G	5	771	0,77	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276E	3	1006	0,71	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276Q	4	838	0,66	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276D	5	816	0,79	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276I	1	720	0,47	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276L	0	132	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276F	0	11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

N276P	5	535	0,93	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
N276W	0	68	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Leyenda: G, glucosa; F, fructosa; GF, sacarosa; GF₂, trisacárido; GF₃, tetrasacárido; GF₄, pentasacárido; GF₅₋₁₀ oligofructanos de grado de polimerización entre 6 y 11; nd, no se determinó. Los valores son medias (n=3) y la desviación estándar fue inferior a 10%.

Ejemplo 6. Mutagénesis dirigida del aminoácido R304 ubicado en subsitio +3 de LsdA.

Las colonias de *E. coli* que expresan la variante modificada R304C de LsdA, obtenida por mutagénesis al azar, utilizan la sacarosa como fuente de carbono (fenotipo Sac⁺) y presentan una afectación notable de la apariencia mucosa asociada a la producción del polisacárido levana (fenotipo Lev 2) (ver Tabla 1). El aminoácido R304 ocupa una posición del sitio activo de posible interacción con el tercer monosacárido de la molécula aceptora del residuo fructosilo (subsitio +3) y es por tanto una diana interesante para estudios de mutagénesis dirigida.

La variante modificada R304C es 11% menos activa que la enzima no mutada (ver Tabla 1). Con el objetivo de optimizar la mutación en la posición 304, se procedió a la sustitución dirigida del aminoácido original R por H, K, S y A. Las cuatro variantes modificadas se construyeron de forma independiente, mediante la técnica de PCR por superposición (del inglés “*overlapping PCR*”), con el empleo del plásmido pALS200 como templado y los siguientes oligonucleótidos como cebadores, donde el triplete subrayado corresponde a la mutación diseñada.

*Bam*HI-Directo 5' CTGGGGC**GGATCC**ACGCCGACTTC (SEQ ID NO: 4)

R304H-Directo 5' GGCAATACCGCGGGCCAG**CA**TGGCGTCGCCAAC (SEQ ID NO: 13)

R304H-Reverso 5' GTTGGCGACGCC**AT**GCTGGCCCGCGGTATTGCC (SEQ ID NO: 14)

R304K-Directo 5' GGCAATACCGCGGGCCAG**AAG**GGCGTCGCCAAC (SEQ ID NO: 15)

R304K-Reverso 5' GTTGGCGACGCC**CTT**CTGGCCCGCGGTATTGCC (SEQ ID NO: 16)

R304S-Directo 5' GGCAATACCGCGGGCCAG**TCG**GGCGTCGCCAAC (SEQ ID NO: 17)

R304S-Reverso 5' GTTGGCGACGCC**CGA**CTGGCCCGCGGTATTGCC (SEQ ID NO: 18)

R304A-Directo 5' GGCAATACCGCGGGCCAG**GCC**GGCGTCGCCAAC (SEQ ID NO: 19)

R304A-Reverso 5' GTTGGCGACGCCGGCCTGGCCCGCGGTATTGCC (SEQ ID NO: 20)

KpnI-Reverso 5' GGCGCCAG**GGTAC**CCCCGCGACGG (SEQ ID NO: 11)

Las condiciones de la PCR fueron: 1) 95°C 5 min, 2) 95°C 1 min, 3) 60°C 1 min, 4) 72°C 1 min, 5) 72°C 5 min, 30 ciclos del paso 2 al 4. El producto de la PCR final, que contiene cada mutación diseñada, se digirió *Bam*HI-*Kpn*I y el fragmento resultante de 717 bp se utilizó para remplazar el fragmento correspondiente en el plásmido pALS200. Las cuatro nuevas construcciones se introdujeron de forma independiente en la cepa DH5α de *E. coli*. Las colonias transformantes adquirieron la capacidad de utilizar sacarosa y mostraron diferentes grados de mucosidad (fenotipo Lev 2-4). La sustitución de R304 por H, K, S y A se verificó mediante secuenciación del plásmido recobrado de colonias resistentes a ampicilina. Las variantes modificadas R304H, R304K, R304S y R304A fusionadas a la cola de polihistidina se purificaron a homogeneidad mediante IMAC, a partir de los extractos de *E. coli*. La actividad específica (U/mg), la relación de actividades transferasa *versus* hidrolasa (T/H) y la composición de los productos de la reacción se determinó según se describe en los Ejemplos 1 y 2.

La Tabla 6 muestra el comportamiento catalítico de las cinco variantes de LsdA con sustitución puntual del aminoácido R304 obtenidas. El perfil de productos de la reacción con sacarosa a concentración inicial de 1,5 M se determinó mediante HPLC, según se describe en el Ejemplo 2. La variante modificada R304K mostró similar actividad específica y rendimiento de FOS totales superior a la enzima no mutada en la reacción con sacarosa (1,5 M). La sustitución de Arg (R) por Lys (K), otro aminoácido básico, provocó la menor disminución de la relación fructosilación *versus* hidrólisis en comparación con las variantes modificadas R304C, R304H, R304S y R304A. Estas variantes modificadas sintetizan GF₂, GF₃ y una escalera de FOS lineales (GF₄₋₁₀) en concentración decreciente que no conduce a la síntesis de levana de alto peso molecular, debido a la afectación del mecanismo procesivo de la enzima.

Tabla 6. Características relevantes de las variantes modificadas de LsdA con sustitución del aminoácido R304.

Variante de LsdA	Grado de mucosidad (Lev 0-5)	Actividad específica (U/mg)	Relación T / H (V_K/V_F)	Perfil de productos al final de la reacción (%, peso/peso)						
				G	F	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄	GF ₅₋₁₀
no mutada	5	1300	0,82	39,5	20,8	2,8	16,9	5,2	0,8	10,63
R304C	2	1157	0,66	39,7	28,1	4,2	20,2	2,4	1,6	3,2
R304H	4	1280	0,74	38,2	21,3	3	22,1	7,4	3,1	4
R304K	4	1300	0,76	38,1	23,5	2,8	22,7	7,8	1,7	3,2
R304S	4	1291	0,63	39,8	25,9	2,9	19,1	5,8	2,2	3,7
R304A	4	1198	0,71	38,7	24,6	3,7	19,3	6,1	4,1	3

Leyenda: G, glucosa; F, fructosa; GF, sacarosa; GF₂, trisacárido; GF₃, tetrasacárido; GF₄, pentasacárido; GF₅₋₁₀ oligofructanos de grado de polimerización entre 6 y 11. Los valores son medias (n=3) y la desviación estándar fue inferior a 10%.

Ejemplo 7. Construcción de variantes modificadas con sustituciones en los subsitios +2 y +3.

Los aminoácidos N276 (subsitio +2) y R304 (subsitio +3) se ubican en lazo expuesto hacia la superficie del sitio activo, e interactúan exclusivamente con el sustrato aceptor del residuo fructosilo. En base a los resultados de actividad específica y rendimiento de FOS mostrados en los ejemplos 5 y 6, se decidió construir las variantes modificadas dobles N276H-R304K, N276R-R304K y N276K-R304K. La mutagénesis dirigida se realizó mediante la técnica de PCR, con el empleo del plásmido pALS200 (LsdA-R304K) como templado y los siguientes oligonucleótidos como cebadores, donde el triplete subrayado corresponde a la mutación diseñada. Los cebadores directos contienen el sitio de restricción *EcoRI* y el cebador reverso el sitio de restricción *KpnI*.

N276H-Directo 5' CGCAGAAC**GAATTCTTCC**ACTTCCGCG (SEQ ID NO: 21)

N276R-Directo 5' CGCAGAAC**GAATTCTTCC**GCTTCCGCG (SEQ ID NO: 22)

N276K-Directo 5' CGCAGAAC**GAATTCTTCA**AGTTCCGCG (SEQ ID NO: 23)

KpnI-Reverso 5' GGCGCCAG**GGTAC**CCCCGCGACGG (SEQ ID NO: 11)

Las condiciones de la PCR fueron: 1) 95°C 5 min, 2) 95°C 1 min, 3) 60°C 1 min, 4) 72°C 1 min, 5) 72°C 5 min, 30 ciclos del paso 2 al 4. El producto amplificado que contiene cada mutación diseñada se digirió *EcoRI-KpnI*, y el fragmento resultante (616 bp) se utilizó para reemplazar el fragmento correspondiente en el plásmido pALS200. Las tres construcciones se introdujeron de forma independiente en la cepa DH5α de *E. coli*. En los tres casos, los transformantes resistentes a ampicilina adquirieron la capacidad de utilizar sacarosa como fuente de carbono (fenotipo Sac⁺) y las colonias no mostraron mucosidad (fenotipo Lev⁰). La ocurrencia correcta de las mutaciones diseñadas se verificó mediante secuenciación de ADN. Las tres variantes con doble sustitución y fusionadas a cola de polihistidina se purificaron a homogeneidad mediante IMAC, a partir de los extractos de *E. coli*. El efecto combinado de sustituir N276 (subsitio +2) por un aminoácido básico (H, R o K) y R304 (subsitio +3) por otro aminoácido básico, pero de menor masa molecular (K), mantuvo invariable la actividad específica de la enzima e incrementó el rendimiento de FOS de cadena corta, productos que al no polimerizarse se acumulan en la mezcla de reacción (Tabla 7).

Tabla 7. Características relevantes de las variantes modificadas dobles de LsdA con sustituciones en N276 y R304.

Variante de LsdA	Grado de mucosidad (Lev 0-5)	Actividad específica (U/mg)	Relación T / H (V_K/V_F)	Perfil de productos al final de la reacción (%, peso/peso)						
				G	F	GF	GF ₂	GF ₃	GF ₄	GF ₅₋₁₀
no mutada	5	1300	0,82	39,5	20,8	2,8	16,9	5,2	0,8	10,63
N276H-R304K	0	1301	0,87	39,7	29,3	1,9	25,2	3,1	0,1	0
N276R-R304K	0	1298	0,92	37,8	25,7	2,7	28,7	4,8	0	0
N276K-R304K	0	1296	0,85	39,2	29,9	2,8	24,3	3,2	0	0

Leyenda: G, glucosa; F, fructosa; GF, sacarosa; GF₂, trisacárido; GF₃, tetrasacárido; GF₄, pentasacárido; GF₅₋₁₀ oligofructanos de grado de polimerización entre 6 y 11. Los valores son medias (n=3) y la desviación estándar fue inferior a 10%. La actividad específica (U/mg), la relación de actividades transferasa versus hidrolasa (T/H) y la composición de los productos de la reacción se determinó

5 según se describe en los Ejemplos 1 y 2.

Ejemplo 8. Identificación de los tipos de FOS sintetizados por una selección de variantes modificadas de LsdA que no producen el polisacárido levana.

Con el empleo de la técnica HPAEC-PAD (abreviado del término en inglés “*High-Performance Anion-Exchange Chromatography-Pulsed Amphoteric Detection*”) se determinó el tipo de enlace de los productos FOS de cadenas cortas (tri y tetrasacáridos) sintetizados a partir de sacarosa (1,5 M) por una selección de nueve variantes modificadas de LsdA que no forman el polisacárido levana y mantienen elevada actividad específica. Estas variantes modificadas se denominaron H142E (SEQ ID NO: 26), R141K-H142S (SEQ ID NO: 27), F274A (SEQ ID NO: 28), N276H (SEQ ID NO: 29), N276R (SEQ ID NO: 30), R304K (SEQ ID NO: 31), N276H-R304K (SEQ ID NO: 32), N276R-R304K (SEQ ID NO: 33) y N276K-R304K (SEQ ID NO: 34). Las muestras tomadas a diferentes tiempos de reacción se diluyeron 50 veces en agua destilada, y se corrieron en una columna PA200 Carbopack (3 x 250 mm) mantenida a 30°C. La elución de los carbohidratos se realizó con un gradiente de acetato de sodio con 100 mM NaOH, a flujo 0,5 mL min⁻¹. La detección se realizó utilizando un módulo Dionex ED40 con electrodo de trabajo de oro y pH de referencia Ag/AgCl.

El análisis por HPAEC-PAD de los productos de la reacción una vez agotada la sacarosa reveló que la enzima no mutada y las nueve variantes modificadas sintetizan mezclas de FOS de enlaces fructosilos β -(2→1) y β -(2→6) (Tabla 8). La fructosilación de la sacarosa por las variantes modificadas N276R (subsitio +2) y N276R-R304K resultó en una formación mayoritaria de 6-kestotriosa. En cambio, la enzima no mutada y el resto de las variantes modificadas produjeron 1-kestotriosa y 1,1-kestotetraosa como principales productos trisacárido y tetrasacárido, respectivamente. El comportamiento contrastante de las variantes modificadas N276R y N276H, respecto al tipo de enlace del producto fructosilado, indica que el subsitio +2 juega un rol importante en determinar la orientación de la molécula aceptora del residuo fructosilo.

Tabla 8. Tipos de FOS de cadenas cortas sintetizados por variantes seleccionadas.

Variante de LsdA (ubicación de la mutación)	Productos FOS (% peso/peso)					
	Trisacáridos			Tetrasacáridos		
	1K	6K	NK	1,1K	1,6K	6,6K
no mutada	12,7	3	1,2	4,1	0,9	0,2
H142E (subsitio -1)	3,7	0,1	0,1	0,9	0	0
R141K-H142S (subsitio -1)	7,8	0,9	0,2	2,8	0,4	0,2
F274A (subsitio +2)	15,8	1,1	2,3	5,2	0,3	0,6
N276H (subsitio +2)	15	1,2	3,2	6,5	1,2	1,6
N276R (subsitio +2)	0,9	16,5	0,9	0	0,2	7,7
R304K (subsitio +3)	20,2	0,8	1,7	4,2	1,2	2,4
N276H-R304K (subsitos +2 y +3)	22,8	1,1	2,3	3,6	0,4	0,8
N276R-R304K (subsitos +2 y +3)	5,2	14,2	1,9	1,2	0,9	8,4
N276K-R304K (subsitos +2 y +3)	11,3	9,7	3,1	3,7	2,2	3,6

Leyenda: 1K, 1-kestotriosa; 6K, 6-kestotetraosa; NK, neokestotriosa; 1,1K, 1,1-kestotetraosa; 1,6K, 1,6-kestotetraosa; 6,6K, 6,6-kestotetraosa.

5 Ejemplo 9. Producción de variantes modificadas de LsdA en *Pichia pastoris*.

Las nueve variantes modificadas de LsdA descritas en el Ejemplo 8 fueron seleccionadas para evaluar su producción vía recombinante en la levadura *P. pastoris*. En cada caso, el fragmento de ADN de 1,7 kb que codifica la región madura de la proteína LsdA (se eliminan los primeros 30 aminoácidos que constituyen el péptido señal presente en la proteína precursora) se amplificó mediante PCR, usando como templado el plásmido que porta el gen *lsdA* con los cambios de tripletes correspondientes a las sustituciones de aminoácidos en estudio (Tabla 9). Los cebadores directo 5'AGTGCGCT**ATCGAT**AGGGAATTCAGC (SEQ ID NO: 24) y reverso 5'TTACTGG**TCTAGAA**ATTGGCGAACCTG (SEQ ID NO: 25) contienen cambios de bases en su secuencia, para crear los sitios de restricción *ClaI* y *XbaI*, respectivamente. Las condiciones de la PCR se describieron en el Ejemplo 2. Cada producto amplificado (gen sin el codón de parada) se digirió *ClaI*-*XbaI* y se insertó en los sitios correspondientes del vector pGAPZ α C (Invitrogen, San Diego, CA, EUA). De esta forma, la región madura de cada variante modificada de LsdA quedó fusionada por el extremo

N al péptido señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y por el extremo C al epitope *myc* y la cola de seis histidinas. El gen híbrido se transcribe bajo el control del promotor constitutivo gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAP) de *P. pastoris*. Cada mezcla de ligazón se introdujo por electroporación en la cepa DH5 α de *E. coli* y los

5 transformantes se seleccionaron en medio Luria Broth sin cloruro de sodio y suplementado con el antibiótico zeocina (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Cada plásmido se digirió en su único sitio *AvrII* ubicado en el promotor GAP, y se introdujo por electroporación en la cepa X-33 de *P. pastoris*, según las instrucciones del manual Invitrogen (Invitrogen San Diego, CA, EUA). Los transformantes se seleccionaron en medio YPG (1% (p/v) extracto

10 de levadura, 2% (p/v) peptona, 2% (p/v) glicerol, 1,5% (p/v) agar) suplementado con zeocina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y posteriormente se evaluó el fenotipo de las colonias en medio sólido SYP (1% (p/v) extracto de levadura, 2% (p/v) peptona, 5% (p/v) sacarosa, 0,025% (p/v) bromotimol azul, pH 6,5). Las colonias resistentes a zeocina (Zeo^r) que expresan ya sea una variante de LsdA modificada o la enzima no mutada adquirieron la capacidad

15 de hidrolizar la sacarosa (fenotipo Sac^+) y produjeron ácido a partir del consumo de la glucosa liberada por la acción de la enzima recombinante, según se evidenció por el cambio del color del medio SYP de verde (pH 6,5) a amarillo (pH <5,5). Las colonias originadas de la electroporación con el vector pGAPZ α C sin inserto fueron incapaces de utilizar la sacarosa y cambiaron el color del medio a azul (pH >7,5). El clon de cada

20 variante modificada de LsdA, seleccionado entre 20 colonias (Zeo^r , Suc^+), que mostró mayor actividad sacarasa en experimentos de zaranda se escogió para evaluar su comportamiento a nivel de fermentador, en condiciones de cultivo incrementado.

En cada caso, un fermentador (Marubishi, Japón) con 5 litros de volumen efectivo se inoculó con 200 mL de un cultivo crecido en zaranda hasta fase estacionaria. Se empleó

25 el mismo medio de cultivo para el crecimiento de levadura recombinante en zaranda y fermentador, este consiste en: 5% (v/v) glicerol; 0,5% (p/v) extracto de levadura; 2,2% (p/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,82% (p/v) K_2HPO_4 ; 0,75% (p/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05% (p/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; vitaminas y minerales trazas. En la primera etapa de la fermentación, para mantener la concentración de oxígeno disuelto a valores por encima de 20%, se aumentó

30 automáticamente la agitación entre 500 y 900 rpm, y la aireación se mantuvo a 1 vvm (volumen de aire/volumen de medio/minuto). Una vez que aumentó el valor del oxígeno

disuelto, indicativo de que se agotó la fuente de carbono, se pasó a la segunda etapa de alimentación. En este momento se aumentó el flujo de aire hasta 2 vvm, y se comenzó el suministro de 1,5 L de una solución de glicerol al 50% (v/v) a un flujo controlado por las variaciones de oxígeno disuelto. El fermentador se operó bajo condiciones controladas de temperatura (28-30°C) y pH (5,0-6,0). En ninguno de los clones recombinantes que expresan variantes de LsdA se observó inhibición del crecimiento celular durante las 72 horas del cultivo, al compararlo con el crecimiento de la cepa X-33 transformada con el vector pGAPZ α C sin inserto (Tabla 9).

Cada cultivo final se separó por centrifugación en dos fracciones. El sedimento (biomasa celular) y el sobrenadante de cultivo se incubaron con sacarosa 100 mM, y se cuantificó la concentración del producto glucosa con el empleo del juego de reactivos “Glucose-Trinder” (Sigma, EUA). La Tabla 9 muestra el comportamiento de los clones recombinantes que expresan las variantes de LsdA seleccionadas. Todas las variantes de LsdA, incluida la enzima no mutada, se acumularon en el espacio periplasmático de la levadura y, en menor medida, se secretaron al medio de cultivo. La ocurrencia de *N*-glicosilación aumentó la estabilidad térmica de la enzima y no provocó variación en el perfil de productos respecto a la variante modificada equivalente expresada en *E. coli*.

Tabla 9. Crecimiento y actividad sacarolítica de clones de *Pichia pastoris* que expresan las variantes modificadas de LsdA.

Clon	Variante LsdA (ubicación de la mutación)	Biomasa húmeda (g/L)	Actividad periplasma* (U/L)	Actividad extracelular (U/L)	Actividad total (U/L)
pGAPZ α C	no	259 $\pm$ 12	0	0	0
Pp-LsdA	no mutada	254 $\pm$ 10	2214 $\pm$ 127	404 $\pm$ 17	2618
Pp-H142E	H142E (subsitio -1)	247 $\pm$ 31	2312 $\pm$ 125	363 $\pm$ 44	2675
Pp- R141K-H142S	R141K-H142S (subsitio -1)	251 $\pm$ 21	2410 $\pm$ 132	378 $\pm$ 21	2788
Pp- F274A	F274A (subsitio +2)	255 $\pm$ 14	1578 $\pm$ 161	274 $\pm$ 14	1852

Pp-N276H	N276H (subsitio +2)	263 ± 22	2243 ± 134	413 ± 26	2656
Pp-N276R	N276R (subsitio +2)	250 ± 20	1829 ± 106	333 ± 22	2162
Pp-R304K	R304K (subsitio +3)	271 ± 18	2071 ± 146	379 ± 48	2450
Pp-N276H-R304K	N276H-R304K (subsitos +2,+3)	244 ± 22	1893 ± 102	340 ± 28	2233
Pp-N276R-R304K	N276R-R304K (subsitos +2,+3)	240 ± 28	1712 ± 114	332 ± 14	2044
Pp-N276K-R304K	N276K-R304K (subsitos +2,+3)	261 ± 22	1904 ± 133	371 ± 31	2165

Los valores representan la media de tres experimentos ± la desviación estándar. *La actividad en periplasma refiere unidades de enzima sacarolítica en células intactas por litro de cultivo. El sustrato sacarosa entra por difusión al espacio periplasmático de la levadura.

5 **Ejemplo 10. Obtención de preparados enzimáticos estables de variantes de LsdA producidas en *Pichia pastoris*.**

El crecimiento de los clones recombinantes que expresan las variantes de LsdA referidas en la Tabla 9, se realizó durante 72 h en un fermentador a escala de 5 L, empleando el medio de cultivo y las condiciones de operación descritas en el Ejemplo 9. La biomasa celular se sedimentó mediante centrifugación, y el sobrenadante de cultivo se sometió a un proceso de filtración en un equipo Sartocon Slice 200 (Sartorius, Alemania), con una membrana Hydrosart (porosidad 0,2 µm), siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, el filtrado se concentró 10 veces por diafiltración con el empleo del mismo equipo Sartocon Slice 200, pero con una membrana de ultrafiltración Hydrosart (porosidad 30 kDa) contra tampón 0,1 M acetato de sodio a pH 6,0. Después de un proceso de secado por liofilización, la actividad de los preparados enzimáticos osciló en el rango de 9 000 a 12 000 U por gramo de producto. Una unidad (U) representa la cantidad de enzima que libera 1 µmol de glucosa por min, en una reacción a velocidades iniciales con el sustrato sacarosa a concentración de 1,5 M en tampón acetato de sodio a 100 mM (pH 5,5) y temperatura 40°C. La actividad de los preparados enzimáticos se

mantuvo estable durante al menos 1 año de almacenamiento en condiciones refrigeradas (4-10°C).

Ejemplo 11. Establecimiento de un proceso bi-enzimático de reacción en cascada para la síntesis de un amplio espectro de FOS con conversión total de la sacarosa.

La propiedad de LsdA de no hidrolizar FOS con enlaces fructosilos β -(2→1) se mantuvo invariable en las nueve variantes seleccionadas de LsdA modificada (H142E, R141K-H142S, F274A, N276H, N276R, R304K, N276H-R304K, N276R-R304, N276R-R304). Esta propiedad posibilita el empleo de estas variantes de LsdA modificada o la enzima no mutada en la conversión de la sacarosa remanente en un sirope con alto contenido de 1-kestotriosa, 1,1-kestotetraosa y 1,1,1-kestopentaosa, obtenido previamente por la reacción de una fructosiltransferasa de origen fúngico o vegetal.

En el presente ejemplo, un proceso bi-enzimático de dos pasos de reacción en cascada se inició con la enzima sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST, EC 2.4.1.99) de la planta *Schedonorus arundinaceus*, obtenida por vía recombinante en la levadura *P. pastoris* y denominada Sa1-SSTrec. Esta enzima se incubó con una solución de sacarosa (700 g/L) a pH 5,5; temperatura de 45°C y agitación con impelente a 100 rpm. Cuando el contenido de 1-kestotriosa alcanzó el 50% (peso/peso) de la composición total de carbohidratos, se procedió a la inactivación de la enzima mediante el incremento progresivo de la temperatura hasta 80°C en un intervalo de 30 min. En el segundo paso, un preparado estable de LsdA modificada o la enzima no mutada, producido en el Ejemplo 10, se adicionó al tanque de reacción y se incubó a 45°C hasta lograr la conversión total de la sacarosa.

El tipo de enlace de los productos FOS de cadenas cortas (GF₂ y GF₃) presentes en la mezcla de reacción al final de cada paso del proceso se determinó mediante la técnica HPAEC-PAD, como se describe en el Ejemplo 8. La Tabla 10 muestra el alto rendimiento de 1-kestotriosa logrado en la reacción de Sa1-SSTrec con sacarosa (paso 1) y confirma la incapacidad de esta enzima de formar FOS de enlaces β -(2→6). La incorporación de LsdA no mutada o una variante modificada a la mezcla de reacción, posterior a la inactivación Sa1-SSTrec, permitió consumir la sacarosa remanente y ampliar el espectro de FOS. El rendimiento y la composición final de trisacáridos (GF₂) y tetrasacáridos (GF₃)

variaron en dependencia de la variante de LsdA empleada en el segundo paso del proceso bi-enzimático.

Las dos variantes con sustitución de aminoácido en el sub sitio -1 (H142E y R141K-H142S) hidrolizaron la sacarosa en glucosa y fructosa y no alteraron la suma de 1-kestotriosa y 1,1-kestotetraosa. Las otras siete variantes de LsdA modificada disminuyeron el contenido de 1-kestotriosa a expensas de la síntesis de tetrasacáridos (GF₃), pentasacáridos (GF₄) y eventualmente hexasacáridos (GF₅), reacciones en las cuales la sacarosa actuó como donante del residuo fructosilo, y por tanto aumentó el rendimiento de FOS totales. Resulta particularmente interesante la síntesis de 1,6-kestotetraosa por las variantes N276R y N276R-R304, como resultado de la transferencia del residuo fructosilo de la sacarosa al grupo OH del carbono 6 de la fructosa terminal de la 1-kestotriosa. Sorprendentemente, en las condiciones de reacción del paso 2, la enzima LsdA no mutada no formó el polisacárido levana.

Tabla 10. Composición de los siropes intermedio y final obtenidos en un proceso bi-enzimático de reacción en cascada.

Enzima	FOS cortos* (% p/p)	Composición de mono-, di-, tri- y tetrasacáridos (% peso/peso)								
		G	F	S	1K	6K	NK	1,1K	1,6K	6,6K
Paso 1: reacción de Sa1-SSTrec con sacarosa 700 g/L										
Sa1-SSTrec	55,7	19,2	0,3	23,8	52,9	0	0	2,8	0	0
Paso 2: reacción de una variante de LsdA con la mezcla de productos obtenida en el paso 1										
LsdA no mutada	60,1	30,2	2,9	2,8	30,8	1,1	0,3	22,5	3,9	1,5
H142E (subsitio -1)	56,2	31,6	11,5	0,4	50,8	0,1	0,1	5,2	0	0
R141K-H142S (subsitio -1)	56,6	31,4	11,0	0,4	51,2	0,1	0,1	5,4	0	0
F274A (subsitio +2)	58,7	30,8	7,8	1,9	38,1	0,3	0,3	16,4	3,3	0,3
N276H (subsitio +2)	59,2	30,9	8,3	0,7	47,6	0,3	0,4	8,6	2,2	0,1
N276R (subsitio +2)	57,9	31,0	9,6	0,4	42,1	1,8	0,4	3,2	9,6	0,8
R304K (subsitio +3)	60,7	30,9	6,2	0,9	35,4	0,4	1,4	19,8	3,1	0,6
N276H-R304 (subsitos +2, +3)	61,2	30,4	7,0	0,5	39,0	0,6	1,2	17,8	2,2	0,4
N276R-R304 (subsitos +2, +3)	57,2	31,2	10,3	0,4	38,1	2,1	0,2	5,7	10,2	0,9
N276K-R304 (subsitos +2, +3)	61,6	30,3	6,8	0,3	44,2	1,3	0,4	8,4	6,8	0,5

Leyenda: G, glucosa; F, fructosa; S, sacarosa; 1K, 1-kestotriosa; 6K, 6-kestotetraosa; NK, neokestotriosa; 1,1K, 1,1-kestotetraosa; 1,6K, 1,6-kestotetraosa; 6,6K, 6,6-kestotetraosa El contenido FOS de cadenas cortas está referido a la suma de trisacáridos (1K, 6K y NK) y tetrasacáridos (1,1K; 1,6K y 6,6K). Las variantes de LsdA modificada con mutación en el subsitio +2 y/o +3 y la enzima no mutada sintetizaron proporciones menores de mezclas de pentasacáridos (GF₄) y eventualmente hexasacáridos (GF₅) que no se cuantificaron en el experimento.

Ejemplo 12. Establecimiento de un proceso bi-enzimático para la producción de un sirope de FOS libre de glucosa.

Con el objetivo de eliminar el subproducto glucosa presente en el sirope FOS producido a partir de la sacarosa, se cambió el segundo paso del proceso bi-enzimático descrito en el

5 Ejemplo 11. En el nuevo proceso, la transformación de los productos de la reacción de Sa1-SSTrec (paso 1) no se realizó con un preparado soluble de la LsdA modificada, sino con células enteras de clones de *P. pastoris*, que acumulan la enzima LsdA modificada en el periplasma. En aras de hacer reusable este biocatalizador, las células de la levadura recombinante se inmovilizaron en una matriz de alginato de calcio, y se
10 almacenaron viables en una solución de sacarosa (1,75 M) a 4°C.

La Figura 1 muestra los cromatogramas del análisis por HPLC de los pasos intermedio y final de los dos tipos de procesos bi-enzimáticos implementados. La reacción de Sa1-SSTrec con sacarosa (700 g/L) a pH 5,5 y 45°C (paso 1) produjo 1-kestotriosa (GF₂) y 1,1-kestotetraosa (GF₃) en proporción 9:1, y su suma representó el 56% (peso/peso) de
15 la composición total de carbohidratos (Fig. 1A y Fig. 1C). El empleo de un preparado soluble de LsdA modificada (variante R141K-H142S) en el segundo paso del proceso permitió la hidrólisis total de la sacarosa remanente, sin alterar la suma de 1-kestotriosa y 1,1-kestotetraosa (Fig. 1B). En la propuesta alternativa, la levadura inmovilizada que expresaba LsdA modificada (variante R141K-H142S) consumió la sacarosa y los
20 productos monosacáridos sin alterar el contenido y la composición de FOS (Fig. 1D). La eliminación de la glucosa en el sirope FOS, por la levadura inmovilizada que expresa LsdA modificada permite ampliar su aplicación a formulaciones de alimentos prebióticos destinados a pacientes diabéticos.