

Universidad Autónoma de Madrid

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**Estudio de la  $\alpha$ -glucosidasa de *Schwanniomyces occidentalis* para  
la síntesis de isomaltooligosacáridos y otros compuestos  
glucosilados**

Zoran Merdzo Kunovac

Madrid, 2021

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio de la  $\alpha$ -glucosidasa de *Schwanniomyces occidentalis* para  
su aplicación en la síntesis de isomaltooligosacáridos y otros  
compuestos glucosilados**

Zoran Merdzo Kunovac

Licenciado en Biología

MEMORIA

Para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

DIRECTORA

María Fernández Lobato

Madrid, 2021

María Fernández Lobato, Dra. en Ciencias, Investigadora en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa y Catedrática de la Universidad Autónoma de Madrid en el Departamento de Biología Molecular,

CERTIFICA que:

Zoran Merdzo Kunovac, Licenciado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid y con Máster en Biotecnología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado el trabajo titulado “*Estudio de la  $\alpha$ -glucosidasa de Schwanniomyces occidentalis para su aplicación en la síntesis de isomaltooligosacáridos y otros compuestos glucosilados*” que constituye la Memoria con la que opta al grado de Doctor, bajo su dirección en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

Y para que conste y con los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Madrid, 04 de junio 2021

Fdo: María Fernández Lobato

*A todos los que me han acompañado en este viaje*

*A mis padres y mis hermanas*

*Donde no falta voluntad siempre hay un camino*

J.R.R. Tolkien

*Čudno je, kako je malo potrebno da budemo sretni i još čudnije,*

*kako nam često baš to nedostaje.*

Ivo Andrić

## Agradecimientos

Esta es la parte más importante de mi tesis por ser la única que se va a leer todo el mundo. Donde aparecen todas las personas que directa o indirectamente, consciente o inconscientemente, me han ayudado en este arduo camino que es la realización de la tesis.

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. María Fernández Lobato por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio que dirige y la enorme ayuda recibida, especialmente, en los últimos meses. Al Dr. Francisco J. Plou (Kiko), del ICP, por todos los consejos, ideas y ánimos. Siempre es un placer hablar con él de ciencia y de experimentos. A la Dra. Julia Sanz, del IQFR, y, especialmente, a Elena por el trabajo en la cristalización de la proteína que ha sido muy complicado. Espero que saquemos pronto el artículo. A la Dra. Ana Poveda, del CIC-Biogune, por la realización de los análisis de RMN.

Gracias a todo el personal de servicios del CBM por cuidarnos con tanto mimo y tener tanta paciencia con nuestras peticiones. Quisiera dar las gracias especialmente a Paco por toda la ayuda recibida cuando se nos rompía el HPLC y demás instrumentos. A Borja por llevarse la ingente cantidad de cacharros entre bromas y charlas (todavía estoy esperando el jamón del concurso de no manchar). A Dionisio por los experimentos con fermentador y también la ayuda y los consejos sobre distintos protocolos. A David, de recepción, por recibirme siempre con una sonrisa y compartir lo mucho que sabe de mi tierra de origen.

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros y compañeras de laboratorio y a todas las personas que han pasado por él. Gracias a Peter por ser mi *bro*, levantarme el ánimo cuando lo necesitaba y por todos los buenos momentos que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio. A Tinchi por ser una *dramaqueen* estresada con muy buen humor. A Tom, *aka* Tomasito de Jerez, por lo buen estudiante que fue y los buenos ratos que pasamos. A Egle por ser mi mejor estudiante, por la gran ayuda en los experimentos y por su humor ácido. A mi Marinilla, por todos los cafés terapéuticos que nos hemos tomado, los echaré de menos sin duda. Gracias a mi Ralphie por rascarme la cabeza, me ha faltado en el último tramo de la tesis. A María por todas las broncas y “¿qué haces, qué haces?!” que mantenían en orden el laboratorio. No me olvido de todo el apoyo y la ayuda que siempre me ha dado, aunque empezáramos con mal pie al final ha quedado una bonita amistad. A Asun por tener siempre listo todo lo que necesitábamos en el laboratorio y por la ayuda en todos los aspectos. El laboratorio no ha sido el mismo desde que te fuiste. Al miembro extra del laboratorio, Reme, por asegurarse de que comiéramos fruta todas las mañanas. A Azman, *aka Brown Sugar*, el integrante extra del 102, gracias por las visitas frecuentes que nos subían el ánimo a todos. A mi gente del CBM: Angel, Jorge y Andrés a quienes agradezco mucho el apoyo mutuo, las cervezas juntos y la amistad que se ha formado.

Quiero agradecer a toda la gente del ICP, del grupo de Kiko, por toda la ayuda y paciencia con los experimentos. Gracias a Noa por darme el apoyo con los análisis pero, sobre todo, por las risas y los buenos ratos en tu laboratorio. A Fadia por contarme tantas cosas de Méjico que desconocía y por los caramelos picantes. Gracias a Joselu por los análisis de polifenoles, sin duda ha sido una gran ayuda, sobre todo, en este tramo final. Al *Gremlin* que siempre aparece cuando menos te lo esperas con un “¡amigo!” y por todo lo que me ha enseñado de bioinformática. Al *Ninio* por ser tan majo, siempre es una alegría verle. A Ivan por todas las conversaciones en croata y los “*jebo te!*” que me transportan a mi tierra natal.

No me puedo olvidar de todos los amigos que me han apoyado en mi vida fuera del laboratorio sobre todo en tiempos difíciles y que sin ellos no estaría en este punto. Especialmente a Pedro, que ha sido compañero de fatigas casi desde que llegué a Madrid y que ha prometido llamarme doctor a partir de ahora. A Nuno e Itzi por ser siempre un apoyo. A Randy y a Helen por subvencionarme la fiesta para levantarme el ánimo. A Sergio, *aka Cuack*, por los buenos ratos mientras vivíamos juntos y la comida del diácono. Gracias a *Adol* por todas las veces que me ha sacado las castañas del fuego, eso nunca lo olvidaré. A Paco y a David por todas las veces que me han ayudado en las situaciones más difíciles. Arnaitz, o mejor dicho *Patxi*, ¿quién iba a decir que llegaría hasta aquí? Fue un placer convivir con él y un honor tenerle como amigo. Me dejo a mucha gente por mencionar, pero no me olvido de lo que cada uno ha aportado en mi vida. Sin ellos sería una persona diferente.

Por último, quiero agradecer a los más importantes de mi vida, mi familia. A mis padres por confiar en mí, por darme todo lo que han podido y más. Las dificultades que hemos vivido no les han hecho rendirse nunca y es el legado más importante que me dejan. A *Stole*, *usted padre*, por todo lo que me ha enseñado incluso aunque no quisiera aprenderlo. A Mirjana, mi *majko*, porque sin ella no sería nadie... ¡qué se puede decir de una madre! Todo lo que diga es poco. A mi hermana Julia, por ser mucho más valiente de lo que ella cree, siempre ha sido mi heroína y me ha cuidado como nadie. Agradezco a mi hermana Helena haber sido siempre mi cómplice y mi consejera. A Carlos, que ha entrado a formar parte de nuestra familia, y se ha convertido en un hermano para mí. A mi sobri favorito, Martin, con quien lo paso genial haciendo trastadas.

Quiero agradecer especialmente a Ana por haber puesto patas arriba mi vida, me hacía falta, aunque le tenga que aportar bibliografía para que se crea lo que le digo. A Sofía, mi pequeño Critter, que me quiere a ratos. Y a *Canica*, que ha compartido los desvelos de su dueño con mucho cariño. Las erratas de esta tesis no son mías, sino de él, cuando quiere que pare de trabajar caminando sobre el teclado.

## Resumen

La GAM1 de *Scwanniomycetes occidentalis* es una  $\alpha$ -glucosidasa extracelular que hidroliza enlaces  $\alpha$ 1-4 glucosídicos de oligosacáridos formados por unidades de glucosa como la maltosa o la maltotriosa. Además, esta enzima es capaz de transferir unidades de glucosa para formar isomaltooligosacáridos (IMOs) como la isomaltosa, isomaltotriosa y panosa que tienen interés en la industria alimentaria por sus características prebióticas. La enzima también produce maltotriosa.

En este trabajo la  $\alpha$ -glucosidasa GAM1 se expresó heterológamente en *Pichia pastoris*, se realizó su caracterización bioquímica y se estudió su capacidad para sintetizar IMOs en distintas condiciones. Entre ellas, y tras la adición de distintas concentraciones de glucosa, se logró sesgar la especificidad transferasa de la enzima hacia la producción de azúcares que contienen solamente enlaces  $\alpha$ 1-6, sobre todo isomaltosa, quedando inhibida la síntesis de los trisacáridos panosa y maltotriosa. Se exploró la capacidad de GAM1 para glucosilar distintos tipos de aceptores, entre ellos azúcares y polifenoles, logrando producir varios trisacáridos formados por la unión de una glucosa a sacarosa mediante distintos tipos de enlaces a la unidad de glucosa, y disacáridos de glucosil-xilosa en los que se formaron distintos tipos de enlace entre las unidades constituyentes. GAM1 glucosiló también piceido, un derivado monoglucosilado del resveratrol, generando mono- y diglucósido del piceido, en los que las unidades de glucosa se unieron a la unidad glucosídica del aceptor. Los nuevos productos generados fueron purificados y su estructura identificada mediante RMN.

Se estudió también la estructura tridimensional de GAM1 mediante modelados por homologías y se abordó el estudio de su especificidad utilizando *Evolutionary Trace* y mutagénesis dirigida hacia residuos de su bolsillo catalítico implicados en los subsitios -1, +1 y +2. La mayoría de las sustituciones realizadas afectaron en mayor o menor medida a la capacidad transferasa de la enzima que alteraron las proporciones producidas de IMOs. Una de las sustituciones en particular incrementó especialmente la producción de IMOs hasta prácticamente duplicarla, principalmente la de isomaltosa e isomaltotriosa, además produjo pequeñas cantidades de un nuevo disacárido formado por dos unidades de glucosas unidas por enlace  $\alpha$ 1-1, la trehalosa.

Por último, abordamos la inmovilización de GAM1 sobre bolas de quitosano utilizando dos *linkers* diferentes (glutaraldehído y genipina), se optimizaron las condiciones de la inmovilización y se analizó tanto la estabilidad operacional del sistema como a distintos valores de pH y temperatura. La estabilidad operacional para las reacciones de transglucosilación fue superior al usar glutaraldehído.

## Abstract

GAM1 from *Schwanniomyces occidentalis* is an extracellular  $\alpha$ -glycosidase that hydrolyzes  $\alpha$ 1-4 glycosidic bonds of oligosaccharides formed by glucose units such as maltose and maltotriose. Additionally, GAM1 is capable of transferring glucose units to form isomaltooligosaccharides (IMOs) such as isomaltose, isomaltotriose and panose, which are of interest in the food industry due to their prebiotic characteristics. It is capable as well to form maltotriose.

In this work, the enzyme was heterologously expressed in the *Pichia pastoris* system and its biochemical characterization as well as the IMOs production capacity in different conditions were assessed. Among them, and after the addition of different concentrations of glucose, it was possible to bias the transferase specificity of the enzyme towards the production of sugars that contain only  $\alpha$ 1-6 bonds, especially isomaltose, with the synthesis of the trisaccharides panose and maltotriose being inhibited. The glucosylation capacity of different acceptor types, sugars and polyphenols, was explored. Trisaccharides were formed through the formation of different glycosidic bonds to the glucose unit of the sucrose, and disaccharides glucosyl-xylose through two different glycosidic bonds. GAM1 also glycosylated piceid, a monoglycosylated derivative of resveratrol, generating mono- and diglycoside of piceid, in which the glucose units were attached to the glucosidic unit of the new acceptor. The structure of the new products formed were identified by NMR analysis.

GAM1 three-dimensional structure was studied through homology modeling and the study of its specificity using *Evolutionary Trace* and site directed mutagenesis of the catalytic pocket residues involved in the subsites -1, +1 and +2 was approached. The mutation of each of the residues led to the modification of the transfer reactions to a greater or lesser extent and altered the IMOs production proportions. One particular substitution increased IMOs production by almost two-fold, especially of the disaccharide isomaltose and the trisaccharide isomaltotriose. In addition, small amounts of a new disaccharide formed by two glucose units linked by a  $\alpha$ 1-1 glycosidic link, trehalose, were synthesized.

Finally, GAM1 immobilization on chitosan beads using two different linkers (glutaraldehyde and genipin) was approached. The immobilization conditions were optimized, and the operational, as well as at different pH and temperature, stabilities were analyzed. The operational transglycosylation stability of this protein was greater when protein was immobilized with glutaraldehyde.



# Índice General

|                        |      |
|------------------------|------|
| Índice.....            | i    |
| Índice de Figuras..... | v    |
| Índice de Tablas.....  | viii |
| Abreviaturas.....      | ix   |

# Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1 Isomaltooligosacáridos .....   | 1         |
| 1.1.1 Propiedades y aplicaciones de los IMOs .....                               | 2         |
| 1.1.2 Producción de IMOs .....   | 5         |
| 1.2 Las $\alpha$ -glucosidasas y su estructura .....                             | 7         |
| 1.3 Transglucosilación de aceptores .....  | 11        |
| 1.4 Inmovilización enzimática .....  | 13        |
| 1.5 <i>Schwanniomyces occidentalis</i> organismo de interés biotecnológico ..... | 16        |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | <b>25</b> |
| 3.1 Azúcares y reactivos .....   | 25        |
| 3.2 Disoluciones tampón .....  | 26        |
| 3.3 Material biológico .....   | 26        |
| 3.3.1 Microorganismos .....  | 26        |
| 3.3.2 Plásmidos .....  | 26        |
| 3.4 Cultivo y mantenimiento de microorganismos .....                             | 27        |
| 3.4.1 Bacterias .....  | 27        |
| 3.4.2 Levaduras .....  | 27        |
| 3.4.3 Transformación de microorganismos .....                                    | 28        |
| 3.5 Obtención y manipulación de ácidos nucleicos .....                           | 29        |
| 3.5.1 ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....                                     | 29        |
| 3.5.2 Obtención de clones y tratamientos del ADN .....                           | 29        |
| 3.5.3 Reacción en cadena de polimerasa (PCR) .....                               | 30        |
| 3.5.4 Visualización de ácidos nucleicos y cuantificación .....                   | 31        |
| 3.5.5 Secuenciación .....  | 32        |
| 3.6 Obtención y manipulación de proteínas .....                                  | 32        |
| 3.6.1 Expresión de GAM1 en <i>Pichia pastoris</i> .....                          | 32        |
| 3.6.2 Purificación y concentración de proteína GAM1 .....                        | 32        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.6.3 Análisis SDS-PAGE .....  | 33        |
| 3.6.3 Cuantificación de proteínas.....   | 33        |
| 3.6.4 Desglicosilación de proteínas.....   | 33        |
| 3.6.5 Análisis de la actividad $\alpha$ -glucosidasa.....                                | 33        |
| 3.6.5.1 Método del GOD-POD .....   | 33        |
| 3.6.5.2 Análisis cinético.....   | 34        |
| 3.6.5.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad $\alpha$ -glucosidasa.....           | 34        |
| 3.6.5.4 Efecto del pH sobre la actividad $\alpha$ -glucosidasa.....                      | 35        |
| 3.6.5.5 Efecto de disolventes orgánicos sobre la actividad $\alpha$ -glucosidasa .....   | 35        |
| 3.6.6 Análisis de la actividad transferasa .....   | 35        |
| 3.6.6.1 Reacciones de transglicosilación .....   | 35        |
| 3.6.6.2 Reacción <i>one-pot</i> en matraz y fermentador alimentado .....                 | 36        |
| 3.6.6.2 Análisis HPLC .....  | 37        |
| 3.6.6.3 Análisis HPAEC-PAD .....   | 38        |
| 3.6.6.4 Purificación de productos de transglicosilación.....                             | 38        |
| 3.6.6.5 Análisis de compuestos glicosilados por espectroscopía de masas (MS).....        | 39        |
| 3.6.6.6 Análisis de compuestos glicosilados por resonancia magnética nuclear (RMN) ..... | 39        |
| 3.7 Herramientas bioinformáticas.....  | 40        |
| 3.8 Inmovilización enzimática sobre soporte de quitosano .....                           | 40        |
| 3.8.1 Preparación del soporte de inmovilización .....                                    | 41        |
| 3.8.2 Inmovilización de GAM1.....  | 41        |
| 3.8.2.1 Ensayo de actividad de los biocatalizadores inmovilizados .....                  | 41        |
| 3.8.2.2 Cálculo de los parámetros de inmovilización .....                                | 42        |
| 3.8.2.3 Análisis de la actividad transferasa de la enzima inmovilizada.....              | 43        |
| <b>4 RESULTADOS.....</b>   | <b>47</b> |
| 4.1 Clonación, expresión heteróloga y caracterización de GAM1.....                       | 47        |
| 4.1.1 Obtención de las construcciones de expresión.....                                  | 47        |
| 4.1.2 Expresión heteróloga en <i>Pichia pastoris</i> .....                               | 48        |
| 4.1.3 Purificación y caracterización de las propiedades de GAM1 .....                    | 49        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.1.4 Caracterización de la actividad transferasa de GAM1 .....   | 51         |
| 4.1.5 Modulación de la actividad transferasa de GAM1 por la concentración de glucosa. ....  | 54         |
| 4.1.6 Transglicosilación de aceptores glucosídicos y polifenoles .....  | 55         |
| 4.1.7 Reacción de transglicosilación <i>one-pot</i> .....   | 60         |
| 4.2 Estudio estructural de GAM1 .....   | 62         |
| 4.2.1 Estudio de la secuencia y estructura de GAM1 .....  | 62         |
| 4.2.1 Obtención y caracterización cinética de las variantes de GAM1 generadas .....   | 65         |
| 4.2.2 Evaluación de la actividad transferasa de las variantes proteicas formadas .....  | 66         |
| 4.2.3 Estudio del centro catalítico mediante análisis por <i>Evolutionary Trace</i> .....   | 68         |
| 4.2.4 Obtención y caracterización cinética de los mutantes de GAM1 diseñados por <i>Evolutionary Trace</i> .....                  | 70         |
| 4.2.5 Caracterización de la actividad transferasa de los mutantes obtenidos mediante análisis por <i>Evolutionary Trace</i> ..... | 71         |
| 4.3 Inmovilización de GAM1.....   | 76         |
| 4.3.1 Obtención de los <i>chitosan beads</i> .....  | 76         |
| 4.3.2 Análisis de la actividad y estabilidad de la inmovilización .....   | 79         |
| 4.3.3 Análisis de la estabilidad operacional de la actividad hidrolasa de los biocatalizadores inmovilizados.....                 | 82         |
| 4.3.4 Análisis de la actividad glucosiltransferasa de los biocatalizadores inmovilizados .....                                    | 83         |
| <b>5 DISCUSIÓN .....</b>  | <b>89</b>  |
| 5.1 Caracterización bioquímica y capacidad transglicosilasa de GAM1 .....   | 89         |
| 5.2 Estudio estructural del bolsillo catalítico de GAM1 y análisis de la actividad transglicosilasa .....                         | 94         |
| 5.3 Inmovilización de GAM1 sobre <i>chitosan beads</i> . .....  | 98         |
| <b>6 CONCLUSIONES .....</b>   | <b>103</b> |
| Bibliografía .....  | 105        |
| Anexo I: Figuras y Tablas.....  | 120        |
| Anexo II: Publicaciones .....   | 132        |

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.1 Ejemplos de estructuras y nombres de IMOs más representativos .....   | 1  |
| Figura 1.2 Efectos de IMOs sobre la salud .....  | 3  |
| Figura 1.3 Esquema de los mecanismos catalíticos de las GHs .....  | 8  |
| Figura 1.4 Esquema de los subsitios de unión de los carbohidratos en las glicosil hidrolasas .....   | 9  |
| Figura 1.5 Estructura de la $\alpha$ -glucosidasa de <i>Beta vulgaris</i> unida a acarbosa .....   | 10 |
| Figura 1.6 Esquema de los métodos de inmovilización enzimática y celular más generales.....  | 14 |
| Figura 3.1 Esquema del ensayo de actividad mediante GOD-POD .....  | 34 |
| Figura 3.2 Esquema del ensayo de la actividad hidrolítica realizado con la enzima inmovilizada en las <i>chitobeads</i> .....                                    | 42 |
| Figura 4.1 Perfil de crecimiento y actividad de GAM1 detectada en <i>P. pastoris</i> .....   | 48 |
| Figura 4.2 Análisis en SDS-PAGE de la desglicosilación de GAM1 .....   | 49 |
| Figura 4.3 Evaluación de la actividad hidrolasa de GAM1 a los valores de pH y temperatura indicados.....   | 50 |
| Figura 4.4 Estabilidad en disolventes orgánicos de GAM1 .....  | 51 |
| Figura 4.5. Análisis HPAEC de la reacción de transglicosilación mediada por GAM1 .....   | 52 |
| Figura 4.6 Análisis de la producción de IMOs mediada por GAM1.....   | 53 |
| Figura 4.7 Esquema de las reacciones catalizadas por GAM1 en reacciones basadas en maltosa .....   | 53 |
| Figura 4.8 Transglicosilación con suplementación de glucosa .....  | 54 |
| Figura 4.9 Análisis de la reacción de transglicosilación en presencia de xilosa .....  | 56 |
| Figura 4.10 Análisis de la reacción de transglicosilación en presencia de sacarosa.....  | 57 |
| Figura 4.11 Análisis de la producción de IMOS en presencia de xilosa y sacarosa .....  | 57 |
| Figura 4.12 Análisis de la transglicosilación de piceido por GAM1 .....  | 58 |
| Figura 4.13 Estructura de los sacáridos formados por transglicosilación .....  | 59 |
| Figura 4.14 Crecimiento del transformante de <i>P. pastoris</i> que incluye la construcción GAM1.pIB2 y presencia de glucosa en la reacción <i>one-pot</i> ..... | 60 |
| Figura 4.15 Cromatogramas de la reacción <i>one-pot</i> en cultivos de <i>P. pastoris</i> -GAM1.pIB2.....  | 61 |
| Figura 4.16 Cromatogramas de los productos de la reacción <i>one-pot</i> en fermentador <i>batch</i> alimentado del cultivo del transformante GAM1 pIB2 .....    | 62 |
| Figura 4.17 Alineamiento estructural de secuencias.....  | 63 |
| Figura 4.18 Alineamiento estructural.....  | 64 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 4.19 Producción de IMOs totales generados por las variantes que incluyen las sustituciones indicadas vs conversión de maltosa ..... | 66  |
| Figura 4.20 Análisis de los productos de transferencia generados por las variantes mutadas de GAM1 indicadas .....                         | 67  |
| Figura 4.21 Análisis de la actividad transferasa de la variante GAM1-W324F .....   | 68  |
| Figura 4.22 Alineamiento estructural.....  | 68  |
| Figura 4.23 Análisis de la secuencia del modelo de GAM1 por <i>Evolutionary Trace</i> .....  | 69  |
| Figura 4.24 Producción de IMOs total de los mutantes obtenidos por ET referenciados vs conversión de maltosa .....                         | 72  |
| Figura 4.25 Análisis de los productos de transglicosilación obtenidos por las variantes de GAM1 del subsitio -1 .....                      | 73  |
| Figura 4.26 Producción de trehalosa obtenida con el mutante W470F .....  | 73  |
| Figura 4.27 Análisis de los productos de transglicosilación obtenidos por las variantes de GAM1 del subsitio +1 .....                      | 74  |
| Figura 4.28 Reacción de transglicosilación de las variantes que incluían las sustituciones W435K y D230N.....                              | 75  |
| Figura 4.29 Parámetros de inmovilización con distintas cantidades de actividad de GAM1 .....   | 77  |
| Figura 4.30 Parámetros de inmovilización con las condiciones y linkers indicados .....   | 78  |
| Figura 4.31 Actividad relativa del biocatalizador inmovilizado a distintos valores de pH.....  | 80  |
| Figura 4.32 Estabilidad de los biocatalizadores inmovilizados a distintos valores de pH.....   | 81  |
| Figura 4.33 Actividad relativa de los biocatalizadores inmovilizados a distintas temperaturas .....  | 81  |
| Figura 4.34 Estabilidad de los biocatalizadores generados a distintas temperaturas.....  | 82  |
| Figura 4.35 Estabilidad operacional de los biocatalizadores generados .....  | 83  |
| Figura 4.36 Evaluación de la actividad transferasa de los biocatalizadores inmovilizados tras 10 ciclos de transglicosilación .....        | 84  |
| Figura 5.1 Unión de xilosa con el modelo de GAM1 .....   | 92  |
| Figura 5.2 Alineamiento modelo estructural de GAM1.....  | 94  |
| Figura 5.3 Alineamiento modelo estructural de GAM1.....  | 96  |
| Figura S1 Secuencia del marco de lectura abierto de GAM1 .....   | 120 |
| Figura S2. Predicción del péptido señal de exportación de GAM1 .....   | 123 |
| Figura S3. Gel SDS-PAGE de la expresión de GAM1.pIB4 en <i>Pichia pastoris</i> .....   | 123 |
| Figura S4. Cromatograma del análisis HPLC-PDA de la transglicosilación de piceido .....  | 124 |
| Figura S5. Análisis por MS-ESI del producto mayoritario de la transglicosilación de xilosa .....   | 124 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura S6 Análisis por MS-ESI del producto mayoritario de la transglicosilación de sacarosa.....                                    | 125 |
| Figura S7 Análisis por MS-ESI del producto diglucosilado de la transglicosilación de piceido.....                                   | 125 |
| Figura S8 Análisis por MS-ESI del producto monoglucosilado de la transglicosilación de piceido.....                                 | 126 |
| Figura S9 Análisis por MS-ESI del producto de la transglicosilación de resveratrol.....   | 126 |
| Figura S10 Espectro ROESY y HSQC del monoglucósido y diglúcosido de piceido.....  | 127 |
| Figura S11 Estructura de los productos de reacción de transglicosilación.....   | 128 |
| Figura S12 Espectro HSQC del producto glucosilado de resveratrol y su estructura.....   | 129 |
| Figura S13. Seguimiento del cultivo realizado en fermentador <i>fed-batch</i> de <i>P. pastoris</i> transformada con GAM1-pIB2..... | 129 |
| Figura S14. Árbol filogenético de GAM1.....   | 130 |
| Figura S15. Árbol filogenético de GAM1 generado mediante la herramienta ET server.....  | 131 |

## Índice de tablas

|  |     |
|--|-----|
| Tabla 1.1 Algunos ejemplos de sustratos y enzimas utilizadas en la formación de IMOs.....              | 5   |
| Tabla 3.1 Azúcares .....   | 25  |
| Tabla 3.2. Plásmidos y constructos de este trabajo .....   | 27  |
| Tabla 3.3 Oligonucleótidos empleados .....   | 30  |
| Tabla 3.4 Columnas analíticas utilizadas en el análisis por HPLC, condiciones de análisis y usos ..... | 37  |
| Tabla 3.5 Método de HPAEC-PAD para el análisis de IMOs.....  | 38  |
| Tabla 4.1 Parámetros cinéticos de GAM1.....  | 50  |
| Tabla 4.2 Parámetros cinéticos de los mutantes de GAM1 .....   | 65  |
| Tabla 4.3 Máxima concentración de azúcares generados por las variantes indicadas .....                 | 66  |
| Tabla 4.4 Parámetros cinéticos de las variantes de GAM1 generadas por ET.....                          | 71  |
| Tabla 4.5 Máxima concentración de azúcares generados por las variantes indicadas .....                 | 76  |
| Tabla 4.6 Análisis de los parámetros de inmovilización sobre 10 g de soporte.....                      | 84  |
| Tabla S1. Cebadores utilizados en las PCR mutagénicas.....   | 122 |
| Tabla S3. Residuos alternativos analizados con <i>Evolutionary Trace</i> .....                         | 130 |



## Abreviaturas

|                    |   |
|--------------------|---|
| <b>ADN</b>         | Ácido desoxirribonucleico   |
| <b>Amp</b>         | Ampicilina  |
| <b>AmpR</b>        | Resistencia a Ampicilina  |
| <b>BMG</b>         | Medio mínimo con glicerol tamponado   |
| <b>BMGlc</b>       | Medio mínimo con glucosa tamponado  |
| <b>BMM</b>         | Medio mínimo con metanol tamponado  |
| <b>CGTasa</b>      | Ciclodextrin glucanotrasferasa  |
| <b>CIC bioGUNE</b> | Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias  |
| <b>C-terminal</b>  | Carboxilo terminal  |
| <b>EC</b>          | <i>Enzyme Commission</i>  |
| <b>EFSA</b>        | Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ( <i>European Food Safety Authority</i> )  |
| <b>EGCG</b>        | Epigallocatequin galato   |
| <b>ELSD</b>        | Detector evaporativo de dispersión de luz ( <i>Evaporative Light Scattering Detector</i> )  |
| <b>FBMS</b>        | Medio de fermentación con sales   |
| <b>FOSHU</b>       | Alimentos para Uso Específico en la Salud ( <i>Foods for Specified Health Use</i> )   |
| <b>GAM1</b>        | Glucamilasa 1 ( $\alpha$ -glucosidasa de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> )   |
| <b>GH31</b>        | Familia Glicosil-hidrolasa 31   |
| <b>Glc</b>         | Glucosa   |
| <b>GOD-POD</b>     | Glucosa oxidasa-peroxidasa  |
| <b>HPAEC-PAD</b>   | Cromatografía de intercambio de aniones de alta eficacia-Detector de pulso amperométrico ( <i>High Performance Anion Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detector</i> ) |
| <b>HPLC-ELSD</b>   | Cromatografía líquida de alta eficacia ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )  |
| <b>IMO</b>         | Isomaltooligosacárido   |
| <b>IQFR</b>        | Instituto de Química Física Rocasolano  |
| <b>IUBMB</b>       | Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular ( <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> )   |
| <b>LB</b>          | Medio Luria-Bertani   |
| <b>Mal</b>         | Maltosa   |
| <b>MD</b>          | Medio mínimo dextrosa   |
| <b>MGAM</b>        | Maltasa-glucoamilasa intestinal humana  |
| <b>MMAS</b>        | Medio mínimo de screening (medio mínimo metanol almidón sorbitol)   |
| <b>MS-ESI</b>      | Espectroscopia de masas - ionización por electrospray ( <i>Mass Spectrometry-Electrospray Ionization</i> )  |
| <b>MWCO</b>        | Corte de peso molecular (Molecular weight cut-off)  |
| <b>NEB</b>         | New England Biolabs   |
| <b>nt</b>          | Nucleótidos   |
| <b>N-terminal</b>  | Amino terminal  |
| <b>NtMGAM</b>      | Subunidad amino terminal de la maltasa-glucoamilasa intestinal humana   |
| <b>NtSI</b>        | Subunidad amino terminal de la sacarasa-isomaltasa intestinal humana  |
| <b>ori</b>         | origen de replicación   |
| <b>P-AOX1</b>      | Promotor de la alcohol oxidasa 1 de <i>Pichia pastoris</i>  |
| <b>pb</b>          | Pares de bases  |
| <b>PCR</b>         | Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )  |
| <b>PDA</b>         | Detector de matriz de fotodiodos (Photodiode Array detector)  |
| <b>PDB</b>         | Banco de datos de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )  |
| <b>PDBAA</b>       | Base de datos de secuencias derivada de la PDB  |
| <b>PNGasa F</b>    | Endoglicosidasa F   |
| <b>PpHIS4</b>      | Proteína trifuncional de la síntesis de histidina (Histidinol deshidrogenasa 4)   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>PTM1</b>     | Trazas de metales para medio de fermentador  |
| <b>RMN</b>      | Resonancia magnética nuclear   |
| <b>SDS-PAGE</b> | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico. ( <i>Sodium dodecyl sulfate- Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> ) |
| <b>SI</b>       | Sacarasa-isomaltasa intestinal humana  |
| <b>SIdI</b>     | Servicio Interdepartamental de Investigación   |
| <b>Tm</b>       | Temperatura de fusión del ADN ( <i>Melting Temperature</i> )   |
| <b>UAM</b>      | Universidad Autónoma de Madrid   |
| <b>UDO600</b>   | Unidades de densidad óptica a 600 nm   |
| <b>UV</b>       | Ultravioleta   |
| <b>wt</b>       | <i>Wild type</i> (de tipo natural)   |
| <b>YEPD</b>     | Medio rico para levaduras extracto de levadura peptona dextrosa ( <i>Yeast extract peptone dextrose</i> )                                |
| <b>YNB</b>      | Base nitrogenada sin aminoácidos para levaduras ( <i>Yeast Nitrogen Base w/o aminoacids</i> )  |

# INTRODUCCIÓN

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Isomaltooligosacáridos

La investigación sobre la producción de oligosacáridos para su uso en alimentación comenzó a realizarse alrededor de 1970-1975 en Japón, donde se desarrollaron varios oligosacáridos derivados de sacarosa, lactosa, almidón, y otros polisacáridos que se usaban como materia prima en distintos sectores industriales (Nakakuki, 2003, 2005).

Los isomaltooligosacáridos (IMOs) se definen, en el sentido más estricto, como moléculas lineales de carbohidratos formadas por unidades de D-glucosa unidas entre sí por enlaces  $\alpha$ 1-6 con un grado de polimerización de 2-10. Aunque, en un sentido más amplio se acepta también que los IMOs pueden estar formados por unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces  $\alpha$ 1-1,  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3 y  $\alpha$ 1-6, como en el caso de la isomaltosa, isomaltotriosa, kojibiosa y nigerosa, e incluso que estos enlaces puedan estar en combinación con uniones  $\alpha$ 1-4, como en el caso de la panosa, entre otros (Casa-Villegas, Marín-Navarro y Polaina, 2018; Sorndech *et al.*, 2018). La consideración de IMOs se ha extendido también hasta otros tipos de oligosacáridos como los ciclodextranos, los IMOs ramificados a los que también se les denomina glucooligosacáridos e incluso los IMO-alditoles (Goffin *et al.*, 2011). Las estructuras de algunos de los IMOs más representativos se muestran en la Figura 1.1.

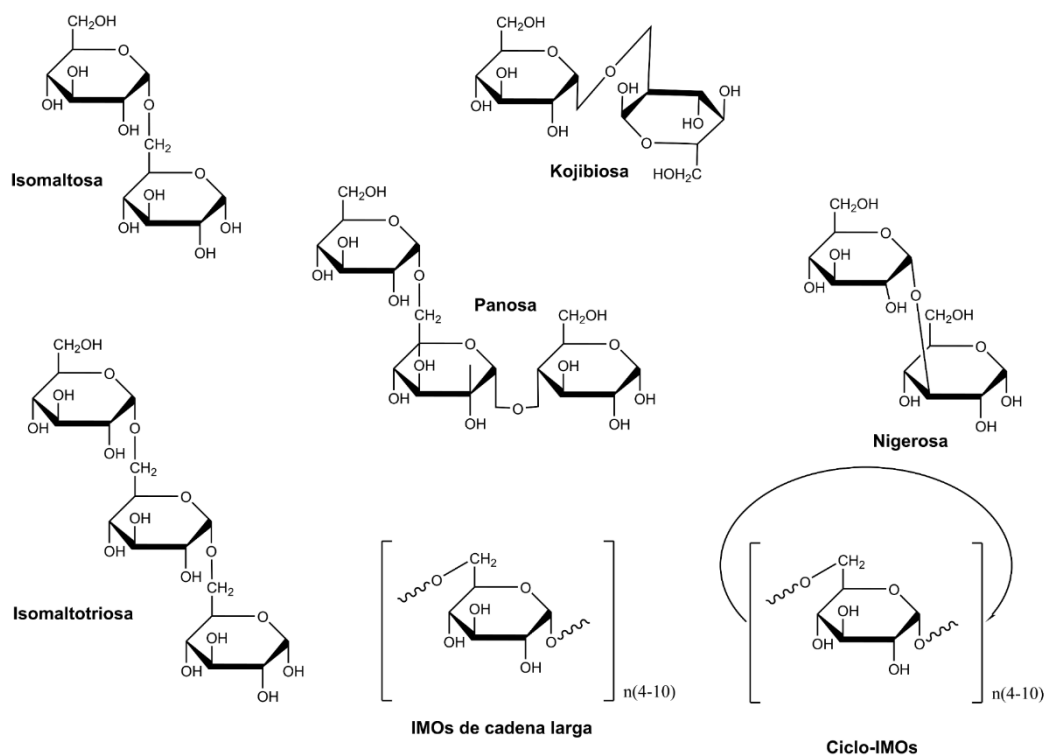


Figura 1.1 Ejemplos de IMOs más representativos. Adaptado de Sorndech *et al.*(2018).

Los IMOs pueden encontrarse de forma natural en distintos productos fermentados, como son el miso, el sake, la salsa de soja o la cerveza, pero también en la miel (Crittenden y Playne, 1996; Tunland y Meyer, 2002; Ruiz-Matute *et al.*, 2010).

### 1.1.1 Propiedades y aplicaciones de los IMOs

El mercado de los alimentos funcionales, y el de los ingredientes nutracéuticos, está en auge desde hace ya tiempo como resultado de la creciente demanda de productos naturales que ejerzan un impacto beneficioso para la salud del que los consume más allá de su valor puramente nutricional (Barreteau, Delattre y Michaud, 2006; Cencic y Chingwaru, 2010; Rolim, 2015). Con este fin, muchos tipos de oligosacáridos con propiedades beneficiosas para el consumidor (con propiedades bioactivas), como los fructooligosacáridos, xilooligosacáridos, galactooligosacáridos e isomaltoligosacáridos, entre otros, son producidos industrialmente ya sea extrayéndolos de un variadísimo tipo de fuentes naturales y/o aplicando protocolos de síntesis enzimática (Meyer *et al.*, 2015). Gran parte de las propiedades beneficiosas que se atribuyen a estos azúcares están relacionadas con su efecto prebiótico, el papel que ejercen sobre la microbiota de los individuos. Los microorganismos que nos colonizan se concentran sobre todo en nuestro tracto gastro intestinal, y la composición de la microbiota influye tanto en el estado general de nuestra salud como en el desarrollo de enfermedades como la diabetes, obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer, entre otras (B. Wang *et al.*, 2017; Kitai y Tang, 2017; Rinninella *et al.*, 2019).

La definición de prebiótico ha sido revisada ya varias veces desde que este término fue acuñado por Gibson y Roberfroid (1995) hasta la actualidad. Inicialmente se consideraba prebiótico cualquier ingrediente alimenticio no digerible que favorecía selectivamente el crecimiento o el metabolismo de los microorganismos intestinales que ejercían un efecto beneficioso para la salud humana. Hoy es "cualquier sustrato que es selectivamente utilizado por los microorganismos del hospedador confiriéndole un beneficio para la salud" (Gibson *et al.*, 2017). Esta nueva definición amplía el tipo de sustancias consideradas como prebióticas y las partes del cuerpo a las que afectaría, además contempla el uso de estas moléculas en sectores distintos del alimentario e incluso el uso en animales. La definición anterior que requería que fueran ingredientes alimentarios no digeribles dejaba fuera a los IMOs por ser parcialmente digeribles y por tanto parcialmente prebióticos (Rastall, 2010). La digestibilidad de los distintos IMOs varía según su tamaño y el tipo de enlace que une las unidades constituyentes de estas moléculas. Curiosamente, en experimentos realizados *in vitro* con enzimas intestinales de rata, se observó que la digestibilidad de la panosa fue mayor que la que tenían otros IMOs más pequeños como la isomaltosa, la kojibiosa y la trehalosa, (pero no nigerosa), o de otros IMOs de mayor tamaño formados únicamente por enlaces  $\alpha$ 1-6 (Hu,

Winter y Gänzle, 2020). Además, la hidrólisis de isomaltosa y trehalosa resultó ser solo un 24 y un 13%, de la de maltosa, respectivamente (Lee *et al.*, 2016), reiterando que el tipo de enlace que sustenta su estructura tiene mayor importancia que el tamaño de los IMOS en cuanto a su resistencia a la digestión e hidrólisis.

La ingesta de IMOs se ha relacionado con distintos tipos de efectos beneficiosos para la salud, la mayoría de ellos se recopilan en la Figura 1.2. Para comprobar la eficacia que tienen los IMOs como prebióticos se han realizado distintos tipos de estudios.



**Figura 1.2 Efectos de IMOs sobre la salud.** Efectos evidenciados por ensayos realizados con sistemas *in vitro* (\*), animales (#) y seres humanos (°). Adaptado de Sorndech *et al.* (2018).

Aunque la composición inicial de la comunidad microbiana del tracto intestinal influye notablemente en el efecto prebiótico que ejercen los IMOs, y de una forma más notoria al usar oligosacáridos con mayor grado de polimerización, en todos los casos analizados estos azúcares aumentaron la proliferación de *Bifidobacterium* (Wu *et al.*, 2017). En este contexto, los cultivos microbianos realizados a partir de heces de ancianos mostraron un claro incremento en la población de *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus fermentum* tras la ingesta de IMOs, solos o en combinación con estas mismas bacterias (Likotrafiti *et al.*, 2014). La ingesta de IMOs, al menos 10 g de disacáridos o de 5 g de trisacáridos por día consiguió aumentar la cantidad y el porcentaje de bifidobacterias presente en las heces de adultos jóvenes (Kaneko *et al.*, 1994). Además consiguió aliviar el estreñimiento en ancianos, lo que coincidió con un aumento de su población de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* así como la

reducción de *Clostridium* en heces (Yen *et al.*, 2011). También está descrito que tras la ingesta de IMO se aumentan la cantidad de ácidos grasos de cadena corta y se mejoran los niveles de colesterol sanguíneos. En las personas sometidas a hemodiálisis, que suelen padecer estreñimiento crónico e hiperlipemia, la toma de IMO alivió el estreñimiento pero también disminuyó los niveles de colesterol y triglicéridos sanguíneos, en un 18%, y aumentó los niveles de colesterol HDL (High Density Lipoprotein) en un 39% (Wang *et al.*, 2001). Los IMO se presentan también como un potencial tratamiento para paliar la sintomatología asociada con el colon irritable ya que en ratas lograron atenuar el daño del epitelio intestinal (W. Wang *et al.*, 2017).

Los IMO incrementan también la respuesta glicémica en humanos, produciendo su ingesta niveles de insulina comparables a los de la glucosa pero con unos niveles del monosacárido en sangre dentro de la normalidad (Grubic *et al.*, 2019; Subhan *et al.*, 2020). Experimentos realizados con ratas diabéticas han demostrado también que la ingesta de IMO produce una mejora en los niveles de glucosa en sangre y orina, a la vez que reducen los de colesterol y creatinina, además de aumentar la población de *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* (Bharti *et al.*, 2015). Estos efectos se incrementaron cuando los IMO se usaron en combinación con fructooligosacáridos.

Las principales aplicaciones industriales de IMO están sin duda directamente relacionadas con la industria alimentaria, sobre todo se usan estas moléculas como aditivos alimentarios que pueden sustituir total o parcialmente los jarabes de azúcar líquido. Además, son buenos humectantes de baja viscosidad pero con gran capacidad de retención de humedad (Goffin *et al.*, 2011). Por lo general, los IMO tienen la mitad del poder edulcorante de la sacarosa y puede añadirse a productos, como la cerveza, para regular el sabor en boca. La sustitución de la sacarosa por IMO, parcial o totalmente en la preparación del bizcocho de Victoria (Victoria *Sponge cake*) mejoró sus propiedades físico-químicas, microbiológicas y sensoriales (Lee, Wang y Lin, 2008).

Los IMO también han mostrado buenos resultados al ser utilizados en la industria ganadera. Así, la incorporación de estos oligosacáridos en la alimentación de gallinas aumentó la cantidad de bifidobacterias fecales y disminuyó la de *Salmonella enterica serovar typhimurium* que habían sido previamente inoculadas en estas aves (Thitaram *et al.*, 2005). Además, su incorporación en la dieta del ganado porcino durante el periodo perinatal moduló la microbiota de los animales, aumentó la cantidad de inmunoglobulinas en el calostro y disminuyó la tasa de diarrea en los lechones (Zhang *et al.*, 2021).

Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios que se han realizado sobre las propiedades beneficiosas de los IMO, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sigue sin

considerarlos azúcares prebióticos, a diferencia de la autoridad japonesa FOSHU (Alimentos para Uso Específico en la Salud, por sus siglas en inglés), lo que hace que su mercado sea notoriamente superior en el sudeste asiático (Goffin *et al.*, 2011).

### 1.1.2 Producción de IMOs

Aunque los IMOs están presentes en muy pequeñas cantidades en numerosas fuentes naturales, su extracción a gran escala resulta económicamente inviable. La producción industrial de IMOs se suele realizar partiendo de almidón y empleando distintos tipos de enzimas. Las enzimas generalmente utilizadas son glicosil hidrolasas que además de catalizar la hidrólisis de azúcares (en este caso oligo- o polisacáridos formados por glucosas unidas por enlaces  $\alpha$ -glucosídicos) son capaces de transferir unidades de glucosa (no activadas) para formar distintos tipos de IMOs en condiciones saturantes de sustrato. Primero el polisacárido se licua con una actividad  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus stearothermophilus* (EC 3.2.1.1), luego se utiliza una enzima maltogénica, como una  $\alpha$ - o  $\beta$ -amilasa fúngica (EC 3.2.1.2), para la sacarificación y una enzima desramificante, como una pululanasa (EC 3.2.1.41), para obtener una solución rica en maltosa y finalmente con una  $\alpha$ -transglucosidasa, por lo general de *Aspergillus sp.*, se sintetizan los IMOs (Goffin *et al.*, 2011).

Se han realizado ya muchos estudios para mejorar la síntesis de IMOs, en ellos se han empleado distintos tipos de enzimas, individualmente o en combinación, y utilizado distintos sustratos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Algunos ejemplos de sustratos y enzimas utilizadas en la formación de IMOs

| Enzima   | Sustrato | Productos principales               | Referencia   |
|--|----------|-------------------------------------|--|
| $\alpha$ -Glucosidasa  | Maltosa  | Panosa                              | Gutiérrez-Alonso <i>et al.</i> (2016)  |
|  | Maltosa  | Panosa, isomaltosa e isomaltotriosa | Okuyama <i>et al.</i> (2017), Song <i>et al.</i> (2013), Kumar y Mutturi (2020), Kawano <i>et al.</i> (2019) |
| Amilasa multifuncional   | Almidón  | Isomaltotriosa e isomaltotetraosa   | Cao <i>et al.</i> (2014)   |
| Cicloisomaltooligosacárido glucanotransferasa                                | Dextrano | Cicloisomaltooligosacáridos         | Fujimoto <i>et al.</i> (2017)  |
| <b>Combinación de enzimas</b>  |          |                                     |  |
| $\alpha$ -Amilasa, $\beta$ -amilasa y $\alpha$ -transglucosidasa             | Harina   | Isomaltotriosa e isomaltotetraosa   | Chockchaisawasdee y Poosaran (2013)  |
| $\alpha$ -Amilasa y $\alpha$ -glucosidasa                                    | Almidón  | Panosa e isomaltosa                 | Basu <i>et al.</i> (2016)  |
| $\alpha$ -Glucanotransferasa y $\alpha$ -amilasa maltogénica                 | Almidón  | Isomaltotriosa e isomaltotetraosa   | Lee <i>et al.</i> (2002)   |
| Pululanasa, $\alpha$ -amilasa, $\beta$ -amilasa y $\alpha$ -transglucosidasa | Almidón  | Panosa, isomaltosa e isomaltotriosa | Niu <i>et al.</i> (2017)   |



Destacar que en todas las reacciones de transglucosilación que se han utilizado para generar IMOs se generaron productos no deseables para el consumo del producto final formado, por lo general glucosa y en ocasiones maltosa u otros azúcares que contienen únicamente enlaces  $\alpha$ 1-4. Una de las maneras más sencillas para eliminar estos compuestos es utilizar las mezclas de IMOs producidos como sustrato de cultivos microbianos, principalmente de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Yoon, Mukerjea y Robyt, 2003) que los utilicen en estrategias fermentativas. En este contexto, la harina de plátano fue utilizada para la producción de IMOs utilizando tres pasos básicos: (i) licuefacción, utilizando una  $\alpha$ -amilasa; (ii) sacarificación, usando una  $\beta$ -amilasa; y (iii) transglucosilación, utilizando una  $\alpha$ -transglucosidasa (Chockchaisawasdee y Poosaran, 2013), pero en realidad a este protocolo se le adicionó un paso adicional en el que finalmente la glucosa y maltosa se retiró de la reacción por fermentación utilizando la levadura panadera, tras lo que se obtuvo un producto formado mayoritariamente por isomaltotriosa, en un 53% (43 g L<sup>-1</sup>), seguido de isomaltotetraosa, un 21% (27 g L<sup>-1</sup>) y un resto de maltooligosacáridos con un grado de polimerización de 7 o superior. En otras ocasiones también se han utilizado simultáneamente varias enzimas para producir IMOs. Como ejemplo, la  $\alpha$ -glucanotransferasa de *Thermotoga maritima* y la  $\alpha$ -amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* ET1 que se utilizaron simultáneamente para mejorar en un 15% la producción de IMOs obtenida con estas mismas enzimas de forma secuencial, proceso en el que se habían obtenido 25 y 24 g L<sup>-1</sup> de isomaltotriosa e isomaltotetraosa, respectivamente (Lee *et al.*, 2002). También se han utilizado protocolos para la producción de IMOs en los que se utilizan distintos pasos que incluyen combinaciones enzimáticas. Así, la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* se utilizó exitosamente para la licuefacción de almidón de maíz, y posteriormente se añadieron la  $\beta$ -amilasa del salvado de centeno, la  $\alpha$ -transglucosidasa de *Aspergillus niger* y la pululanasa recombinante de *Bacillus naganoensis*, de tal manera que la sacarificación y la transglucosilación sucedían al mismo tiempo generándose panosa, isomaltosa e isomaltotriosa que en total suponían casi un 50% (p/p) del producto final (Niu *et al.*, 2017).

Además de los procesos multienzimáticos también es común el uso de una sola enzima para la producción de IMOs. Por ejemplo, para producir cicloisomaltooligosacáridos, que son IMOs formados por unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ 1-6 que forman un anillo, se usó la cicloisomaltooligosacárido glucanotransferasa de *Paenabacillus* sp. 598K que formó mayoritariamente una molécula constituida por 7 unidades de glucosa al usar dextrano como sustrato (Fujimoto *et al.*, 2017). Los IMOs lineales cortos, los más comunes, son sintetizados en su mayoría por enzimas  $\alpha$ -glucosidasas que usan como sustrato la maltosa (Tabla 1.1). Aunque también hay enzimas como la amilasa multifuncional que es capaz de producir mayoritariamente isomaltotriosa e isomaltotetraosa a partir de almidón (Cao *et al.*, 2014).

Las  $\alpha$ -glucosidasas son unas de las enzimas más utilizadas para sintetizar IMO, y por ello también unas de las más estudiadas. Por lo general las  $\alpha$ -glucosidasas por transferencia de glucosa producen panosa, isomaltosa e isomaltotriosa a partir de maltosa (Ma *et al.*, 2017; Kawano *et al.*, 2019, 2020; Kumar y Mutturi, 2020). La  $\alpha$ -glucosidasa de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, sin embargo produce mayoritariamente panosa siendo los otros IMO muy minoritarios (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2016). La mayoría de estas enzimas proceden de hongos filamentosos, sobre todo del género *Aspergillus*, aunque también se pueden encontrar  $\alpha$ -glucosidasas con gran capacidad de transglicosilación en bacterias y arqueas (Wang *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2011). La producción de IMO también se ha llevado a cabo utilizando células microbianas que expresan enzimas heterólogas, tal es el caso de la  $\alpha$ -glucosidasa de *A. niger* que fue expresada en *S. cerevisiae* y, ligada a la pared de la levadura, utilizada para producir este tipo de azúcares mediante un proceso sencillo que permitió la recuperación del biocatalizador y su reutilización, en cierta medida (Casa-Villegas, Marín-Navarro y Polaina, 2017). Sin embargo, y aunque preferentemente se utilice la vía enzimática para la síntesis de oligosacáridos bioactivos por su menor impacto ambiental, también se han producido IMO por síntesis química utilizando sales reutilizables como el bromuro de litio trihidrato en condiciones ácidas, donde se generaron un 69% de glucooligosacáridos de 2-9 unidades de glucosa con enlace  $\alpha/\beta$ 1-6 al usar hasta 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa (Li *et al.*, 2019).

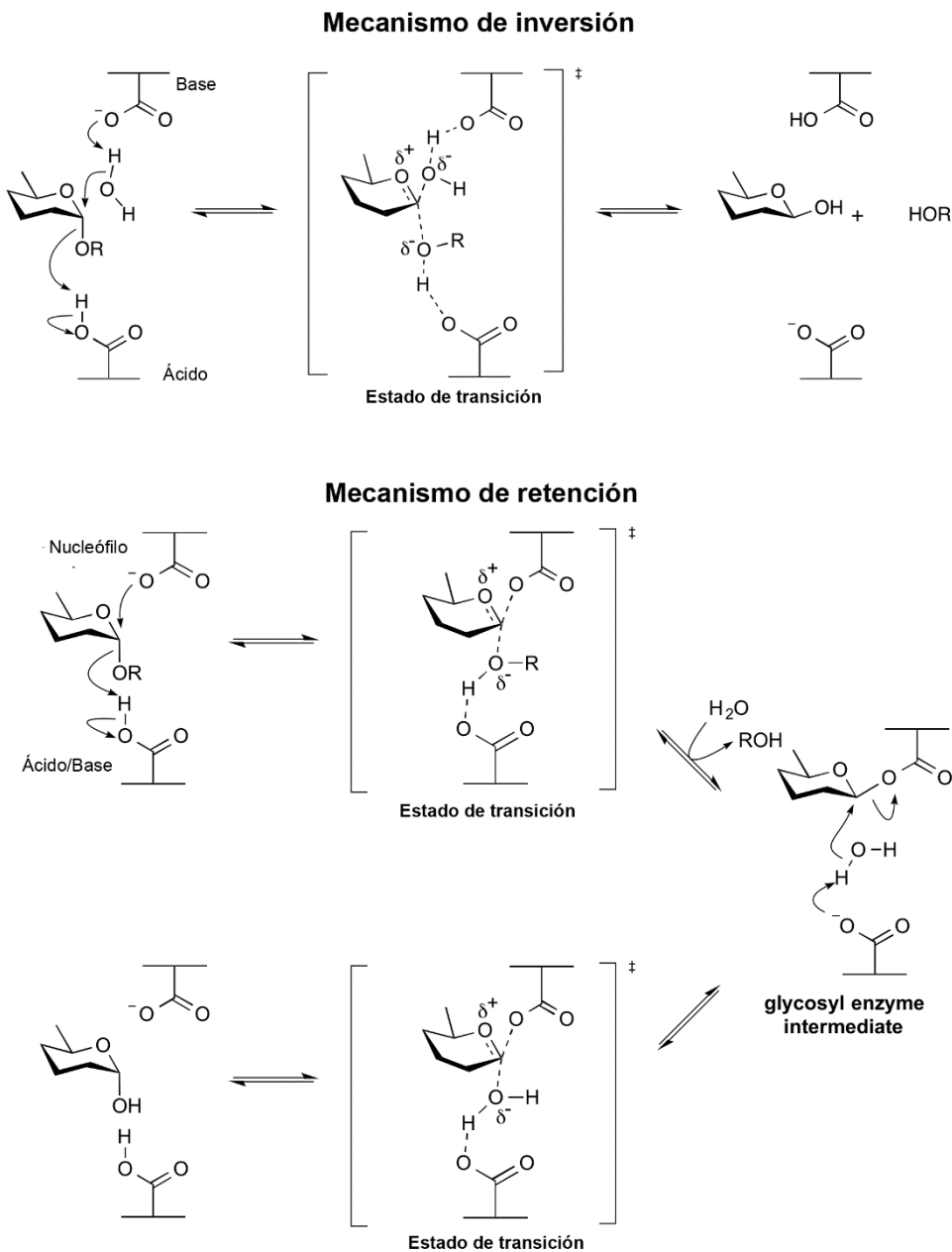
## 1.2 Las $\alpha$ -glucosidasas y su estructura

Las enzimas activas sobre carbohidratos se clasifican en 5 grandes clases según la base de datos *Carbohydrate-Active Enzymes*; CAZy: Glicosil Hidrolasas (GHs), Glicosil Transferasas (GTs), Polisacárido Liasas (PLs), Carbohidrato Esterasas (CEs) y Actividades Auxiliares (AAs) y los módulos de unión a carbohidratos (CBMs). Estas se agrupan a su vez en distintos clanes y familias atendiendo a sus elementos estructurales y las características de sus dominios funcionales (Cantarel *et al.*, 2009; Lombard *et al.*, 2014). Como ejemplo, las GHs, que atendiendo a su actividad y según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) serían las EC 3.2.1, se clasifican en 171 familias estructurales, GH1-171, agrupadas en 18 clanes nombrados con letras de la A a la R (Henrissat, 1991).

Las GHs pueden hidrolizar siguiendo dos mecanismos catalíticos el de retención o el de inversión, que fueron descritos por primera vez por Koshland (1953) (Figura 1.3). Cada mecanismo suele ser común para todos los miembros de la misma familia GH. En ambos participan dos residuos catalíticos ácidos, Asp o Glu y tras la hidrólisis del enlace glicosídico el carbono anomérico del producto, el azúcar que se libera, retiene o invierte su configuración con respecto al sustrato del que procede. Mediante el mecanismo de inversión, la hidrólisis se

consigue en una sola etapa a través de un desplazamiento simple por la acción del agua, que es acomodada por el residuo que actúa como base y la formación del ion oxocarbenio por la acción del residuo que actúa como ácido.

El mecanismo de retención ocurre en dos etapas y en cada una de ellas se forma un ion oxocarbenio donde participan los mismos residuos que en el mecanismo de inversión salvo que uno actúa como nucleófilo y el otro como catalizador ácido/base. En la primera etapa el nucleófilo desplaza el aglicón para formar el intermediario glicosil-enzima, a la vez que el otro

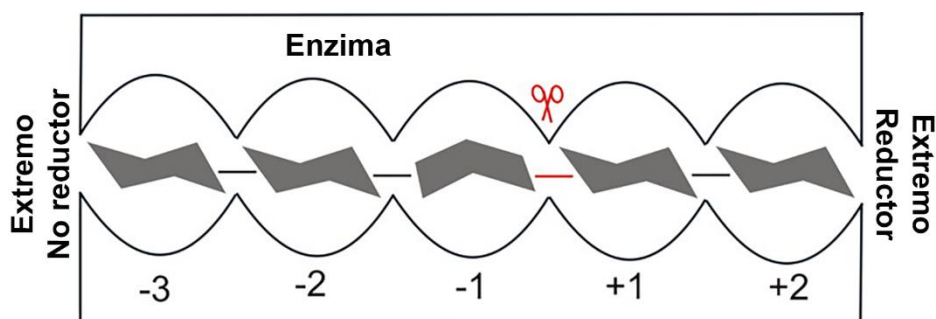


**Figura 1.3 Esquema de los mecanismos catalíticos de las GHs.** Se muestra entre corchetes el estado intermediario del ion oxocarbenio. En el mecanismo de retención otra molécula con un -OH puede actuar en lugar del agua y sintetizar productos glicosilados. Modificado de Withers y Williams (2013)

residuo actúa como un ácido sobre el oxígeno del enlace glicosídico para su rotura. En la segunda etapa la glicosil-enzima es hidrolizada por el agua con el otro residuo actuando esta vez como base para desprotonar el agua. Este mecanismo es el que tienen las enzimas con capacidad de transglicosilación, ya que, en las condiciones adecuadas, en lugar del agua otra molécula con grupo hidroxilo puede actuar como aceptor y glicosilarse liberando la enzima (Figura 1.3) (McCarter y Withers, 1996). La principal diferencia para que se dé uno u otro mecanismo es la distancia a la que se sitúan los residuos catalíticos, 10 y 5,5 Å en el mecanismo de inversión y retención, respectivamente (Davies y Henrissat, 1995).

Por eso, aunque muchas de las enzimas que sintetizan IMO en ocasiones son denominadas transferasas, estructuralmente no son GTs según CAZy (Lombard *et al.*, 2014), sino GHs que pueden transferir azúcares por presentar un mecanismo catalítico de retención que conlleva la transglicosilación del sustrato que hidroliza. Las GHs con actividad de transglicosilación se incluyen en las familias GH13, GH31, GH57, GH66 y GH70. Muchas de las  $\alpha$ -glucosidasas capaces de producir IMO pertenecen a la familia GH31.

Los subsitios de unión de carbohidratos a las GHs se nombran con la denominación clásica:  $-n/+n$ , siendo  $n$  un número entero y la hidrólisis del enlace glicosídico produciéndose entre los subsitios  $-1$  y  $+1$  (Figura 1.4) (Davies, Wilson y Henrissat, 1997).



**Figura 1.4** Esquema de los subsitios de unión de los carbohidratos en las glicosil hidrolasas. El azúcar adopta la conformación en silla relajada en todos los subsitios excepto en el -1 donde sufre una alteración. La hidrólisis se realiza en el sitio  $-1/+1$  que se indica en rojo con unas tijeras. Modificado de Ardèvol y Rovira (2015).

La mayoría de las  $\alpha$ -glucosidasas se incluyen en las familias GH13 y GH31, aunque en menor medida, también se encuentran en las familias GH4, 63, 97 y 122 (Lovering *et al.*, 2005; S. Wang *et al.*, 2017). La familia GH31, junto con las familias GH27 y GH36 se agrupan en el clan GH-D (Lombard *et al.*, 2014). Una de las enzimas más representativas de la familia GH31 es la  $\alpha$ -glucosidasa de *Beta vulgaris* (remolacha azucarera) (Tagami *et al.*, 2013). Esta enzima además está filogenéticamente relacionada con las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales humanas, las

de hongos, como las del género *Aspergillus* sp. y las de levaduras como *Xanthophyllomyces dendrorhous* y *Schwanniomyces occidentalis* (entre otras), estando todas ellas consideradas como  $\alpha$ -1,4-glucosidasas (Gabriško, 2020).

Las enzimas de la familia GH31 contienen de 4 dominios estructurales: un  $\beta$ -sandwich N-terminal, un barril  $(\beta/\alpha)_8$  (el dominio catalítico), un C-terminal proximal (formado por tres láminas- $\beta$  antiparalelas y dos pequeñas  $\alpha$ -hélices) y un C-terminal distal formado por un  $\beta$ -sandwich (Figura 1.5). El centro activo, en forma de bolsillo, conformado por los *loop* que unen las  $\alpha$ -hélices con las láminas- $\beta$  del dominio catalítico y también por un largo *loop* que sobresale del dominio N-terminal, N-loop (Figura 1.5) (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2016). Este N-loop está presente en todas las  $\alpha$ -glucosidasas de la familia GH31, aunque su secuencia aminoacídica difiere en las distintas enzimas según reconozcan éstas sustratos de cadena larga o corta (Tagami *et al.*, 2013).

La estructura del bolsillo catalítico de los subsitios -1 y +1 son prácticamente idénticos en todas las  $\alpha$ -glucosidasas de la familia GH31, sobre todo el -1. Los residuos Asp catalíticos, que actúan como nucleófilo y catalizador ácido/base en la hidrólisis, se sitúan en los loops  $\beta$ - $\alpha$  4 y 6, respectivamente, además esta disposición está tan conservada que está presente en otras familias como la GH27 que se incluye también en el mismo clan (Ernst *et al.*, 2006;



**Figura 1.5 Estructura de la  $\alpha$ -glucosidasa de *Beta vulgaris* unida a acarbosa. A.** Estructura cristalográfica de la  $\alpha$ -glucosidasa (PDB:3w37). Se representa el dominio N-terminal en violeta, el dominio catalítico [barril  $(\beta/\alpha)_8$ ] en amarillo, el dominio C-terminal proximal en azul, el dominio C-terminal distal en verde y el N-loop en rojo. Los residuos catalíticos se muestran en barras azul cian.

Okuyama *et al.*, 2006). El Asp nucleófilo de estas  $\alpha$ -glucosidasas está incluido en la secuencia altamente conservada G/F/Y(L/I/V/M/F)W $\underline{X}$ D $\underline{M}$ (N/S/A)E, y el Asp ácido/base normalmente en la secuencia W(T/L/G/S)G $\underline{D}$ N-(A/S)-W (Sim *et al.*, 2008, 2010; Gericke *et al.*, 2017). La gran similitud de los residuos que conforman el subsitio -1 se debe a que siempre acomodan una unidad de glucosa (extremo no reductor del azúcar que hidrolizan), mientras que el subsitio +1 presenta algo más de variabilidad, lo que modifica en cierta medida la especificidad de la enzima por el sustrato sobre el que actúa. El dominio N-terminal de la maltasa glucoamilasa (NtMGAM) humana presenta una arquitectura del subsitio +1 bastante abierta, formada por residuos relativamente pequeños (Y299, A576, T205 y T204), mientras que el de la sacarasa isomaltasa (NtSI) presenta uno más estrecho formado por residuos más grandes (W327, V605, L233 y Q232), razón por la que puede hidrolizar los enlaces  $\alpha$ 1-6 de la isomaltosa (Sim *et al.*, 2010). El residuo W327 parece ser importante en conferir la especificidad  $\alpha$ 1-6 puesto que los otros dominios NtMGAM, CtMGAM y CtSI presentan una Tyr (Sim *et al.*, 2008). Más aún este residuo es importante en la especificidad de la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. occidentalis*, donde su mutación W324Y provoca la disminución de la eficacia catalítica de la enzima sobre isomaltosa. Sin embargo, la especificidad de la actividad transferasa de la enzima también se modificó con esta sustitución, dando lugar a la formación de un nuevo trisacárido, la centosa, mediante la generación de un enlace  $\alpha$ 2-4 (Song *et al.*, 2013). La posición N674 de la  $\alpha$ -glucosidasa de *Aspergillus niger* está implicada en la interacción con el subsitio +1 y +2, ya que, su mutación por Phe disminuyó su eficacia catalítica por maltosa e isomaltosa, pero la incrementó por maltotriosa (Ma *et al.*, 2017). Además el residuo correspondiente en la CtMGAM es la Phe1560 y en la estructura cristalográfica de la proteína está rodeado por 3 anillos de la acarbosa (un oligosacárido inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasas que se usa en el tratamiento de la diabetes), permitiendo que el compuesto se asocie con los subsitios ya mencionados (Ren *et al.*, 2011). Es necesario indicar que, a pesar de haberse realizado estos estudios, a día de hoy hay pocas estructuras resueltas de  $\alpha$ -glucosidasas de la familia GH31 por lo que los datos disponibles que relacionan estructura-especificidad de este tipo de enzimas son aún escasos.

### 1.3 Transglucosilación de aceptores

Las GHs, con mecanismo catalítico de retención, no sólo son capaces de transferir unidades glicosídicas tanto al sustrato sobre el que actúan como a sus productos, sino que algunas de ellas también pueden transferirlas a otras moléculas que actúan como aceptores de glicosilación alternativos.

La glucosilación se persigue muchas veces con el fin de mejorar y/o conceder nuevas propiedades a los aceptores alternativos, pero también puede utilizarse con otros objetivos.

Algunos tipos de oligosacáridos biológicamente activos son difíciles de sintetizar, o su presencia es escasa en fuentes naturales. Por ejemplo, la teanderosa, un trisacárido con potenciales propiedades prebióticas, formado por una sacarosa glucosilada, a través de un enlace  $\alpha$ 1-6, en la unidad de glucosa, está presente en la miel de abeja (también en el azúcar de caña) en concentraciones muy bajas. (Morel Du Boil, 1996; Luz Sanz *et al.*, 2005; Ruiz-Matute *et al.*, 2010). La síntesis enzimática de teanderosa ya se ha conseguido por transferencia, utilizando una levansacarasa de *Bacillus subtilis* con sacarosa como sustrato y la isomaltosa como aceptor. Con esta estrategia se consiguió una concentración del trisacárido de casi 150 g L<sup>-1</sup> (Ruiz-Aceituno *et al.*, 2017). En otro estudio la sacarosa fue la que se utilizó como aceptor y la maltotriosa como sustrato para la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus*. En esta ocasión se formaron dos nuevos tetrasacáridos, maltosil-sacarosa con enlace  $\alpha$ 1-6 a la unidad de glucosa o a la de fructosa (Lee *et al.*, 2003).

La glucosilación de ciertos compuestos también se realiza con el objetivo de aumentar su estabilidad química y física. Así, la glucosilación del ácido ascórbico (vitamina C), que es altamente inestable en condiciones oxidativas y térmicas, se realizó con éxito utilizando la  $\alpha$ -glucosidasa de *Aspergillus niger*, que produjo el ácido 2-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-L-ascórbico, un compuesto mucho más estable que mantiene la capacidad antioxidante de la vitamina C (Li *et al.*, 2017). Otra de las aplicaciones de mayor interés es la glicosilación de compuestos biológicamente activos pero poco o nada miscibles en soluciones acuosas, como es el caso de los polifenoles u otras sustancias que tengan uno o varios grupos aromáticos, lo que hace que sean moléculas muy poco biodisponibles (Serra *et al.*, 2010). Los polifenoles tienen capacidad de retrasar la aparición de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, cáncer, enfermedad inflamatoria crónica, aterosclerosis o infartos de miocardio debido principalmente por su gran capacidad antioxidante (Rizvi, 2012; Costa *et al.*, 2017). La glucosilación de polifenoles lograría aumentar su solubilidad, biodisponibilidad e incluso su estabilidad, así como su resistencia al paso por el tracto digestivo.

Las ciclodextrin glucanotransferasas (CGTasas) han demostrado ser unas enzimas muy eficientes en la glucosilación de polifenoles. La CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. fue capaz de glucosilar el epigalocatequin galato (EGCG), y utilizando almidón soluble como sustrato se obtuvieron dos productos, el mayoritario fue epigalocatequin galato 3'-O- $\alpha$ -D-glucopiranosido (Gonzalez-Alfonso *et al.*, 2018). El EGCG se encuentra mayoritariamente en el té verde y es un polifenol al que se le otorgan propiedades como disminución de la presión sanguínea, prevención del síndrome metabólico, disminución del colesterol en sangre y de la grasa corporal, etc (Legeay *et al.*, 2015; Bartosikova y Necas, 2018). Existen múltiples ejemplos más de reacciones de transglicosilación mediadas por CGTasas de distinto origen

en los que se utilizaron distintos dadores de unidades azucaradas y compuestos fenólicos como aceptores (piceido, naringina, quercetina, catequina, etc.) (Lim *et al.*, 2021).

Aunque no todas las  $\alpha$ -glucosidasas son capaces de glucosilar polifenoles y otros compuestos aromáticos, sí que hay algunos ejemplos de enzimas que muestran esta capacidad. A modo de ejemplos, el gingerol se encuentra en el jengibre fresco y tiene una gran capacidad antioxidante, antitumoral y antiinflamatoria (Mohd Yusof, 2016). Sin embargo, su solubilidad en agua es de tan solo  $0,18 \text{ g L}^{-1}$ . La  $\alpha$ -glucosidasa de *Halmonas* sp. fue capaz de glucosilar el gingerol y producir 5- $\alpha$ -Glc-gingerol, un compuesto soluble en agua, que además aumento su estabilidad frente al calor y las condiciones acídicas (Ojima *et al.*, 2012). La arbutina un glicósido usado principalmente en cosmética, conocido también por sus propiedades antibacterianas (sobre todo en el tratamiento de infecciones del tracto urinario), antiinflamatorias, antitumorales y antioxidantes (Migas y Krauze-Baranowska, 2015) muestra baja estabilidad en soluciones acuosas y se hidroliza parcialmente dando lugar a hidroquinona. La glucosilación de arbutina se logró con la  $\alpha$ -glucosidasa de *Thermoplasma acidophilum*, lo que probablemente aumente su estabilidad y solubilidad (Seo *et al.*, 2011). Algunas  $\alpha$ -glucosidasas poseen también un amplio espectro de glucosilación de compuestos fenólicos, como la  $\alpha$ -glucosidasa de *Xanthomonas campestris* que es capaz de glucosilar el fenol, la vainillina y la etil vainillina usando la maltosa como sustrato (Chen *et al.*, 2019).

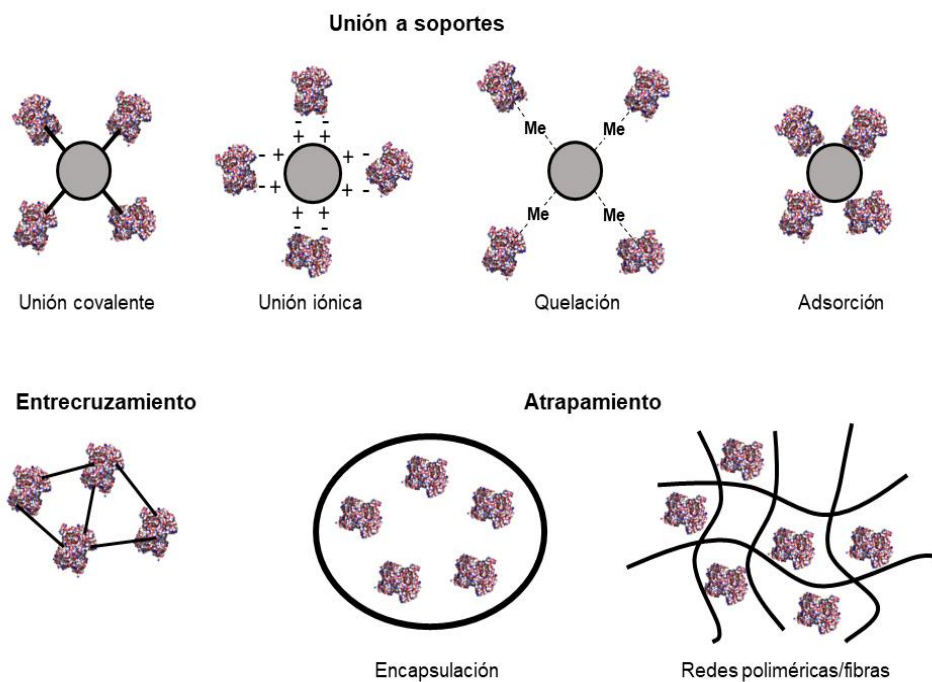
## 1.4 Inmovilización enzimática

Desde un punto de vista biotecnológico, la producción de IMO y productos glucosilados a gran escala debe realizarse siempre de la forma más rentable posible, lo que hace de la inmovilización enzimática una estrategia muy utilizada por permitir la reutilización del biocatalizador y facilitar su separación de los productos de la reacción. Además, en muchas ocasiones con esta estrategia se logra mejorar la estabilidad del biocatalizador. Con la inmovilización se pretende el confinamiento de la enzima en un espacio concreto de manera que esta pueda ser reutilizada repetida y continuamente (Katchalski-Katzir y Kraemer, 2000). Los métodos de inmovilización desarrollados más utilizados son los basados en la unión de la enzima a un variado tipo de soportes mediante unión covalente, iónica, adsorción o quelación; el entrecruzamiento entre las enzimas o células a inmovilizar; y el atrapamiento que puede realizarse mediante encapsulación, redes poliméricas o fibras (Figura 1.6) (Sirisha, Jain y Jain, 2016).

Debido a la gran consciencia social que existe en la actualidad sobre el impacto medio ambiental que causa la sociedad de consumo, se ha generado una tendencia social hacia la producción y consumo de materiales sostenibles, lo que además está promovido por políticas europeas como el Pacto Verde Europeo (*European Green Deal*). Por ello el uso de materiales



reciclables o de fuentes naturales renovables en los procesos de inmovilización enzimática es lo más deseable. En este contexto, la quitina es el segundo polímero natural más importante en la naturaleza, después de la celulosa, y el primero de origen marino. Este largo polisacárido lineal, e insoluble en soluciones acuosas, está formado principalmente de unidades de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidas entre sí por enlaces  $\beta$ 1-4. Por desacetilación de quitina se produce quitosano, el único polisacárido natural que contiene unidades de D-glucosamina y N-acetil-glucosamina, lo que lo hace ser mucho más soluble que la quitina. La quitina se obtiene generalmente del exoesqueleto de crustáceos marinos, como son las gambas y los cangrejos (Rinaudo, 2006). Tanto la quitina como su derivado desacetilado tienen múltiples aplicaciones en biotecnología por sus propiedades antimicrobianas, analgésicas y antioxidantes, además de por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, bajo coste y por actuar como potenciadores de la adhesión, entre otras (Aranaz *et al.*, 2009). La quitina y el quitosano también son usados para producir distintos tipos de polímeros que tienen multitud de



**Figura 1.6** Esquema de los métodos de inmovilización enzimática y celular más generales.

aplicaciones, por ello no es de extrañar que también se haya estudiado su utilización como soporte en las inmovilizaciones enzimáticas y celulares (Verma *et al.*, 2020). El quitosano, por sus características y mayor solubilidad, se ha empleado mucho más que la quitina para crear distintos soportes de inmovilización. Se ha usado también, en combinación con otros materiales o sólo, en una gran variedad de protocolos para la inmovilización enzimática. En este contexto, la  $\alpha$ -glucosidasa de *Aspergillus niger* fue inmovilizada con éxito mediante

encapsulación en alginato-quitosano-fosfato cálcico, lo que logró incrementar la actividad de la enzima en un mayor rango de pH y temperatura, además de mejorar su estabilidad operacional y de almacenaje (Zhang *et al.*, 2009).

El quitosano tiene también múltiples grupos funcionales, por lo que es utilizado muy frecuentemente en procesos de inmovilización mediante unión covalente en el que se emplean distintos tipos de *linkers*. Entre ellos, el más utilizado, por sus propiedades reactivas en condiciones moderadas, es el glutaraldehído (GA), molécula que puede reaccionar con los grupos amino de las proteínas para formar bases Schiff, tanto en condiciones acídicas como neutras. Estas uniones no suelen ser muy estables y revierten a los grupos aldehído y amino (Migneault *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2014). Por ello, en muchos protocolos de inmovilización se recomienda el uso de NaBH<sub>4</sub> o NaBCNH<sub>3</sub> para estabilizar la base de Schiff por medio de una reducción del grupo amino a la correspondiente amina secundaria. Sin embargo, algunos estudios sugieren también que con estos agentes reductores tampoco se incrementa drásticamente la estabilidad de la enzima inmovilizada (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1995). Lo que sí que se ha aceptado de una forma general es que en condiciones moderadas la formación de la base de Schiff tiene lugar principalmente con el N-terminal de las proteínas.

La concentración de GA, el tiempo y la temperatura de activación del soporte, así como la cantidad de enzima y el tiempo en el que ésta se incubó con el soporte ya activado son factores que afectan notablemente al rendimiento de las inmovilizaciones. Así, la inmovilización de la  $\alpha$ -glucosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* sobre microesferas magnéticas de quitosano se optimizó tras valorar todos estos factores mencionados, tras lo que se consiguió un 65 % de actividad recuperada (Chen *et al.*, 2018). El quitosano también se ha usado para modificar las características de otros tipos de soportes, como el papel de filtro de celulosa que también fue activado con GA. Con esta estrategia, se inmovilizó exitosamente una  $\alpha$ -glucosidasa de *Aspergillus niger* que mejoró su estabilidad química y física. Además, se utilizó un soporte económico y respetuoso con el medio ambiente (Liu, Chen y Shi, 2019).

Por su baja toxicidad, la genipina (GP) es un reactivo que está ganando gran popularidad como agente entrecruzador en los protocolos de inmovilización. Generalmente se usa GP para producir materiales basados en quitosano que son estabilizados por entrecruzamiento, y en la inmovilización enzimática por unión covalente (Tacias-Pascacio *et al.*, 2019). Hasta dónde llega nuestro conocimiento, no se han realizado inmovilizaciones de  $\alpha$ -glucosidasas, o de ninguna otra enzima relacionada con la síntesis de IMOs, usando GP como linker. Aunque sí que hay ejemplos publicados con otras GHs, como la xilanasa de *Thermomyces lanuginosus*, que fue inmovilizada sobre partículas magnéticas de quitosano mediante unión

covalente con GP, aumentando la actividad a distintos valores de pH y temperatura así como su velocidad catalítica en relación con la enzima libre (Gracida *et al.*, 2019). También una  $\beta$ -glucosidasa comercial fue inmovilizada sobre *chitosan beads* (bolas de quitosano) usando GP, consiguiendo con ello una gran estabilidad física, química, operacional y de almacenaje del biocatalizador, que fue utilizado en la producción de genisteína, un fitoestrógeno isoflavonoide (Phadungcharoen *et al.*, 2019). En el caso de las inmovilizaciones que implican reacciones de transglicosilación, la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* se inmovilizó sobre partículas de quitosano empleando GP o GA. La GP dio mejores resultados ya que con este linker se consiguió aumentar la estabilidad térmica y operacional del biocatalizador y se obtuvo un rendimiento del 30% en la producción de galactooligosacáridos (Klein *et al.*, 2016).

## 1.5 *Schwanniomyces occidentalis* organismo de interés biotecnológico

*Schwanniomyces occidentalis* es una levadura ascomiceta descrita por primera vez en 1909 por Kloecker, quien la aisló en la isla de Santo Tomás (Islas Vírgenes), en las Indias Occidentales, de ahí el nombre que se le dio a esta especie (Dohmen y Hollenberg, 1996). La levadura es *crabtree* negativa y tiene un fuerte efecto Pasteur, es decir presenta metabolismo oxidativo incluso con altas concentraciones de sustrato y muy poca capacidad fermentativa en condiciones aerobias. *S. occidentalis* es conocida por los genes de su sistema amilolítico, que han sido incluidos por transformación en *Saccharomyces cerevisiae* para su aplicación en fermentaciones encaminadas a la producción de cerveza y la elaboración de panes (Hollenberg y Strasser, 1990). Esta levadura también ha sido estudiada como sistema de expresión de genes exógenos con relativo éxito, aunque su uso de codones alternativo, donde el triplete CUG dirige la incorporación de Ser en lugar de Leu, y que provocaría cambios en la secuencia proteica de las proteínas heterólogas expresadas, descartó su uso para este fin (Piontek *et al.*, 1998; Álvaro-Benito *et al.*, 2010, 2013). Algunos de los genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos de esta levadura han sido ya también ampliamente estudiados. Su actividad  $\beta$ -fructofuranosidasa ha sido analizada exhaustivamente por la capacidad que tiene para sintetizar los fructooligosacáridos 6-kestosa (el producto mayoritario) y 1-kestosa, ambos por transfructosilación de sacarosa (Álvaro-Benito *et al.*, 2012; De Abreu *et al.*, 2013; Piedrabuena *et al.*, 2016; Rodrigo-Frutos *et al.*, 2019). Enzimas relacionadas con su sistema amilolítico, como la amilasa SWA2 (Abarca *et al.*, 1991; Yáñez *et al.*, 1998) también fueron analizadas y caracterizadas previamente. El gen de la glucoamilasa *GAM1* también fue previamente aislado y estudiado, aunque posteriormente se demostró que codificaba una actividad  $\alpha$ -glucosidasa (Dohmen *et al.*, 1990; Hulseweh *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2005). Esta  $\alpha$ -glucosidasa fue capaz de producir IMOs principalmente

isomaltosa, panosa e isomaltotriosa a partir de maltosa (no se valoraron las cantidades producidas), y por mutagénesis dirigida se logró generar una variante de esta proteína que producía un trisacárido nuevo la centosa a unas concentraciones de 16mM partiendo de 200 mM de maltosa (Song *et al.*, 2013).

# OBJETIVOS

## 2 OBJETIVOS

Los carbohidratos constituyen el material biológico más abundante en la naturaleza. Entre las enzimas activas sobre carbohidratos, las glicosil hidrolasas (GH) catalizan la hidrólisis de di-, oligo- y polisacáridos, pero además para muchas de ellas, la formación de un nuevo enlace glicosídico y su hidrólisis son dos variantes del mismo proceso catalítico. Algunas GH pueden transferir un resto glicosilo de un azúcar a otro carbohidrato, o incluso transferirlo a un aceptor no glicosídico. Dualidad que les confiere un enorme potencial biotecnológico para la síntesis de nuevas moléculas.

El trabajo aquí realizado se centra en el estudio de una actividad  $\alpha$ -glucosidasa de la levadura *Schwanniomyces occidentalis* (GAM1), una enzima en principio capaz de sintetizar oligosacáridos de interés industrial, y concretamente isomaltooligosacáridos (IMOs).

Los objetivos que nos propusimos al inicio del trabajo fueron los siguientes:

- La expresión heteróloga del gen responsable de la actividad GAM1 en *Pichia pastoris* y la purificación de la enzima heteróloga.
- La caracterización de las propiedades bioquímicas y cinéticas de la enzima producida y el análisis de su capacidad transferasa, tanto para la formación de IMOs como para la glicosilación de distintos tipos de aceptores.
- El estudio de los determinantes estructurales implicados en la especificidad de esta enzima. Para ello nos propusimos utilizar modelos estructurales de GAM1 obtenidos por homología con otras proteínas con sus estructuras 3D ya resueltas, la obtención de variantes proteicas en el bolsillo catalítico de la enzima por mutagénesis puntual, y evaluar la implicación que tenían estos cambios en la capacidad hidrolasa/transferasa de la enzima.
- La inmovilización de la enzima a soporte de quitosano, y el análisis de la actividad operacional del biocatalizador formado.

**MATERIALES**

**Y**

**MÉTODOS**

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Azúcares y reactivos

Los productos químicos usados en las disoluciones de este trabajo fueron disueltos en agua destilada o bidestilada a través del sistema Milli-Q-Plus (Millipore).

El origen de los azúcares utilizados en el desarrollo de esta tesis se recopila en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1 Azúcares**

| Azúcar           | Estructura*   | Casa comercial |
|------------------|---|----------------|
| Glucosa          | $\alpha$ -D-Glc   | Merck          |
| Fructosa         | $\beta$ -D-Fru  | Merck          |
| Galactosa        | $\alpha$ -D-Gal   | Sigma-Aldrich  |
| Xilosa           | D-Xil   | Merck          |
| Maltosa          | $\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glc                 | Sigma-Aldrich  |
| Isomaltosa       | $\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-Glc                 | TCl chemicals  |
| Kojibiosa        | $\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Glc                 | Carbosynth     |
| Nigerosa         | $\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Glc                 | Carbosynth     |
| Trehalosa        | $\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-Glc                 | Sigma-Aldrich  |
| Sacarosa         | $\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Fru                  | Merck          |
| Isomaltotriosa   | $[\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ 6)] <sub>2</sub> - $\alpha$ -D-Glc | TCl chemicals  |
| Isomaltotetraosa | $[\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ 6)] <sub>3</sub> - $\alpha$ -D-Glc | TCl chemicals  |
| Lactosa          | $\beta$ -D-Gal(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glc                  | Sigma-Aldrich  |
| Maltotriosa      | $[\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ 4)] <sub>2</sub> - $\alpha$ -D-Glc | Sigma-Aldrich  |
| Maltotetraosa    | $[\alpha$ -D-Glc(1 $\rightarrow$ 4)] <sub>3</sub> - $\alpha$ -D-Glc | Sigma-Aldrich  |

\*Glc: glucosa; Fru: fructosa; Gal: galactosa.

El antibiótico ampicilina (Sigma-Aldrich) se disolvió en agua destilada a una concentración final de 100 mg mL<sup>-1</sup>, se esterilizó por filtración y conservó a -20°C.

La histidina (Sigma-Aldrich) y biotina (Merck) se disolvieron en agua destilada al 0,4 % y 0,02 % (p/v), respectivamente, y fueron esterilizadas por filtración. El sorbitol se preparó a una concentración de 1 M en agua destilada y se esterilizó por calor húmedo (1 atm 20 min). Estas disoluciones se conservaron a 4°C.

El bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) se preparó en agua a una concentración de 10 mg mL<sup>-1</sup>.

Para la elaboración del soporte de inmovilización se utilizó quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich) al 2 % (p/v) en una disolución de ácido acético al 2 % (p/v).



Los proveedores de los *kits* comerciales y demás productos utilizados en las distintas partes de este trabajo se detallan en las secciones de materiales y métodos donde fueron utilizados.

## 3.2 Disoluciones tampón

Para el análisis la actividad hidrolítica y de transglicosilación se utilizó acetato sódico 100 mM pH 4,5. Para la inmovilización a gran escala se usó fosfato potásico 50 mM pH 7. Este mismo tampón se usó también tanto en la preactivación del soporte como en la incubación de la enzima.

En los ensayos para valorar la actividad y la estabilidad enzimática, tanto de la enzima libre como de las inmovilizadas, frente a pH se empleó el tampón universal Britton-Robinson (Britton y Robinson, 1931). Se preparó una disolución de fosfórico, acético y bórico a una concentración de 40 mM y se ajustó a cada uno de los pH utilizados con una disolución de hidróxido de sodio 0,4 M.

Los medios de cultivo de *Pichia pastoris* se tamponaron con fosfato potásico 1 M pH 6 (concentración final en el cultivo de 100 mM).

## 3.3 Material biológico

### 3.3.1 Microorganismos

En este trabajo se utilizaron los siguientes microorganismos:

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (*r<sub>K</sub>*-, *m<sub>K</sub>*+), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ -, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*), facilitado por el Servicio de Fermentaciones del Centro de Biología Molecular Severo-Ochoa (CBMSO) en la obtención de construcciones plasmídicas.

*Pichia pastoris* GS115 (*his4*<sup>-</sup>) de Invitrogen, levadura metilótrofa y auxótrofa para histidina, en la que no se ha descrito la presencia de genes o enzimas con actividad  $\alpha$ -glucosidasa, se utilizó en la expresión de la  $\alpha$ -glucosidasa GAM1.

### 3.3.2 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se presentan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Plásmidos y constructos de este trabajo.

| Vector/<br>constructo | Tamaño<br>(kb) | Hospedador                 | Características                   | Referencia                   |
|-----------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| pSTBlue-1             | 3,9            | <i>E. coli</i>             | <i>AmpR</i> , <i>lacZα</i>        | Novagen                      |
| pIB2                  | 5,5            | <i>E. coli/P. pastoris</i> | <i>AmpR</i> , <i>HIS4</i> , pGAP  | (Sears <i>et al.</i> , 1998) |
| pIB4                  | 5,8            | <i>E. coli/P. pastoris</i> | <i>AmpR</i> , <i>HIS4</i> , pAOX1 | (Sears <i>et al.</i> , 1998) |
| GAM1.pSTBlue-1        | 6,7            | <i>E. coli</i>             | <i>AmpR</i> , <i>lacZα</i>        | Disponible en el grupo       |
| GAM1.pIB2             | 8,4            | <i>E. coli/P. pastoris</i> | <i>AmpR</i> , <i>HIS4</i> , pGAP  | Este trabajo                 |
| GAM1.pIB4             | 8,7            | <i>E. coli/P. pastoris</i> | <i>AmpR</i> , <i>HIS4</i> , pAOX1 | Este trabajo                 |

*AmpR*: resistencia a ampicilina; *lacZα*: fragmento de la β-galactosidasa *HIS4*: histidinol deshidrogenasa 4; pGAP: promotor de la gliceraldehído-3-P deshidrogenasa; pAOX1: promotor de la alcohol deshidrogenasa 1;

## 3.4 Cultivo y mantenimiento de microorganismos

### 3.4.1 Bacterias

Los cultivos bacterianos se realizaron y mantuvieron en medio Luria-Bertani (LB): bacto triptona 1 % (p/v; Pronadisa), extracto de levadura 0,5 % (p/v; Difco) y NaCl 1,0 % (p/v; Merck), a 37 °C y agitación constante de 250 rpm para medios líquidos. Los cultivos en medio sólido contenían 2,0 % (p/v) de agar bacteriológico (Pronadisa). Los transformantes se seleccionaron en LB con ampicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>) tanto en medio líquido como sólido. Se prepararon alícuotas de los cultivos en el mismo medio de selección añadiendo glicerol al 85 % (v/v; Merck) en una relación 1:1 (v/v) para su conservación a -70°C.

### 3.4.2 Levaduras

Los cultivos de *P. pastoris* se incubaron a 28-30°C, con una agitación orbital constante de 200 rpm en el caso de los medios líquidos. En la preparación de los medios sólidos se adicionó 2 % (p/v) de agar bacteriológico.

Los medios usados fueron los siguientes:

**Medio rico YEPD:** extracto de levadura 1 %, bacto peptona 1 % (Difco) y glucosa 2 %, todos en p/v.

**Medio mínimo dextrosa (MD):** YNB (bases nitrogenadas para levadura sin aminoácidos, Difco) 1,3 %, glucosa 2%, biotina 4 x 10<sup>-5</sup> % (Merck) todos en p/v.

**Medio mínimo almidón sorbitol (MMAS):** YNB 1,3 %, sorbitol 2 %, almidón 2 % (Sigma-Aldrich), biotina 4 x 10<sup>-5</sup> % (Merck), todos en p/v y adición de 0,5 % de metanol (v/v) una vez atemperado el medio para la inducción de la expresión de proteínas.

**Medio mínimo tamponado, con glicerol (BMG):** YNB 1,3 % (p/v), tampón fosfato potásico 100 mM pH 6 y glicerol 1 % (v/v; Merck). Los preinóculos usados para iniciar los cultivos en

fermentador contenían un 4 % (v/v) de glicerol.

**Medio mínimo tamponado, con glucosa (BMGlc):** misma composición que el anterior usando glucosa 1 % en lugar de glicerol.

**Medio mínimo tamponado, con metanol (BMM):** YNB 1,3 % (p/v), tampón fosfato potásico 100 mM pH 6 y metanol 0,5 % (v/v; Merck).

**Medio mínimo tamponado, con maltosa (BMMal):** YNB 1,3 % (p/v), tampón fosfato potásico 100 mM pH 6 y maltosa 10 % (p/v; Sigma-Aldrich).

**Medio de fermentación con sales (FBMS):** Por cada litro: 22,6 g de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ , Merck), 18,2 g de sulfato potásico ( $K_2SO_4$ , Merck), 0,9 g de sulfato cálcico ( $CaSO_4$ , Merck), 14,9 g de sulfato de magnesio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , Merck), 4,1 g de hidróxido potásico (KOH, Merck) y 40,0 g de glicerol. Además, se añadieron 4,5 mL de trazas PTM1.

**Trazas PTM1:** la disolución de 1 L de trazas en agua destilada contenía: 65,0 g de sulfato ferroso heptahidratado ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , Sigma-Aldrich), 20,0 g de cloruro de zinc ( $ZnCl_2$ , Merck), 6 g de sulfato cúprico pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , Merck), 3,0 g sulfato de manganeso hidratado ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ , Merck), 0,08 g de yoduro de sodio (NaI, Sigma-Aldrich), 0,2 g de molibdato sódico dihidratado ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , Merck), 0,02 g de ácido bórico ( $H_3BO_3$ , Merck), 0,5 g de cloruro de cobalto ( $CoCl_2$ , Merck), 5 mL de ácido sulfúrico 95-95 % ( $H_2SO_4$ , Merck) y 0,2 g de biotina. Esterilizado por filtración y almacenado a temperatura ambiente hasta su utilización.

Todos los medios fueron esterilizados con calor húmedo mediante autoclave a 1 atm 20 min, a no ser que se indique lo contrario.

La evolución del cultivo de *P. pastoris* en medio líquido fue monitorizada espectrofotométricamente valorando la absorbancia a 600 nm ( $DO_{600}$ ).

### 3.4.3 Transformación de microorganismos

Las cepas de *E. coli* fueron transformadas por choque térmico siguiendo la metodología estándar proporcionada por el Servicio de Fermentación del CBMSO. La cantidad de ADN utilizada fue 10-100 ng disueltos en 1-10  $\mu$ L. Los transformantes fueron seleccionados en placas de LB con ampicilina 100  $\mu$ g  $mL^{-1}$ .

La transformación de *P. pastoris* se llevó a cabo por electroporación. Para ello, las células se cultivaron en medio YEP durante 18 horas hasta alcanzar una densidad óptica de 1,3-1,5 unidades ( $UDO_{600}$ ).

Las células se centrifugaron a 1500xg durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron 3

lavados: con 250, 125 mL de agua estéril y 10 mL de sorbitol 1M (todos fríos y en este orden) seguidos de centrifugación en las condiciones anteriores. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 mL de sorbitol 1 M y se conservaron en hielo hasta su electroporación.

La electroporación se llevó a cabo en cubetas de Gene pulse/Micro pulser de 0,2 cm (Bio-Rad) con 80  $\mu$ L de células competentes y al menos 20  $\mu$ g de los plásmidos y construcciones previamente linealizadas con 1  $\mu$ L de la enzima de restricción *Stu*I (Roche) o bien con 1  $\mu$ L de *Eco*147I (Fast digest, Thermo Fisher), ambas enzimas con dianas de restricción en el gen *His4*, lo que permitiría la integración por recombinación homóloga en el locus *his4* de la levadura. Las suspensiones celulares se incubaron 10 min en hielo, tras lo que se le aplicó un pulso de 1.5 kV, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$  con el sistema Gene Pulser II asociado al Pulse Controller (ambos de Bio-Rad). Tras la electroporación se añadió 1 mL de sorbitol 1M y las soluciones de transformación se incubaron a 30°C, sin agitación durante 1-2 horas. Transcurrido este tiempo se sembraron 100-200  $\mu$ L de las soluciones en placas con medio MD previamente atemperadas.

### 3.5 Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

#### 3.5.1 ADN plasmídico de *E. coli*

La extracción de ADN plasmídico se realizó mediante el método clásico de lisis alcalina (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989). Ocasionalmente se usó el kit comercial para la purificación de ADN plasmídico NZYMiniprep de NZYTech.

#### 3.5.2 Obtención de clones y tratamientos del ADN

Las reacciones de digestión de ADN con enzimas de restricción (la mayoría de NEB), la desfosforilación con fosfatasa alcalina (Roche) y la ligación con T4 ADN ligasa (NEB) se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de los proveedores.

Los fragmentos de las PCR a clonar fueron purificados de gel utilizando el *kit* comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) o bien *NZYGelpure* (NZYTech).

La construcción GAM1.pSTBlue que contenía el gen que dirige la síntesis de GAM1 insertado en el vector pSTBlue-1 había sido obtenida previamente en el laboratorio y fue utilizada como molde en la amplificación del gen *GAM1* mediante PCR con los oligonucleótidos GAM1.Fw y GAM1.Rv (Tabla 3.3) que incluían las dianas para las enzimas de restricción *Eco*RI y *Bam*HI. El producto de amplificación y el vector pIB4 fueron digeridos con las enzimas de restricción indicadas, analizados en gel de agarosa 0.7% (ver apartado 3.5.4), purificados a partir del gel (usando *Wizard SV Gel*), ligados con T4 ADN ligasa (NEB) y transformados en *E. coli*. Los

transformantes de obtenidos portaban la construcción GAM1.pIB4 que incluía el gen *GAM1* (entre los sitios *EcoRI-BamHI* del MCS), flanqueado por secuencias promotoras y terminadoras del gen *AOX1* y su expresión controlada por metanol.

Para las transformaciones de *P. pastoris*, las construcciones ya linealizadas (en *His4*) fueron concentradas mediante precipitación con etanol (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989).

### 3.5.3 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo con los cebadores específicamente diseñados (Sigma-Aldrich) que se muestran en la Tabla 3.3. Para las reacciones se utilizaron los termocicladores 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem) o bien Labnet™ Termociclador MultiGene™ OptiMax (Labnet™ TC9610-230). Las PCR rutinarias se realizaron con la polimerasa *GoTaq* (Promega) o bien con el kit NZYtaq II 2x Green Master Mix (Nzytech), siguiendo las indicaciones de los proveedores. En las reacciones de PCR que amplificaban fragmentos más grandes o que requerían mayor fiabilidad (clonación o mutagénesis) se utilizó *Phusion High-Fidelity DNA polymerase* (NEB). En todos los casos se siguieron las recomendaciones del fabricante y se usaron temperaturas de anillamiento acorde a las  $T_m$  de los cebadores empleados.

Tabla 3.3 Oligonucleótidos empleados

| Nombre    | Tipo    | Secuencia  | nt | $T_m$ (°C) | Aplicación   |
|-----------|---------|--|----|------------|--|
| GAM1.Fw   | Forward | GTGTGT <b><u>GAATTC</u></b> ATGATTTTTCTG<br>AAGCTGAT | 32 | 71,5       | Amplificación y clonación en pIB4 de GAM1  |
| GAM1.Rv   | Reverse | GTGTGT <b><u>GGATCC</u></b> TTACCAAGTAA<br>TGGTGAAA  | 31 | 71,9       |  |
| ANSV Rv   | Reverse | GCGTTAGAAACATCGAAAC                                  | 19 | 57,4       | Secuenciación de GAM1, comprobación de mutantes y PCR de colonia ( <i>P. pastoris</i> y <i>E. coli</i> ) |
| GYLQEN Fw | Forward | GGTACTTGCAAGAAAATGC                                  | 20 | 58,9       |  |
| RSLs Rv   | Reverse | CGACACCACTTAAGGAACG                                  | 19 | 60,8       |  |
| AOX1 5'   | Forward | GACTGGTTCCAATTGACAAGC                                | 21 | 57,7       | Secuenciación de insertos en pIB4 y PCR de colonia   |
| AOX1 3'   | Reverse | GCAAATGGCATTCTGACATCC                                | 21 | 58,2       |  |
| pGAP 5'   | Forward | GGCAATAATAGCGGGCGG                                   | 18 | 58,7       | Secuenciación de insertos en pIB2  |

\* En negrita y subrayada se encuentran las dianas de restricción *EcoRI* y *BamHI*.

Se realizaron reacciones de PCR de colonia para comprobar la transformación de *E. coli* o *P. pastoris*. Para ello, en el caso de las bacterias, se tomó una pequeña cantidad de cada una de las colonias a analizar, se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua estéril (en tubo tipo eppendorf), y se mantuvo a 100°C durante 5 minutos (rotura celular). Se tomaron 5  $\mu$ L de la suspensión para usarla como molde en la PCR. De forma estándar se usaron 25 ciclos de amplificación. Con los cebadores GYLQEN Fw y RSLs Rv (Tabla 3.3).

En el caso de la levadura, y de manera análoga, una pequeña cantidad de cada una de las

colonias a analizar se resuspendieron también en 30  $\mu\text{L}$  de agua estéril. Posteriormente, con el fin de romper las células, se realizaron 8-10 ciclos de tratamiento a 100°C seguido de un enfriamiento en hielo seco con etanol 96° durante 10 segundos (por ciclo). Se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  de las suspensiones en las reacciones de PCR con los mismos cebadores utilizados para las PCR de colonia de clones bacterianos, que en este caso se llevaron a cabo utilizando 30-35 ciclos de amplificación puesto que el número de copias de la construcción por célula de levadura es menor al integrarse las construcciones en el ADN genómico.

Las PCR mutagénicas de GAM1 se llevaron a cabo con cebadores diseñados según las especificaciones de Liu y Naismith (2008), teniendo en cuenta el uso de codones de *P. pastoris* y sus secuencias y características están recogidas en la Tabla S1 del material suplementario. La mezcla de reacción contenía 50-100 ng de GAM1.pIB4 como molde y los primers a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ . La PCR se realizó con la polimerasa de alta fidelidad y las condiciones del termociclador fueron: 1 min de desnaturalización inicial a 98°C, seguido de 10 ciclos de 98°C 15 s, 58-68°C 30 s, 72°C 4 min 30s, después 20-25 ciclos en 2 pasos: 98°C 15s, 72°C 4 min 30s y una elongación final de 10 min a 72°C. Las temperaturas de anillamiento utilizadas en los primeros ciclos se calcularon utilizando la herramienta *NEB Tm calculator* con las partes no solapantes de los cebadores para asegurar el anillamiento de sus extremos 3' con el molde. El producto de la PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. El ADN molde fue eliminado mediante el tratamiento con 1  $\mu\text{L}$  de *DpnI* (Fermentas, Thermofisher) durante 16-18 horas o 1 hora, según las especificaciones del fabricante utilizado. Este tratamiento en principio digiere el ADN metilado utilizado como molde procedente de bacterias. Se usaron de 5-10  $\mu\text{L}$  de la reacción para transformar *E. coli* por choque térmico.

#### 3.5.4 Visualización de ácidos nucleicos y cuantificación

El ADN se analizó en geles de agarosa al 0,7% que contenía agarosa D-1 LOW EEO (Pronadisa) y bormuro de etidio a una concentración de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los geles se prepararon con el tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM pH 8,0, EDTA 2 mM). El mismo tampón se utilizó para la realización de la electroforesis a 100V durante 25-30 min. Los marcadores de peso molecular usados fueron 100 pb de NEB o Ladder III de NZYTech, según el tamaño esperado de los ácidos nucleicos a analizar.

En la cuantificación de las muestras de ADN se utilizó o bien densitometría y el software ImageJ a partir de las imágenes de los geles obtenidas en el transiluminador Dragonfly SLite 140 o el análisis espectrofotométrico en NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

### 3.5.5 Secuenciación

La verificación de las construcciones/sustituciones realizadas se llevó a cabo por secuenciación, en Macrogen, siguiendo las indicaciones de esta entidad referente a la preparación de muestras y aportando los cebadores de secuenciación (Tabla 3.3).

## 3.6 Obtención y manipulación de proteínas

### 3.6.1 Expresión de GAM1 en *Pichia pastoris*

Las colonias de *P. pastoris* transformadas con la construcción GAM1.pIB4, así como las que tenían todas y cada una de las mutaciones generadas, fueron cultivadas en medio sólido MD. Se transfirieron a 25 mL de medio BMG, en un matraz de 250 mL (una colonia por matraz) y se cultivaron durante 18-24 horas hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 4-8 unidades. Posteriormente, las células se transfirieron a tubos estériles Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 2000 rpm en el rotor Sorvall SPX 6000 durante 10 min. Las células se resuspendieron en el volumen de medio BMM necesario para obtener una  $DO_{600}$  de 1 unidad (aproximadamente 100-200mL). Los cultivos se suplementaron cada 24 horas con el volumen de metanol absoluto necesario para alcanzar una concentración final de 0,5% (v/v) para lograr la inducción de la expresión de la proteína GAM1.

Para la inducción de la expresión de GAM1 en las levaduras transformadas con GAM1.pIB2 se siguió un proceso similar, pero el medio de cultivo inicial contenía glucosa al 1 % (p/v) en lugar de glicerol y se transfirió al medio mínimo maltosa tamponado para la reacción *one-pot*.

### 3.6.2 Purificación y concentración de proteína GAM1

Los transformantes de *P. pastoris* que expresaban tanto la proteína GAM1 wild type (wt) como todas las variantes de la proteína obtenidos en este trabajo por mutación puntual se cultivaron en medio BMM (0,8-1,5 L) durante aproximadamente 72 horas, las células fueron retiradas por centrifugación a 3000 g (en Beckman Avanti J-25) durante 15 minutos a 4°C. La fracción extracelular fue filtrada a través de fibra de vidrio GF/C (Wathman) y membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m de diámetro de poro (Millipore) para eliminar los restos celulares, y posteriormente concentrada por filtración tangencial usando cartuchos de Vivaflow 50 PES de 50 000 MWCO (Sartorius) hasta obtener volúmenes inferiores a los 50 mL. Finalmente, y cuando fue necesario, se recurrió a un segundo proceso de concentración, hasta obtener volúmenes de 0,8-1,5 mL utilizando filtros Amicon Ultra-Ultracel (50000 MWCO) y centrifugaciones de 5000 rpm en rotor Sorvall SPX 6000 durante 20 minutos. Las variantes proteicas obtenidas fueron conservadas a -70°C hasta su utilización.

### 3.6.3 Análisis SDS-PAGE

Las proteínas se resolvieron en geles discontinuos de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo de Laemmli y Favre (1973), con una concentración de acrilamida del 8-10% en el gel de resolución y de 3% para el del concentrador. Las electroforesis se llevaron a cabo en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 185 mM glicina, 3,5 mM SDS) a 180V a 4-6°C durante 1 hora y 20-30 min, aproximadamente, utilizando un sistema vertical Mini-Protean 3 (Bio-Rad). Las soluciones proteicas (10  $\mu$ L) se prepararon añadiendo 5  $\mu$ L de tampón de carga (SDS 1 %, glicerol 4,2 %, Tris-HCl 31,2 mM pH 6.5,  $\beta$ -mercaptoetanol 5,0 %, DTT 2,5 % y azul de bromofenol 0,01 %, concentraciones finales); cuando fue necesario se añadieron 5  $\mu$ L de tampón Tris-HCl 1,5 M pH 7,5 y las mezclas se hirvieron durante 5 min. Los geles resueltos se tiñeron con Coomassie coloidal (National Diagnostic), Quick Coomassie (Generon) o BlueSafe (Nzytech). El marcador de peso molecular utilizado fue Precision Plus Protein Standard Unstained de amplio rango (10-250 kDa) de Bio-Rad.

### 3.6.3 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se cuantificó por densitometría de las imágenes de los geles mediante el software ImageJ 1.51p o bien mediante medida de la absorbancia a 280 nm utilizando Nanodrop ND-1000.

### 3.6.4 Desglicosilación de proteínas

Las desglicosilaciones proteicas se realizaron con la péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F) y la  $\alpha$ 1-2,3,6 manosidasa (ambas de NEB), en condiciones nativas siguiendo las instrucciones del fabricante y 2 horas de tratamiento. Se realizaron reacciones independientes con cada una de las desglicosilasas y secuenciales con las dos.

### 3.6.5 Análisis de la actividad $\alpha$ -glucosidasa

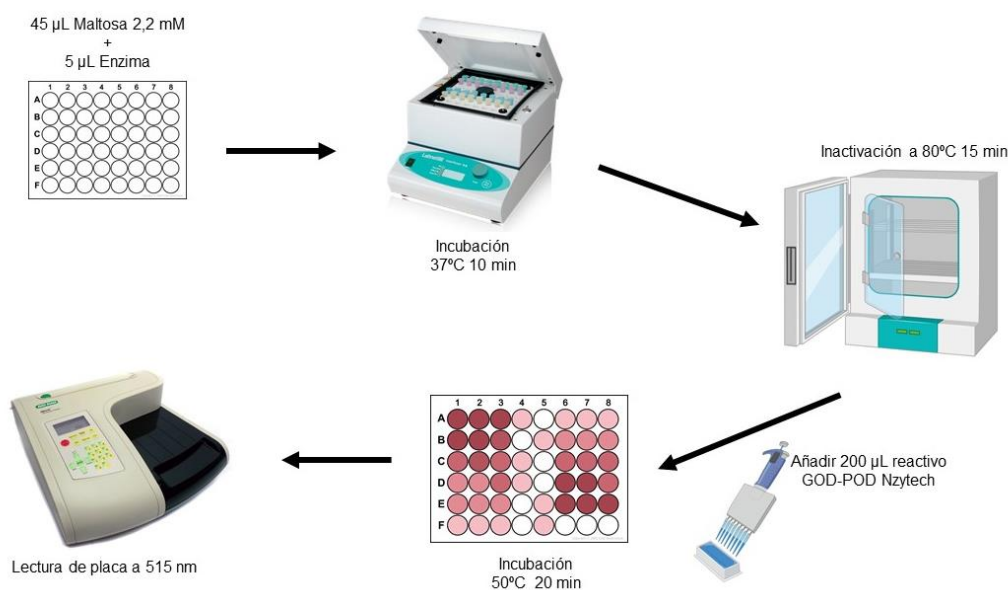
#### 3.6.5.1 Método del GOD-POD

El ensayo de la actividad hidrolítica de GAM1 se realizó por detección de glucosa en la mezcla de reacción (Figura 3.1). Las reacciones se llevaron a cabo en placas multipocillo con 5  $\mu$ L de solución enzimática y 45  $\mu$ L de maltosa 2,2 mM disuelta en tampón acetato sódico 100 mM pH 4,5, que se incubaron a 37°C durante 10 min con 400 rpm de agitación (en Vortemp 56, Labnet). En ocasiones se duplicó el volumen de reacción y se utilizaron tubos tipo eppendorf. La inactivación de la reacción se realizó por incubación a 80°C durante 15-20 minutos o a 100°C durante 5 minutos, en las placas multipocillo o en los tubos, respectivamente. La valoración de la glucosa presente en el medio de reacción se realizó utilizando el reactivo



Glucosa oxidasa – Peroxidasa (GOD-POD) de Nzytech adaptado a placas multipocillo. Básicamente se añadieron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo GOP-POD por 50  $\mu\text{L}$  de reacción y se reveló a 50°C durante 20 min. Se midió la absorbancia a 515 nm en lector de placas iMark (Bio-Rad). El reactivo GOD-POD se preparó como indicaba el fabricante, pero a partir de cierto momento (por razones desconocidas) se tuvieron que diluir estas enzimas en la mitad del tampón para realizar el ensayo en placas multipocillo. Por ello, en un principio la recta de calibrado se realizó de 0,02-0,4  $\text{g L}^{-1}$  de glucosa y posteriormente de 0,01-0,16  $\text{g L}^{-1}$ .

Una unidad de actividad hidrolítica de  $\alpha$ -glucosidasa GAM1 se definió como la liberación de 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto.



**Figura 3.1 Esquema del ensayo de actividad mediante GOD-POD.**

### 3.6.5.2 Análisis cinético

La valoración de parámetros cinéticos de la actividad hidrolasa se realizó utilizando el ensayo de GOD-POD en las mismas condiciones de pH y temperatura que en el apartado anterior. Se utilizaron concentraciones de sustrato comprendidas entre 0-2,5 mM de maltosa o de isomaltosa. Las constantes cinéticas  $K_M$  y  $V_{max}$  se hallaron utilizando el módulo cinético del programa Sigma 12.0 ajustando los datos adquiridos del ensayo al modelo de Michaelis-Menten.

### 3.6.5.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad $\alpha$ -glucosidasa

Se evaluó la actividad hidrolítica de GAM1 sobre maltosa usando distintas temperaturas, desde la considerada como óptima (37°C) hasta los 60°C. Para ello, se incubaron 0,8-8 U de enzima con maltosa 2 mM en tampón acetato sódico 100 mM pH 4,5 durante 10 minutos

seguida de inactivación a 100°C durante 5 minutos. La liberación de glucosa se valoró mediante GOD-POD.

La estabilidad a distintas temperaturas de GAM1 se evaluó incubando aproximadamente 10 U de actividad enzimática en el tampón acetato sódico ya mencionado durante 24 horas a 37-60°C. Se evaluó la actividad hidrolítica de la proteína, en tubos tipo eppendorf, a tiempo inicial y final de la reacción tal y como se describe en el apartado 3.6.5.1. La actividad residual se definió como el porcentaje de actividad valorada al final de la reacción con respecto a la valorada en el tiempo inicial para cada una de las condiciones.

#### **3.6.5.4 Efecto del pH sobre la actividad $\alpha$ -glucosidasa**

Se valoró la actividad hidrolítica de GAM1 a distintos valores de pH comprendidos entre 3 y 10 unidades utilizando el tampón universal Britton-Robinson (apartado 3.2), 0,4-8 U de actividad enzimática y maltosa 2 mM. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 10 minutos, se inactivaron a 100°C durante 5 minutos y se valoró la liberación de glucosa mediante GOD-POD.

El análisis de la estabilidad a distintos pH de GAM1 se realizó utilizando el tampón Britton-Robinson con incubaciones de aproximadamente 10 U de actividad enzimática y 24 horas. Se midió la actividad en tubos tipo eppendorf a tiempo inicial y final de la reacción tal y como se describe en el apartado 3.6.5.1. La actividad residual se definió como el porcentaje de actividad valorada al final de la reacción con respecto a la valorada en el tiempo inicial para cada una de las condiciones.

#### **3.6.5.5 Efecto de disolventes orgánicos sobre la actividad $\alpha$ -glucosidasa**

Se evaluó la estabilidad de GAM1 en presencia de los disolventes orgánicos acetonitrilo (AcN) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 5-30% (v/v). Para ello, se incubaron aproximadamente 0,5 U mL<sup>-1</sup> de actividad enzimática durante un total de 18 horas en presencia de los disolventes, y la actividad hidrolítica de GAM1 fue evaluada cada cierto tiempo como se describió anteriormente (apartado 3.6.5.4).

### **3.6.6 Análisis de la actividad transferasa**

#### **3.6.6.1 Reacciones de transglicosilación**

Todos los ensayos de la actividad transferasa se realizaron en concentraciones saturantes de maltosa disuelta en tampón acetato sódico 100 mM a pH 4,5 y una temperatura de 37°C. Los ensayos de transglicosilación de las variantes enzimáticas se realizaron con 200 g L<sup>-1</sup> de maltosa. Se utilizaron 25 U mL<sup>-1</sup> de actividad enzimática en los ensayos realizados con las

variantes obtenidos en base al modelado por homología con la  $\alpha$ -glucosidasa de *Beta vulgaris* (PDB:3W37) y 50 U mL<sup>-1</sup> para los obtenidos a partir del modelo basado en la subunidad del N-terminal de la sacarasa-isomaltasa intestinal humana (PDB:3LPO).

Los ensayos de transglucosilación de aceptores glucídicos se realizaron con xilosa, fructosa, glucosamina, galactosa, lactosa, celobiosa y sacarosa, todos ellos a 150 g L<sup>-1</sup> y 200 g L<sup>-1</sup> de maltosa, salvo en los ensayos con glucosa que se hicieron a una concentración de 150 g L<sup>-1</sup> de maltosa. Además, la glucosa, xilosa y sacarosa se ensayaron también a 300 g L<sup>-1</sup>.

La potencial glicosilación de compuestos que incluían anillos aromáticos (fenólicos), como la epigallocatequina galato (EGCG), hidroquinona, hidroxitirosol y polidatina (piceido) mediada por GAM1 se analizó en reacciones que contenían una concentración final del potencial aceptor de 25 g L<sup>-1</sup> y 150 g L<sup>-1</sup> de maltosa, excepto en el caso de la polidatina que se realizó con 20 mM (7,6 g L<sup>-1</sup>) y 300 g L<sup>-1</sup> de maltosa. Además, la mezcla de reacción de polidatina contenía 20% de DMSO. En todas las reacciones se utilizaron 20 U mL<sup>-1</sup> de actividad hidrolítica GAM1.

### 3.6.6.2 Reacción *one-pot* en matraz y fermentador alimentado

Se estudió la producción de IMOs en una reacción *one-pot* (un único recipiente para el crecimiento del microorganismo y la producción de IMOS) usando clones de *P. pastoris* transformados con la construcción GAM1.pIB2, donde la expresión de GAM1 quedaba bajo el control del promotor constitutivo P-GAP (promotor del gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa). Para ello, se cultivaron los transformantes de levadura en 10 mL de medio BMGlc durante 18-24 horas y a continuación las células se transfirieron a 40 mL de medio BMMal en matraces de 250 mL. Este medio contenía maltosa al 10% (p/v), azúcar que era hidrolizado por GAM1 y servía tanto como sustrato en reacciones de transferencia como fuente de carbono para el crecimiento de *P. pastoris* al liberarse glucosa. Se fue monitorizando la evolución del cultivo midiendo su DO<sub>600</sub> a distintos tiempos, y además se tomaron fracciones de 0,5 mL del cultivo que fueron filtradas a través de membrana de nailon de 13 mm de diámetro y 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro (Scharlau) e inactivadas (100°C, 5min) para su posterior análisis por HPLC-ELSD.

En colaboración con Dionisio Ureña del Servicio de Fermentaciones del CBMSO, la reacción *one-pot* de 40 mL se escaló a nivel de fermentador *fed-batch*. Para ello, el transformante seleccionado se cultivó en 800 mL de BMG que contenía una concentración de glicerol del 4% (p/v). Se utilizaron dos matraces de 2 L con 400 mL de cultivo por matraz. Las levaduras se cultivaron hasta alcanzar aproximadamente 8 unidades de OD<sub>600</sub> (unas 24 horas). Las células se precipitaron por centrifugación a 1500 g se resuspendieron en 3 L de medio FBSM que contenía maltosa al 5% (p/v) suplementado con trazas PTM1 y se traspasaron al

fermentador de 5 L Biostat B Plus (Sartorius). La OD<sub>600</sub> inicial del cultivo fue de 2,3 unidades. La temperatura se mantuvo constante a 30°C y el pH a 5 unidades mediante la adición de NH<sub>3</sub> 12,5% (v/v) que también servía como fuente de nitrógeno para las levaduras. Se usó una agitación de 600-1000 rpm para mantener la pO<sub>2</sub> al máximo posible (cercano al 20%). Se utilizó antiespumante 204 al 10% (p/v; Sigma-Aldrich) para evitar la aparición de espumas. Además, se añadió un flujo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> de maltosa 40% (p/v) a partir de las 20 horas. Cuando fue necesario se retiró parte del volumen del cultivo. Se monitorizó la evolución del cultivo midiendo su OD<sub>600</sub> a distintos tiempos. Además, se fueron tomando también fracciones del cultivo que se filtraron utilizando filtros de jeringa de 0,45 µm e inactivaron a 100°C durante 5 minutos para su análisis posterior por HPAEC-PAD.

### 3.6.6.2 Análisis HPLC

Las fracciones que se fueron retirando de las reacciones de transglicosilación se filtraron usando membranas de nailon de 13 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro (Scharlau). Se diluyeron con agua Milli-Q o con metanol a concentraciones adecuadas para su análisis por cromatografía de alta resolución en fase normal o reversa para el análisis de IMOs compuestos glucídicos o fenólicos, respectivamente.

El equipo HPLC constaba de una bomba cuaternaria Delta 600 acoplada a un inyector automático 717 Plus Autosampler (ambos de Waters) para el análisis de IMOs y Varian

**Tabla 3.4 Columnas analíticas utilizadas en el análisis por HPLC, condiciones de análisis y usos.**

| Columna   | Fase móvil  | Detector  | Análisis  |
|---|---|---|---|
| <b>Kromasil-NH<sub>2</sub> 100A</b><br>(Análisis vínicos) | CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O<br>75:25 0-5 min<br>Gradiente lineal<br>75:25-70:30 5-10 min<br>70:30 10-45 min<br>Gradiente lineal<br>70:30-75:25 45-50 min<br>1 mL min <sup>-1</sup>        | ELSD PL-ELS 1000,<br>Polymer lab.<br>90 °C 1 SLM N <sub>2</sub><br>alternativamente<br>ELSD Sedex 75, Sedere<br>54 °C 1 mL min <sup>-1</sup> N <sub>2</sub> | Producción de<br>IMOs<br>TG de aceptores<br>glucídicos  |
| <b>Luna-NH<sub>2</sub></b><br>(Phenomenex)                | CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O<br>85:15 0-10 min<br>Gradiente lineal<br>85:15-70:30 10-15 min<br>70:30 15-35 min<br>Gradiente lineal<br>70:30-85:15 35-40 min<br>1 mL min <sup>-1</sup>      | ELSD PL-ELS 1000,<br>Polymer lab.<br>90 °C 1 SLM N <sub>2</sub>   | Producción de<br>IMOs,<br>TG de aceptores<br>glucídicos |
| <b>Zorbax Eclipse<br/>Plus C18</b> (Agilent)              | Gradiente lineal<br>H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> CN<br>95:5-60:40 0-12 min<br>Gradiente lineal<br>60:40-95:5 12-13 min<br>95:5 13-18 min<br>+ 0.1 % ácido fórmico<br>0,8 mL min <sup>-1</sup> | PDA, Varian Prostar 420   | Análisis de TG de<br>compuestos<br>fenólicos            |

\*Columnas con unas dimensiones de 4.6 x 150 mm, acoplada a una bomba cuaternaria Delta 600E (Waters). Abreviaturas: TG, transglicosilación; ELSD, detector evaporativo de dispersión de luz; PDA, detector fotodiodo array.

ProStar model 420 para los compuestos fenólicos glucosilados. Las columnas analíticas empleadas tenían unas dimensiones de 4,6 x 250 mm, poseían grupos amino unidos a sílice con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  o de 3  $\mu\text{m}$  (Tabla 3.4). Se usó una precolumna-NH<sub>2</sub> (Phenomenex) para el análisis de IMOs. El volumen de las muestras analizadas fue de 20  $\mu\text{L}$ , para los compuestos glucídicos, y 3  $\mu\text{L}$ , para los compuestos fenólicos, con los métodos, columnas y detectores detallados en la Tabla 3.4. Los patrones utilizados para la producción de IMOs fueron glucosa, maltosa, isomaltosa, maltotriosa e isomaltotriosa. En las reacciones con aceptores glucídicos se utilizaron estos también como patrón además de sacarosa y xilosa dependiendo de la reacción. El *software* utilizado para la recolección de datos fue Millennium 32 y Empower v 1.0, ambos de Waters para los compuestos glucídicos. La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó a 308 nm y la recolección de datos se llevó a cabo con el *software* Varian Star LC workstation 6.41.

### 3.6.6.3 Análisis HPAEC-PAD

Las variantes proteicas (mutantes) generadas en base al modelo por homología con la subunidad N-terminal de la sacarasa-isomaltasa humana, la reacción one-pot en fermentador alimentado y las reacciones de transglucosilación realizadas con la proteína GAM1 inmovilizada fueron analizadas mediante cromatografía de intercambio aniónico acoplada a un detector amperométrico de pulsos. El sistema utilizado fue el Dionex ICS3000 (Thermo Fisher Scientific) y una columna CarboPack PA-100 (4x250 mm) conectada a una precolumna PA-100 (4x50 mm) a una temperatura de 30°C. Las muestras a evaluar fueron diluidas hasta la concentración adecuada para su análisis mediante el método resumido en la tabla 3.5. Se usaron como patrones los azúcares glucosa, maltosa, isomaltosa, nigerosa, kojibiosa, trehalosa, maltosa, panosa, isomaltotriosa, maltotriosa e isomaltotetraosa.

Los datos generados fueron analizados con el software Chromeleon (Dionex, Thermo Fisher Scientific).

Tabla 3.5 Método de HPAEC-PAD para el análisis de IMOs

| Tiempo (minutos) | 200 mM NaOH (%) | H <sub>2</sub> O (%) | 320 mM CH <sub>3</sub> COONa +<br>100 mM NaOH (%) |
|------------------|-----------------|----------------------|---|
| 0                | 15              | 85                   | 0   |
| 15               | 20              | 70                   | 0   |
| 50               | 50              | 30                   | 20  |
| 60               | 20              | 30                   | 50  |
| 70               | 40              | 30                   | 30  |
| 71               | 15              | 85                   | 0   |
| 85               | 15              | 85                   | 0   |

Columna CarboPack PA-100 de 4 x 250 mm. Flujo 0,5 mL min<sup>-1</sup>.

### 3.6.6.4 Purificación de productos de transglucosilación

La purificación de los aceptores glucosilados de naturaleza glucosídica (xilosa y sacarosa)

fueron purificados por HPLC utilizando una columna semipreparativa Kromasil-NH<sub>2</sub> (250x10, 5 µm) asociado a un detector ELSD (mod. 1000, Polymer Laboratories) equilibrado a 90°C. Se aplicó un flujo de 4,7 mL min<sup>-1</sup> de AcN:H<sub>2</sub>O 75:25 durante 5 minutos seguido de 5 minutos de gradiente lineal para cambiar a una proporción 70:30 de la mezcla y mantenerlo durante 35 minutos, tras los que se retornó a la proporción inicial 75:25 durante 5 minutos. El volumen inyectado en cada pinchazo fue de 150 µL, de los que la décima parte se desvió al detector y el resto se fue recolectando mediante un fraccionador de flujo de tres vías (Accurate, LC packagings).

Los compuestos glucosilados de polidatina se purificaron por HPLC utilizando una columna semipreparativa Zorbax Eclipse XDB-C18 (250x9,4; 5 µm) acoplado a un detector PDA. La temperatura de la columna se mantuvo a 40°C. El método consistió en una fase móvil reversa de AcN y H<sub>2</sub>O al 0,1% (v/v) de ácido fórmico con un flujo de 6,5 mL min<sup>-1</sup> en una proporción inicial AcN:H<sub>2</sub>O 10:90 cambiando en gradiente lineal a 25:75 durante 12 minutos seguido de 1 minuto de gradiente lineal a 10:90 manteniendo esta proporción otros 7 minutos. El volumen de cada pinchazo fue de 100 µL. Se utilizó el mismo fraccionador de flujo ya mencionado.

La fase móvil de las recolecciones de cada compuesto fue evaporada en un rotavapor R-210 (Buchi) a 65°C.

#### **3.6.6.5 Análisis de compuestos glucosilados por espectroscopía de masas (MS)**

Los productos purificados fueron analizados por espectroscopía de masas (MS) en el Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (SIdI-UAM).

Los derivados glucosilados de la sacarosa y la xilosa, así como los glucosilados del piceido (polidatina) fueron analizados mediante MS-ESI con el espectrómetro de masas con analizador híbrido QTOF modelo QSTAR Pulsar I (AB Sciex). Las muestras fueron ionizadas por electrospray en modo reflector positivo por infusión directa con metanol y yoduro sódico al 1%.

#### **3.6.6.6 Análisis de compuestos glucosilados por resonancia magnética nuclear (RMN)**

La estructura de los compuestos fue analizada y determinada en colaboración con Ana Poveda del CIC bioGUNE (País Vasco, España)

El análisis de la estructura de los azúcares sintetizados y purificados se determinó usando una combinación de técnicas de RMN de 1D ((<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}), 1D selectivo TOCSY, NOESY y/o ROESY) y 2D (COSY, HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC, NOESY). El espectro de las muestras disueltas en D<sub>2</sub>O (ca. 7mM) se grabaron en un espectrómetro IVDr 600 (Bruker) equipado con una sonda BBI con gradientes en el eje Z, a una temperatura de 300 K. los desplazamientos

químicos se expresaron en partes por millón (ppm). La señal de TSP-d<sub>4</sub> se usó como referencia interna. Se utilizaron secuencias de pulsos estándar de Bruker. Para los experimentos de HSQC y HMBC se utilizaron valores de 5 ppm y puntos 1 K para la dimensión <sup>1</sup>H, y 70 ppm y 512 puntos para dimensión <sup>13</sup>C. Para los experimentos homonucleares COSY y NOESY se utilizaron ventanas de 3 ppm con una matriz de 1 K x 384-512 puntos. El tiempo de mezcla del experimento NOESY se estableció en 500 ms.

La estructura de los productos glucosilados del piceido se determinaron con una combinación de técnicas de RMN 1D y 2D (COSY, DEPT-HSQC, NOESY) estándar. El espectro de la muestra disuelta en DMSO-d<sub>6</sub> (ca. 7mM) se grabó en el mismo equipo ya mencionado y a la misma temperatura y se utilizó el DMSO-d<sub>5</sub> (2,5 ppm) residual como referencia interna. Para el experimento DEPT-HSQC se utilizaron 8 ppm y 1 K puntos para la dimensión <sup>1</sup>H, y 165 ppm y 256 puntos para la dimensión <sup>13</sup>C. Para los experimentos homonucleares COSY y NOESY se utilizaron ventanas de 8 ppm con una matriz de 1 K x 256 puntos. El tiempo de mezcla para el NOESY fue el mismo, 500 ms.

### 3.7 Herramientas bioinformáticas

Los servidores y bases de datos CAZy (<http://www.cazy.org>), PDB (<http://www.rcsb.org>) y UniProt (<http://www.uniprot.org>) se utilizaron para obtener información de las secuencias, estructuras y realizar cálculos de distintos parámetros.

Se utilizó la herramienta *Compute pI/Mw* del servidor ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2005) para hallar el peso molecular teórico de la enzima GAM1. La herramienta *SWISS-MODEL* (Waterhouse *et al.*, 2018), englobada en el servidor ExPASy, fue utilizada para la generación de modelos basados en homología.

El servidor ENDscript 2.0 (Robert y Gouet, 2014) se empleó para el alineamiento de secuencias múltiple de proteínas homólogas y la representación los elementos estructurales asociados y PyMol (Schrödinger, L. & DeLano, 2020) para la visualización y estudio de estructuras proteicas. El análisis de las trazas evolutivas para valorar el nivel de conservación de los residuos de la secuencia aminoacídica de GAM1 se realizó mediante el servidor web *Evolutionary Trace server* (<http://evolution.lichtargelab.org>) (Wilkins *et al.*, 2012) y *plugin PyETV* (Lua y Lichtarge, 2010) para la visualización del análisis de la traza evolutiva del modelo de GAM1 basado en NtSI.

### 3.8 Inmovilización enzimática sobre soporte de quitosano

La inmovilización de la enzima GAM1 expresada heterológamente se realizó sobre un soporte basado en quitosano y preactivación usando los linkers glutaraldehído (GA) o genipina (GP) a distintas concentraciones.

### 3.8.1 Preparación del soporte de inmovilización

La preparación de bolas de quitosano se basó en el procedimiento descrito por Biró y colaboradores (2008) para la formación de macroesferas del polisacárido. En resumen, el quitosano (2% p/v) se disolvió en una disolución acuosa de ácido acético (2% p/v). La disolución se añadió gota a gota, a través de un tubo de 1 mm de sección acoplado a una bomba peristáltica, a una disolución de NaOH 1M y 26% de etanol (v/v) agitado suavemente con agitador magnético. Las bolas de quitosano (chitosan beads) una vez formadas se lavaron y filtraron reiteradamente con agua destilada hasta conseguir un pH neutro de la suspensión.

Se utilizaron 200 mg de chitosan beads que se activaron tras incubación en 1 mL de los linkers GA (0,1-1%, p/v) o GP (0,1-0,5%, p/v), disueltos ambos en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7, durante distintos tiempos (1-18 horas) en agitación orbital. Las preparaciones se lavaron transcurrido el tiempo deseado con el mismo tampón fosfato para eliminar el exceso de *linkers*.

### 3.8.2 Inmovilización de GAM1

La inmovilización de GAM1 se realizó por incubación de 10-40 U de actividad enzimática en 1 mL de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7 y unos 200 mg de bolas de quitosano. La incubación se realizó durante 18 horas a 30°C y agitación orbital suave (120 rpm), tras lo que se recuperó el volumen de solución enzimática inicialmente utilizado. El biocatalizador inmovilizado se lavó 4 o 5 con el mismo tampón. Se analizó la actividad hidrolítica tanto en la disolución de la enzima ya incubada como en cada uno de los lavados mediante ensayo GOD-POD, datos que posteriormente se usaron en el cálculo del rendimiento de la inmovilización. Se realizó también un análisis en SDS-PAGE para valorar la cantidad de proteína presente en las fracciones obtenidas.

#### 3.8.2.1 Ensayo de actividad de los biocatalizadores inmovilizados

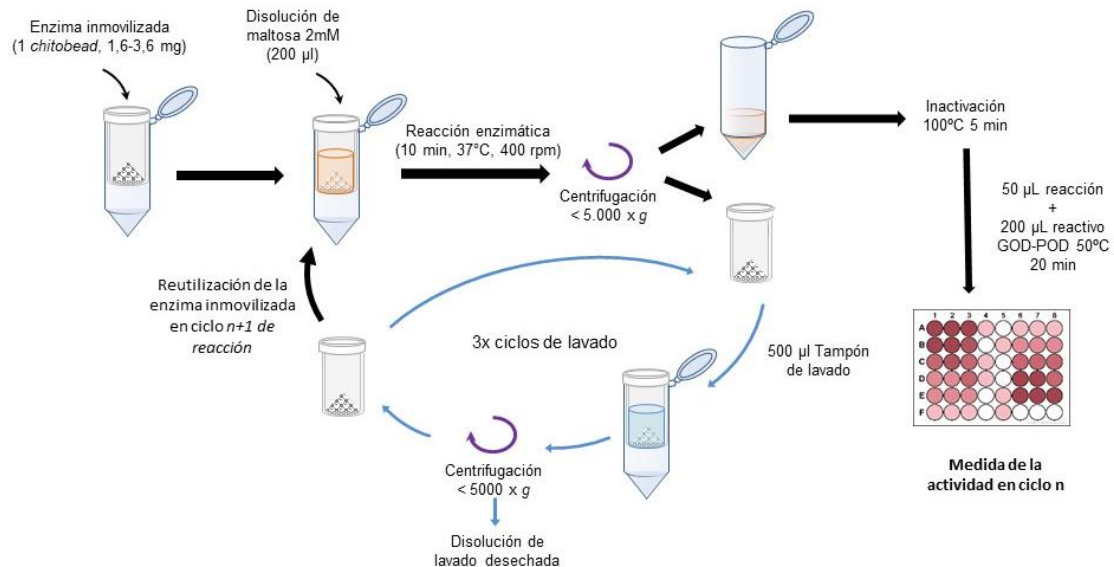
Los ensayos de actividad de la enzima inmovilizada se basaron en el protocolo descrito por Fernández-Arrojo *et al.* (2015) donde se utilizaron tubos con filtro (Spin-X 0.45  $\mu$ m, Costar) (Figura 3.2). Se utilizó el mismo esquema de ejecución en la medida de la actividad de GAM1 inmovilizada, en el cálculo de los parámetros del rendimiento de la inmovilización, la estabilidad operacional del biocatalizador inmovilizado generado y para evaluar su actividad y estabilidad a distintos valores de pH y temperatura.

Los ensayos de actividad se llevaron a cabo por triplicado agregando 100  $\mu$ L de maltosa 2 mM en tampón acetato sódico 100 mM pH 4,5 a un tubo con filtro que contenía una *chitobead*. La reacción se incubó a 37°C durante 10 minutos con agitación (400 rpm) en un incubador Vortemp 56 (Labnet). Posteriormente los tubos se centrifugaron a menos de 5000 g y la



mezcla de reacción se inactiva a 100°C. Se tomaron 50 µL de la reacción para su análisis mediante GOD-POD

Cuando se realizó el ensayo de estabilidad operacional, realizando varios ciclos de reacción, las chitosan beads se lavaron 3 veces con 500 µL de tampón de lavado (el mismo que el de reacción) tras cada uno de los ciclos (Figura 3.2).



**Figura 3.2** Esquema del ensayo de la actividad hidrolítica realizado con la enzima inmovilizada en las *chitosan beads*. Modificado de Fernández-Arrojo *et al.* (2015).

Los ensayos de termoestabilidad se realizaron incubando 1 chitobead en tampón acetato sódico 50 mM pH 4,5 a distintas temperaturas (37-60°C) durante 24 horas. Se analizó la actividad a tiempo inicial y final en las reacciones que se llevaron a cabo en las condiciones óptimas ya descritas y se representó la variación de actividad en porcentaje.

Los ensayos de estabilidad a distintos pH se realizaron de manera análoga pero la incubación se realizó a los distintos pH usando el tampón universal Britton-Robinson y a 37°C de temperatura.

El análisis de la actividad a distintas temperaturas se realizó también con 1 chitosan beads que fue incubada a distintas temperaturas durante 10 minutos en presencia de 200 µL de maltosa 2 mM disuelta en tampón acetato sódico 100 mM pH 4,5. La actividad a distintos pH se realizó disolviendo la maltosa en el tampón Britton-Robinson a los distintos pHs ensayados e incubando a 37°C durante 10 minutos.

### 3.8.2.2 Cálculo de los parámetros de inmovilización

La actividad inmovilizada se definió como la diferencia entre la actividad enzimática inicial de la proteína soluble que se emplea en cada ensayo y la valorada tanto en el volumen de

solución recuperado tras las 18 h de inmovilización como en los distintos lavados realizados (actividad residual):

Para corregir la potencial pérdida de actividad por incubación a 30°C se realizó un control incubando la enzima libre durante el mismo tiempo y condiciones que la inmovilizada. Este valor de actividad fue el que se tomó como inicial en los ensayos.

El rendimiento de la inmovilización se definió como la relación porcentual que había entre la actividad hidrolítica inmovilizada y la actividad inicial.

$$\text{Rendimiento inmovilización (\%)} = \frac{\text{Actividad inmovilizada}}{\text{Actividad inicial}} \times 100$$

La medida de la eficacia de inmovilización se definió como la relación porcentual que había entre la actividad hidrolítica observada (detectada) del biocatalizador inmovilizado y la actividad inmovilizada.

$$\text{Eficacia (\%)} = \frac{\text{Actividad observada biocatalizador inmovilizado}}{\text{Actividad inmovilizada}} \times 100$$

La actividad recuperada se definió como la relación porcentual que había entre la actividad observada del biocatalizador inmovilizado y la actividad inicial de la proteína soluble que se emplea en cada ensayo.

$$\text{Actividad recuperada (\%)} = \frac{\text{Actividad observada biocatalizador inmovilizado}}{\text{Actividad inicial}} \times 100$$

La actividad hidrolítica se valoró mediante el análisis descrito en el apartado 3.8.2.1 (Figura 3.2).

### 3.8.2.3 Análisis de la actividad transferasa de la enzima inmovilizada

Para el estudio de la actividad transferasa y su estabilidad operacional se utilizaron aproximadamente 10 g de soporte preactivado con GA y GP en las condiciones óptimas, es decir GA 0,1% (p/v), GP 0,1% (p/v), incubadas 3 horas y 1 hora, respectivamente. Se utilizaron 500 U de actividad enzimática disueltas en 10 mL de tampón fosfato sódico 50 mM pH 7. Se hallaron los parámetros de inmovilización como se detalla en los apartados 3.8.2.1 y 3.8.2.2.

La reacción de transglicosilación se llevó a cabo en tubos Falcon de 50 mL con la cantidad total de biocatalizador inmovilizado en 5 mL de disolución con 200 g L<sup>-1</sup> de maltosa en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7. Se realizaron 10 ciclos de 24 horas cada uno incubando la reacción a 37°C y agitación orbital suave (100-120 rpm) en Vortemp 56 (Labnet). Tras cada

ciclo se tomó una alícuota de 1 mL para su análisis por HPAEC-PAD y las chitosan beads se lavaron varias veces para asegurar la ausencia de sustrato.

Las reacciones se llevaron a cabo a pH 7 para facilitar la conservación del soporte de inmovilización, fundamentalmente su integridad física.

# RESULTADOS

## 4 RESULTADOS

La  $\alpha$ -glucosidasa de *Schwanniomyces occidentalis* (GAM1), antes definida como glucoamilasa, es capaz de hidrolizar enlaces  $\alpha$ 1-4 entre dos unidades de glucosa, que formen parte oligosacáridos o polisacáridos, comenzando por su extremo no reductor. Además, la enzima puede sintetizar isomaltooligosacáridos con al menos un enlace  $\alpha$ 1-6 entre dos unidades de glucosa a partir de la hidrólisis de la maltosa. De este modo, GAM1 genera pequeños oligosacáridos como la isomaltosa, la panosa y la isomaltotriosa, que por sus propiedades son de gran interés para la industria alimentaria. La capacidad de transglicosilación que tiene esta enzima la hizo el objetivo principal de este trabajo. En él, y como primer paso, la proteína se clonó y expresó heterológamente con el objetivo de sobreproducirla hasta alcanzar unos niveles que facilitarían el estudio de su actividad de transglicosilación y el de incluirla en un fondo genético que posibilitara su posterior manipulación molecular. A través de modelos tridimensionales *in silico* se estudiaron también los residuos aminoacídicos del bolsillo catalítico de la enzima responsables de su especificidad, y se modificaron por mutagénesis dirigida determinadas posiciones para analizar su implicación en las propiedades cinéticas de hidrólisis y transferencia de la enzima.

### 4.1 Clonación, expresión heteróloga y caracterización de GAM1

#### 4.1.1 Obtención de las construcciones de expresión

El gen *GAM1* que dirige la síntesis de la  $\alpha$ -glucosidasa de *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 26077, consta de 2880 pb (2883 pb con el codón stop) y codifica una proteína de 960 residuos de aminoácidos (Figura S1). La secuencia aminoacídica de la proteína codificada en esta cepa es muy similar a la de la proteína GAM1 (Uniprot Q401B1) de la cepa ATCC 2322, pero incluye una alanina en lugar de una serina en la posición 845. El análisis de la secuencia aminoacídica con la herramienta SignalP 5.0 mostró una potencial secuencia señal de exportación de 22 residuos (66 nucleótidos) (Figura S2) en el extremo N-terminal de la proteína. Se estimó el peso molecular teórico de la proteína en unos 106 kDa (104 kDa sin el péptido señal) mediante la herramienta Compute pI/Mw tool de Expasy.

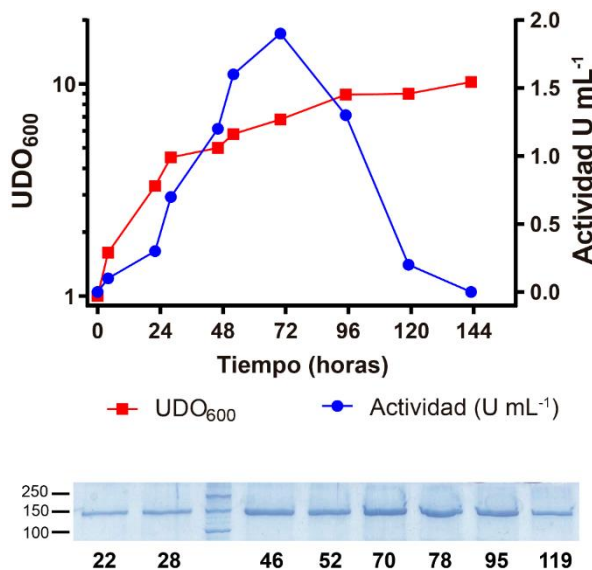
Para realizar este trabajo se partió de una construcción que contenía el gen *GAM1* en el vector pSTBlue-1, y que había sido previamente obtenida en el laboratorio. El gen *GAM1* se amplificó con los cebadores GAM1.Fw y GAM1.Rv que contenían las dianas *EcoRI* y *BamHI* respectivamente (Tabla 3.3). El amplicón obtenido, de 2913 pares de bases, se insertó en el vector de expresión en *Pichia pastoris* pIB4, bajo el control del promotor inducible por metanol *AOX1* para generar la construcción GAM1-pIB4. Se mantuvo, por tanto, el péptido señal de exportación de GAM1 que en principio debería ser también reconocido por *P. pastoris*.

Además, se generó la construcción GAM1-pIB2 utilizando el vector pIB2 de *P. pastoris* que incluye el promotor de expresión constitutivo de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (P-GAP) con el fin de poder analizar la producción de isomaltooligosacáridos mediante reacción en *one-pot*.

#### 4.1.2 Expresión heteróloga en *Pichia pastoris*

El constructo GAM1-pIB4 fue purificado y linealizado mediante digestión con *StuI* o *Eco147I* (isoesquizómeros, el mismo sitio de corte) e incluido en *P. pastoris* por electroporación (al menos 20 µg de plásmido). Los clones de levadura que integraron el constructo en su ADN genómico se seleccionaron en placas de medio mínimo (MD) desprovisto de aminoácidos. La integración del material genético en *P. pastoris* se comprobó o mediante PCR de colonia o de ADN genómico (apartado 3.5.2). Además, se hizo un cribado de clones con un medio modificado de MD que contenía almidón y se sustituyó la glucosa por sorbitol, que no reprime al promotor *AOX1*. Al medio se le agregó metanol para la inducción de la expresión de la enzima GAM1. La selección de clones se basó en la detección de la presencia o ausencia de pequeños halos de hidrólisis de almidón que se hicieron visibles a 4°C por la precipitación del polisacárido.

Con el propósito de analizar los niveles de expresión de GAM1 en los transformantes de *P. pastoris*, se prepararon inóculos de 3 o 4 clones en medio BMG que posteriormente se pasaron al medio de expresión BMM tal como se describe en el apartado 3.6.1. El cultivo se monitorizó durante varios días durante los que se tomaron muestras del medio extracelular y se valoraron tanto la actividad hidrolítica sobre maltosa (ensayo GOD-POD) como la presencia de la proteína GAM1 en SDS-PAGE (Figura 4.1 S3). La actividad hidrolasa de la proteína heteróloga se detectó en el medio extracelular de los transformantes tras 22 horas de cultivo en BMM (0,3 U mL<sup>-1</sup>). Prácticamente solo una banda proteica con un peso molecular estimado



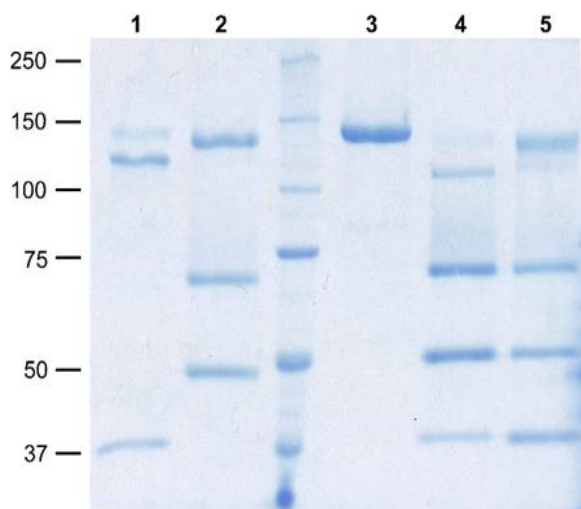
**Figura 4.1 Perfil de crecimiento y actividad de GAM1 detectada en *P. pastoris*.** El transformante de levadura portaba la construcción GAM1.pIB4. El cultivo fue realizado en BMM. Se monitorizó durante 6 días. En la parte inferior se muestra el análisis por SDS-PAGE del nivel de proteína GAM1 obtenido a los tiempos de cultivo indicados en horas. A la izquierda se indican los tamaños de 3 marcadores de peso molecular en kDa.

por movilidad relativa de unos 143 kDa se visualizó por SDS-PAGE, indicando que la secuencia señal de exportación de GAM1 era reconocida por *P. pastoris*. La actividad máxima de  $1,9 \text{ U mL}^{-1}$  se alcanzó tras las 70 horas de inducción con metanol, y se detectó una bajada de actividad a las 95 horas, hasta un valor de  $1,3 \text{ U mL}^{-1}$ , para drásticamente desaparecer a las 120 horas (Figura 4.1).

#### 4.1.3 Purificación y caracterización de las propiedades de GAM1

La proteína heteróloga GAM1 fue la proteína mayoritaria detectada por SDS-PAGE en el medio extracelular de *P. pastoris* (ver Anexo, Figura S3) tras la inducción del cultivo con metanol, una propiedad del sistema de expresión utilizado ampliamente conocida. Por ello, el proceso posterior de la purificación de la proteína se redujo a una serie de pasos de filtración y concentración del medio extracelular de la levadura (apartado 3.6.2). Como resultado final, tras clarificar y concentrar el medio extracelular de los transformantes (diafiltración y filtros de 50 kDa) se obtuvo aproximadamente 1 mL con unos  $35 \text{ mg mL}^{-1}$ , partiendo de unos 67 mg de proteína total GAM1 por cada litro de cultivo de partida.

La  $\alpha$ -glucosidasa GAM1 purificada a partir del medio extracelular de *P. pastoris* fue visualizada

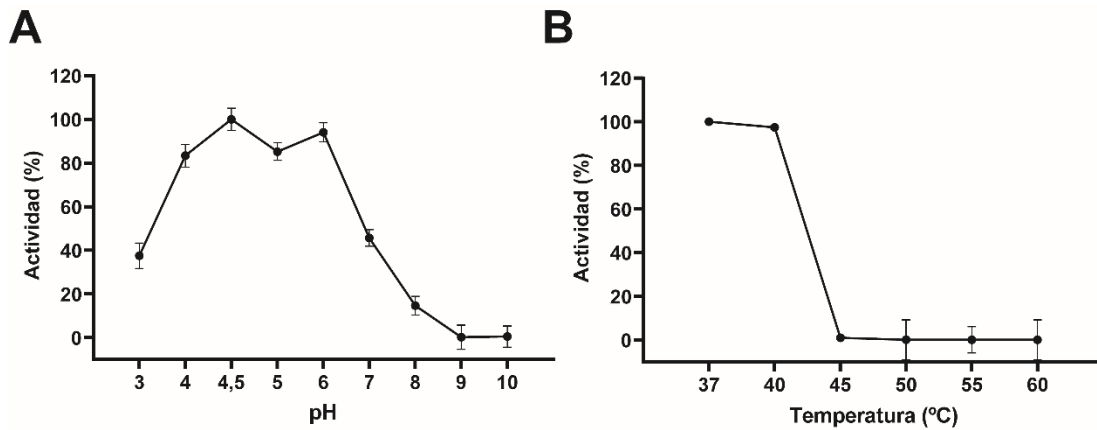


**Figura 4.2 Análisis en SDS-PAGE de la desglucosilación de GAM1.** Análisis de la proteína GAM1 purificada (carril 3) tratada con PNGasa F (36kDa; 500U, carril 1) y  $\alpha$ -1,2,3,6 manosidasa (heterodímero: 44 y 66 kDa; 2U, carril 2) durante 2 horas en condiciones nativas. Tratamiento secuencial con PNGasa F durante 2 horas y posteriormente  $\alpha$ -1,2,3,6 manosidasa durante otras 2 horas (carril 4) y viceversa (carril 5). Entre los carriles 2 y 3 se muestran los marcadores de peso molecular utilizados y a la izquierda sus tamaños en kDa. Peso molecular de la PNGasa F: 36 kDa ; dímero  $\alpha$ -1,2,3,6-manosidasa: 44 y 66 kDa.

mediante SDS-PAGE (Figura 4.2, carril 3) donde se detectó una banda mayoritaria de unos 143 kDa, un tamaño claramente superior al teórico de 104 kDa (sin la secuencia señal de exportación) computada mediante la herramienta ExPASy Compute Mw/pl, lo que indicó que en principio esta proteína podría estar glicosilada. La proteína GAM1 se trató con endoglicosidasas para estudiar su grado de glicosilación, y a la vez intentar prepararla para su posterior cristalización (en colaboración con el grupo de Julia Sanz del IQFR). El tratamiento de GAM1 con PNGasa F, en condiciones nativas, redujo su tamaño en

aproximadamente 18 kDa, lo que supone una reducción de un 13% de su masa total (Figura 4.2, carril 1) mientras que la  $\alpha$ 1-2,3,6 manosidasa disminuyó su masa en 6 kDa, aproximadamente un 4% del total (Figura 4.2, carril 2). El tratamiento secuencial con ambas glicosidasas redujo la masa de GAM1 en 21 kDa, en la reacción PNGasa F seguida de  $\alpha$ 1-2,3,6 manosidasa (Figura 4.2, carril 4) y en 15 kDa (Figura 4.2, carril 5) cuando el orden de actuación de las enzimas desglicosilantes se invirtió, lo que supone una reducción del 15 y el 11% de la masa de GAM1, respectivamente.

GAM1 mostró un pH óptimo de actividad comprendido entre 4 y 6 unidades (Figura 4.3A) y resultó ser muy termosensible ya que a partir de 45°C se perdió completamente su actividad hidrolasa sobre maltosa (Figura 4.3B).



**Figura 4.3 Evaluación de la actividad hidrolasa de GAM1 a los valores de pH y temperatura indicados. A.** análisis del pH óptimo realizado a 37°C. **B.** Análisis de la actividad a distintas temperaturas realizada a pH 4,5. Se muestran las actividades relativas valorados sobre maltosa con GOD-POD en porcentaje al máximo obtenido de 0,5 U. Los ensayos se realizaron por triplicado con y se muestran los valores de desviación estándar.

La caracterización de la cinética enzimática de GAM1 se ajustó al modelo de Michaelis-Menten usando como sustrato la maltosa e isomaltosa. En la tabla 4.1 se muestran los datos de los parámetros cinéticos. La eficiencia catalítica de la enzima sobre los enlaces  $\alpha$ 1-4 fue

**Tabla 4.1 Parámetros cinéticos de GAM1**

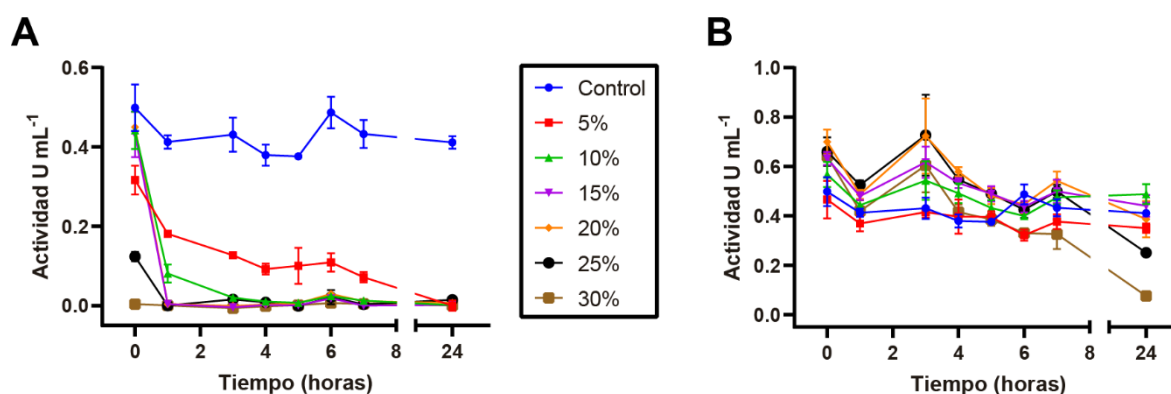
| Sustrato   | $V_{max}$<br>( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | $K_M$<br>(mM)   | $k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) | $k_{cat} K_M^{-1}$<br>( $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ ) |
|------------|---|-----------------|-------------------------------|--|
| Maltosa    | 3,16 $\pm$ 0,20   | 0,29 $\pm$ 0,08 | 472,97 $\pm$ 29,82            | 1615,33 $\pm$ 0,09   |
| Isomaltosa | 0,97 $\pm$ 0,07   | 0,30 $\pm$ 0,06 | 6,87 $\pm$ 0,47               | 22,57 $\pm$ 0,22   |

Medidas realizadas por triplicado. El valor de  $k_{cat}$  se calculó a partir de la  $V_{max}$  y el peso molecular teórico para enzima de 104 kDa. La desviación estándar se obtuvo mediante el ajuste a Michaelis-Menten de los datos en el módulo cinético de SigmaPlot 12.0.

más de 70 veces superior que sobre los  $\alpha$ 1-6 de la isomaltosa.



Se analizó también la estabilidad de GAM1 en los disolventes orgánicos dimetilsulfóxido (DMSO) y acetonitrilo (AcN) para evaluar su actividad en compuestos poco o nada miscibles con disoluciones acuosas (p.ej. polifenoles, glucósidos, etc.). En los ensayos se usaron concentraciones de estos compuestos del 5-30% (v/v), manteniendo la enzima en ellos a 37°C durante distintos tiempos y midiendo luego la actividad enzimática en las condiciones óptimas de pH y temperatura ya establecidas. La proteína se mostró muy sensible al AcN, disminuyendo su actividad tras solo 1 hora de incubación a concentraciones de 5 y 10% (v/v) e inactivándose rápidamente en el resto de condiciones usadas (Figura 4.4A). Tan solo al utilizar la menor concentración de AcN se conservó una actividad parcial de la enzima analizada hasta las 7 horas. Sin embargo, la estabilidad en DMSO no se vio tan afectada ya que la actividad se mantuvo prácticamente constante durante las primeras 7 horas del ensayo, e incluso al emplear concentraciones de 5-20% (v/v), hasta las 24 horas (Figura 4.4B). A concentraciones de 15-30% (v/v) DMSO se apreció incluso un aumento de la actividad enzimática con respecto al control. A las 24 horas de incubación en presencia de 25 y 30% (v/v) de DMSO dieron como resultado una disminución considerable en la actividad siendo mayor en esta última.

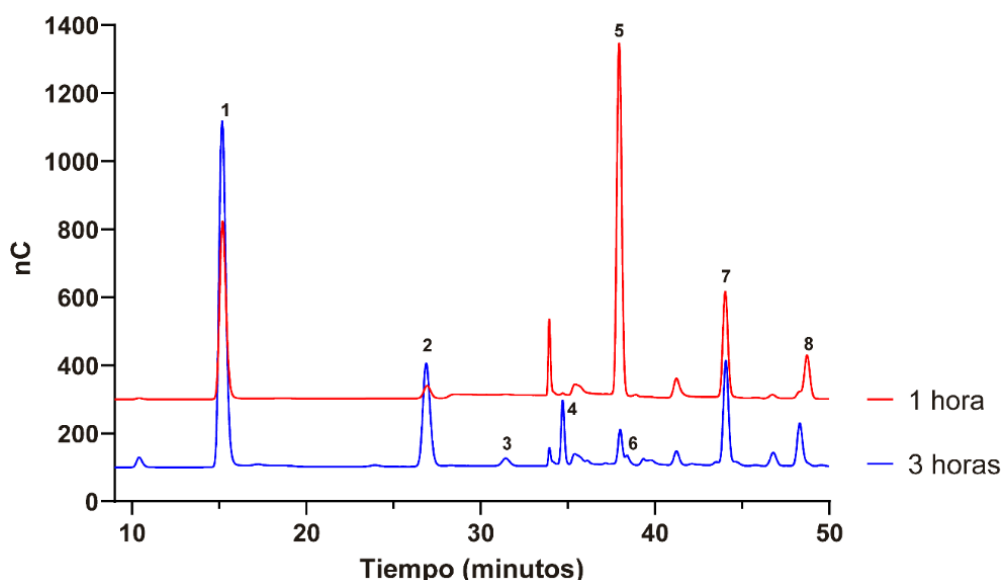


**Figura 4.4 Estabilidad en disolventes orgánicos de GAM1.** Estabilidad de GAM1 en disolventes orgánicos: **A.** Acetonitrilo y **B.** Dimetilsulfóxido (DMSO). Incubados a distintos tiempos a 37°C en distintas concentraciones de disolvente orgánico en porcentaje (v/v) tamponados con acetato sódico 50mM pH 4,5 tras lo cual se analizó la actividad en ese mismo tampón y 2mM de maltosa. El control se incubó solo con el tampón.

#### 4.1.4 Caracterización de la actividad transferasa de GAM1

El análisis de la actividad transferasa de la enzima GAM1 se realizó valorando la producción de isomaltooligosacáridos (IMOs) en reacciones que contenían maltosa como sustrato. El cromatograma generado mediante el análisis por HPAEC-PAD de la mezcla de reacción tras la primera hora ya mostró la presencia de una gran variedad de productos (Figura 4.5). En él se detectaron mayoritariamente señales debidas a IMOs que contienen algún enlace  $\alpha$ 1-6 glucosídico, como son la isomaltosa, la panosa y la isomaltotetraosa, aunque esta última con

una menor intensidad transcurridas 3 horas. También, tras una hora de reacción se detectó maltotriosa, que desapareció a las 3 horas. Se formó también un azúcar que contenía un enlace  $\alpha$ -1-2 glucosídico, la kojibiosa, y que generalmente también se incluye dentro de la clasificación de los IMOs a las 3 horas.

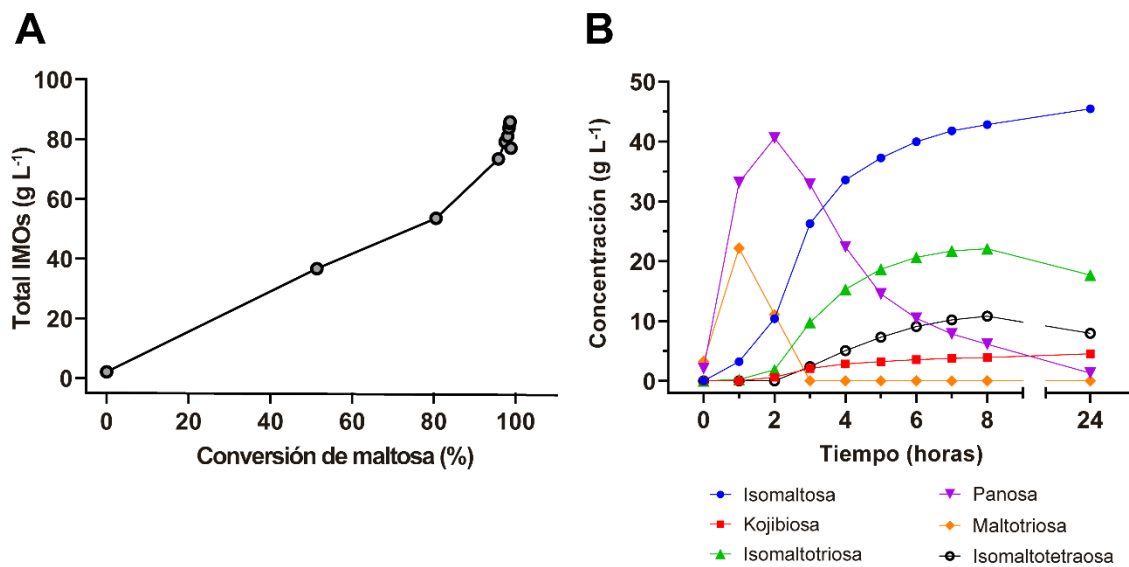


**Figura 4.5. Análisis HPAEC de la reacción de transglucosilación mediada por GAM1.** Se utilizó maltosa  $200 \text{ g L}^{-1}$  como sustrato y  $50 \text{ U mL}^{-1}$  de actividad enzimática. Se muestran los cromatogramas obtenidos tras evaluar la composición de azúcares de la mezcla a las 1 y 3 horas de reacción a  $37^\circ\text{C}$ . Picos: 1. glucosa, 2. isomaltosa, 3. kojibiosa, 4. isomaltotriosa, 5. maltosa, 6. isomaltotetraosa, 7. panosa y 8. Maltotriosa.

La reacción de transglucosilación produjo un máximo de  $85 \text{ g L}^{-1}$  de IMOs (Figura 4.6), que se alcanzó cuando la conversión de maltosa (que es hidrolizada o transglucosilada) había alcanzado el 98%. GAM1 transformó el 50% de la maltosa inicial tras 1 hora de reacción y produjo  $36 \text{ g L}^{-1}$  de IMOs (Figura 4.6A). Los productos que alcanzaron una mayor concentración en las mezclas de reacción fueron la panosa ( $40,6 \text{ g L}^{-1}$ ) a las 2 horas y la isomaltosa ( $45,5 \text{ g L}^{-1}$ ) a las 24 horas (Figura 4.6B). La isomaltotriosa alcanzó los  $22 \text{ g L}^{-1}$  y la isomaltotetraosa cerca de los  $11 \text{ g L}^{-1}$ , ambas a las 8 horas de reacción. Además, la  $\alpha$ -glucosidasa GAM1 sintetizó  $4,5 \text{ g L}^{-1}$  de kojibiosa. Asimismo, cabe destacar que se sintetizaron también diferentes compuestos que no pudieron ser identificados por la falta de los patrones correspondientes y que en total representaban una importante proporción de los productos de la reacción analizada, aunque individualmente su proporción fue muy escasa.

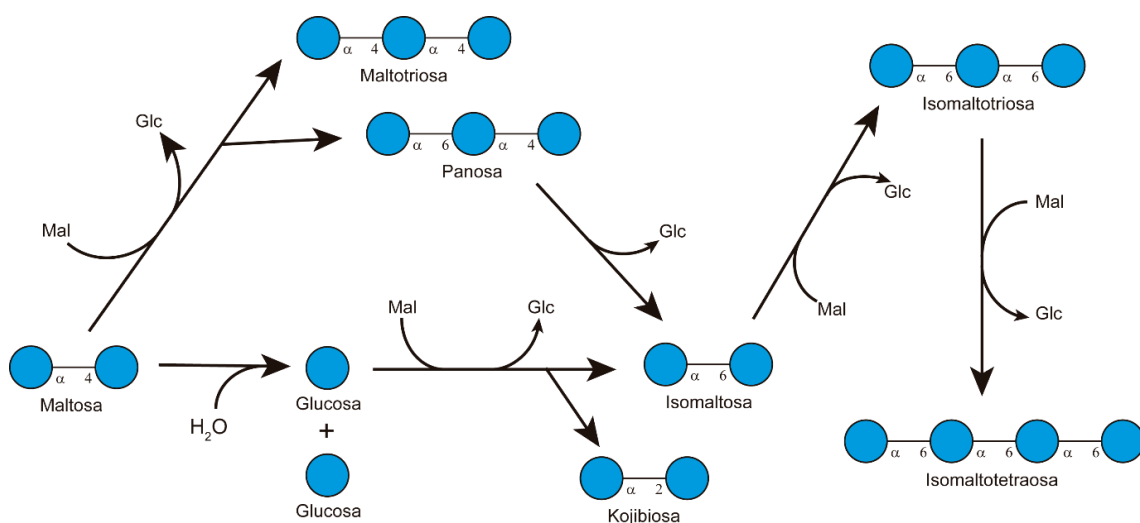
La síntesis de panosa se produjo inequívocamente por la transglucosilación de maltosa. La isomaltosa podría haberse producido por la transglucosilación de la glucosa y/o la hidrólisis de

panosa puesto que el disacárido sufre un importante incremento cuando el trisacárido disminuye en la mezcla de reacción. La isomaltotriosa y la isomaltotetraosa se detectaron en



**Figura 4.6 Análisis de la producción de IMOs mediada por GAM1. A.** Producción de IMOS totales respecto al porcentaje de maltosa convertida en la reacción. **B.** Cuantificación de los productos de transglucosilación referenciados a los tiempos de reacción indicados.

el momento en que la concentración de isomaltosa fue considerablemente alta, momento a partir del cual la cantidad de estos tres sacáridos continuó creciendo de una manera simultánea, lo que parece indicar que su formación se debe a la transglucosilación de isomaltosa e isomaltotriosa, respectivamente. En la Figura 4.7 se representan esquemáticamente las reacciones catalizadas por la  $\alpha$ -glucosidasa GAM1.

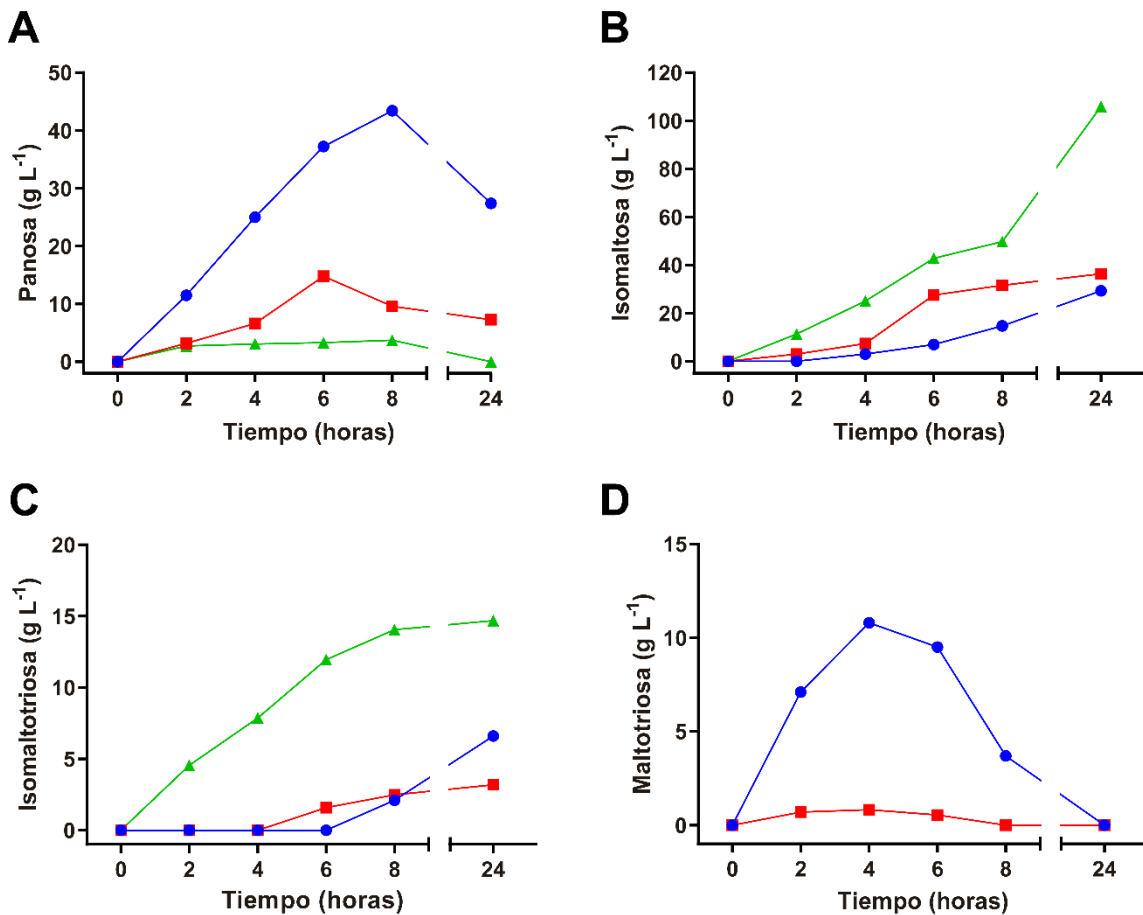


**Figura 4.7 Esquema de las reacciones catalizadas por GAM1 en reacciones basadas en maltosa.**

Maltosa: Mal y Glucosa: Glc

#### 4.1.5 Modulación de la actividad transferasa de GAM1 por la concentración de glucosa.

La glucosa es sin duda el producto de hidrólisis de maltosa mediada por GAM1 y además muy posiblemente el aceptor de unidades de monosacárido en la producción de IMOs. Por ello, nos propusimos estudiar como la adición de glucosa en la mezcla de reacción podía afectar a la actividad transferasa de la enzima de *S. occidentalis*. La reacción básica se llevó a cabo utilizando  $150 \text{ g L}^{-1}$  de maltosa a la que se le añadió  $150 \text{ g L}^{-1}$  o  $300 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa. Se realizó también una reacción control sin glucosa. Se analizó la composición de azúcares de las mezclas a distintos tiempos de reacción mediante HPLC-ELSD, tal y como se describe en el apartado 3.6.6.2. La adición de glucosa a la mezcla de reacción dio como resultado una inhibición de la síntesis del trisacárido panosa que fue mayor al aumentar la concentración del monosacárido (Figura 4.8A). La producción máxima del trisacárido se redujo a la tercera parte al utilizar la menor concentración de glucosa,  $43,4 \text{ g L}^{-1}$ , y a menos de la décima parte a la de mayor concentración,  $3,7 \text{ g L}^{-1}$  (Figura 4.8A). La síntesis de maltotriosa se bloqueó casi



**Figura 4.8 Transglucosilación con suplementación de glucosa.** Todas las reacciones se llevaron a cabo con maltosa  $150 \text{ g L}^{-1}$  y la enzima GAM1 a  $25 \text{ U mL}^{-1}$ . Se realizaron 3 reacciones, una suplementada con  $150 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa (rojo), otra con  $300 \text{ g L}^{-1}$  (verde) y una control sin suplementar (azul).

completamente al adicionar glucosa, ya que a la menor concentración del monosacárido utilizado se detectaron solo 0,8 g L<sup>-1</sup> del trisacárido (Figura 4.8D). La adición de 150 g L<sup>-1</sup> de glucosa incrementó levemente la cantidad de isomaltosa producida, 36,3 g L<sup>-1</sup> frente a los 29,3 g L<sup>-1</sup> del control, aunque se sintetizó a tiempos menores (Figura 4.8B), pero redujo hasta prácticamente la mitad la producción de isomaltotriosa (unos 6,6 g L<sup>-1</sup>) (Figura 4.8C). Sin embargo, la reacción que contenía 300 g L<sup>-1</sup> de glucosa alcanzó los 106 g L<sup>-1</sup> de isomaltosa, aproximadamente 3,5 veces más que la control, además de adelantar el tiempo en el que se sintetizó, del que se detectaron 11,4 g L<sup>-1</sup>, tras 2 horas (Figura 4.8B). Debido a que la concentración de isomaltosa se incrementó a tiempos más tempranos de reacción también la producción de isomaltotriosa se vio incrementada y adelantada por el monosacárido, detectándose un máximo de 14,7 g L<sup>-1</sup>, el doble que en la reacción control (Figura 4.8C).

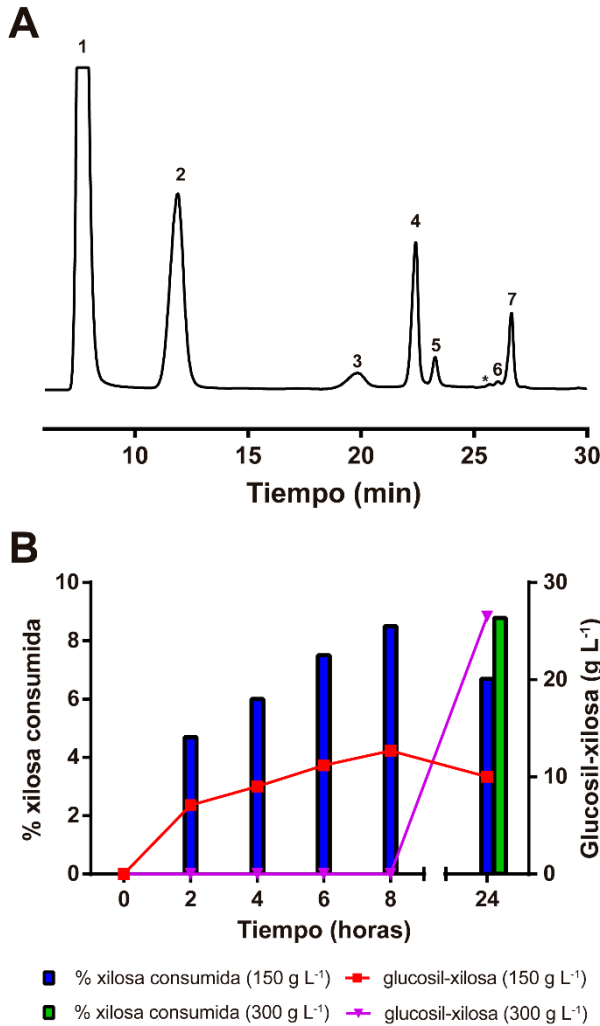
#### 4.1.6 Transglicosilación de aceptores glucosídicos y polifenoles

Las características de la  $\alpha$ -glucosidasa GAM1 para romper y crear nuevos enlaces glucosídicos, *a priori* la convierten en una potencial herramienta para la glicosilación de otros compuestos. Por lo que en este trabajo analizamos la capacidad de la enzima para utilizar como potenciales aceptores de glicosilación los azúcares xilosa, fructosa, glucosamina, galactosa, lactosa, celobiosa y sacarosa; así como los polifenoles epigallocatequina galato (EGCG), hidroquinona, hidroxitirosol y la polidatina. De entre todos los azúcares utilizados, solamente la xilosa y sacarosa produjeron nuevas señales en el análisis de las reacciones por HPLC. La celobiosa también fue aparentemente glicosilada, pero lamentablemente los compuestos formados parece que coelúan con la maltosa y los productos no pudiendo ser cuantificados (datos no mostrados). Entre los compuestos fenólicos utilizados tan solo se consiguió la glicosilación del piceido, un compuesto que ya tiene una unidad de glucosa unida mediante enlace  $\beta$ -glucosídico al resveratrol.

Todas las mezclas de reacción contenían maltosa como dador de glucosa y 150 o 300 g L<sup>-1</sup> de aceptor en el caso de la xilosa y la sacarosa. En el caso del piceido se utilizó una concentración de 20 mM (7,6 g L<sup>-1</sup>) disuelta en 20 % DMSO (apartado 3.6.1).

En el cromatograma de la reacción que contenía xilosa 300 g L<sup>-1</sup> se detectó la aparición de 2 nuevas señales, una mayoritaria y otra residual, inicialmente asociamos la mayoritaria a la formación de glucosil-xilosa (Figura 4.9A). El porcentaje de conversión máximo de xilosa fue similar en ambas condiciones de transglicosilación, 8,5 y 8,8%, aunque el consumo de xilosa solo se produjo a las 24 horas al usar la concentración de aceptor más alta (Figura 4.9B). Se produjeron 12,7 y 26,5 g L<sup>-1</sup> de glucosil-xilosa con 150 y 300 g L<sup>-1</sup> de aceptor, respectivamente (Figura 4.9B). La síntesis del producto con la menor concentración de aceptor tiene una producción sostenida y termina por hidrolizarse parcialmente al final del seguimiento de la

reacción, mientras que, en la reacción con alta concentración de aceptor, el producto solo se detecta a las 24 horas (Figura 4.9B).

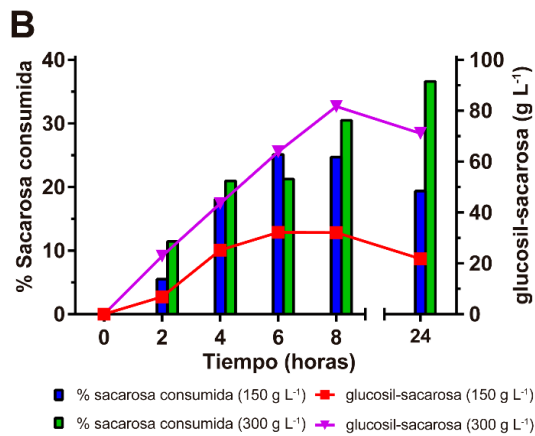
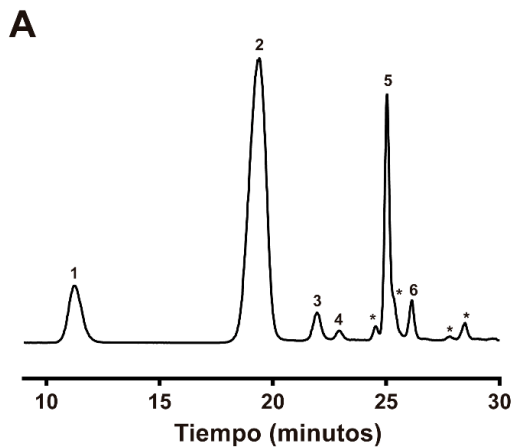


**Figura 4.9** Análisis de la reacción de transglucosilación en presencia de xilosa.

Las reacciones se llevaron a cabo con 25U mL<sup>-1</sup> de GAM1. **A.** Cromatograma de la mezcla de reacción de transglucosilación que contenía 200 g L<sup>-1</sup> de maltosa y 300 g L<sup>-1</sup> de xilosa, obtenido a las 24 horas. (1) xilosa; (2) glucosa; (3) glucosil-xilosa (4) maltosa; (5) isomaltosa; (6) maltotriosa; (7) panosa; (\*) compuestos sin identificar. **B.** Producción de glucosil-xilosa en relación al porcentaje de xilosa consumida con las dos concentraciones del aceptor de glucosilación utilizadas.

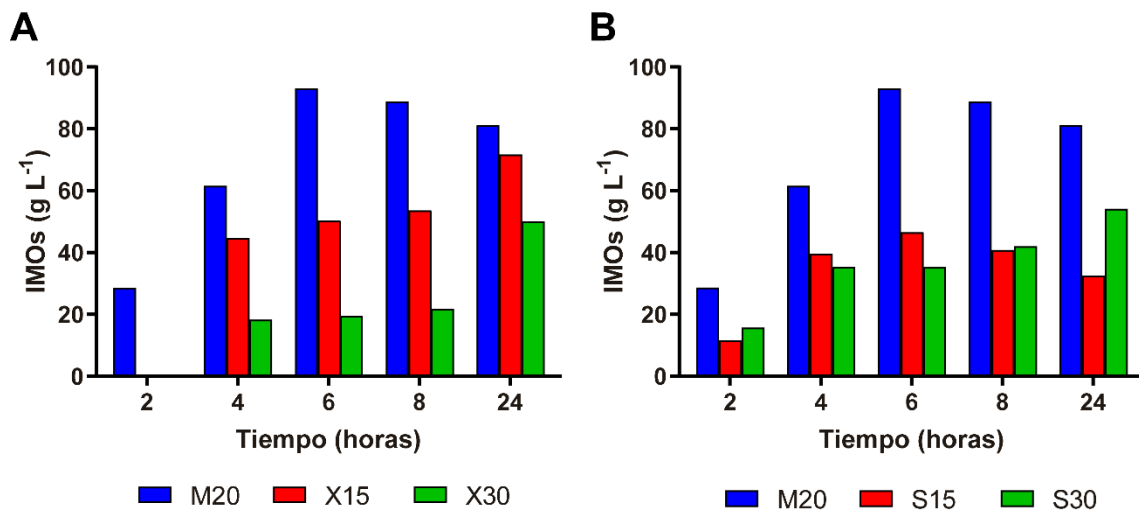
Las reacciones de transglucosilación que contenían sacarosa produjeron varias señales cromatográficas nuevas (4.10A), siendo solo una de ellas la mayoritaria. La máxima conversión de sacarosa fue de 25,1 y 36,9 % para 150 y 300 g L<sup>-1</sup> de sacarosa respectivamente (Figura 4.10B). El derivado glucosilado mayoritario detectado se produjo desde el inicio en ambas reacciones y fue hidrolizado tras 24 horas (Figura 4.10B). Con estas concentraciones del aceptor de glucosilación se detectaron concentraciones máximas de glucosil-sacarosa de 32 y 81,7 g L<sup>-1</sup> por lo que se incrementó en 2,5 veces la producción del heterooligosacárido formado al duplicar la cantidad de sacarosa en la reacción (Figura 4.10B).

La adición de ambos aceptores (xilosa y sacarosa) alteró la producción total de los IMOs valorados en la mezcla de reacción (isomaltosa, panosa e isomaltotriosa) (Figura 4.11). La presencia de xilosa claramente redujo la síntesis de IMOs que fue de aproximadamente el 80% a las 6 y 8 horas al usar el aceptor a 300 g L<sup>-1</sup> (Figura 4.11A). Además, no se detectaron



**Figura 4.10** Análisis de la reacción de transglucosilación en presencia de sacarosa. Las reacciones se llevaron a cabo con GAM1 25U mL<sup>-1</sup>. **A** Cromatograma de las mezclas de reacción de transglucosilación de la reacción que contenía 200 g L<sup>-1</sup> de maltosa y 300 g L<sup>-1</sup> de sacarosa tras 8 horas. (1) glucosa; (2) sacarosa; (3) maltosa; (4) isomaltosa; (5) teanderosa; (6) panosa; (\*) compuestos sin identificar. **B** Producción de glucosil-sacarosa en relación al porcentaje de sacarosa consumida con las 2 concentraciones de sacarosa utilizadas.

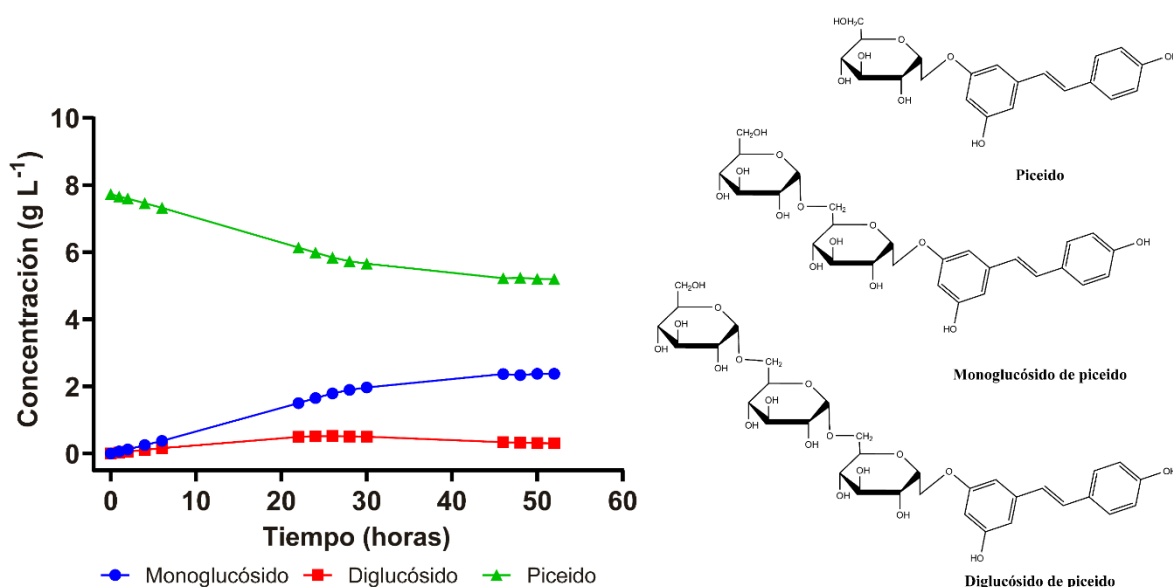
IMOs a las 2 horas de reacción en ninguna de las dos concentraciones de xilosa utilizadas (Figura 4.11A). Con 150 g L<sup>-1</sup> de xilosa reducción fue del 46% a las 6 horas (Figura 4.11A). Además, en ambas condiciones se detectó que la síntesis de IMOs revirtió parcialmente



**Figura 4.11** Análisis de la producción de IMOS en presencia de xilosa y sacarosa. **A** Producción de IMOS en presencia de xilosa 150 g L<sup>-1</sup> (X15), xilosa 300g L<sup>-1</sup> (X30) y el control con maltosa 200 g L<sup>-1</sup> (M20) sin xilosa. **B** Producción de IMOS en presencia de sacarosa 150 g L<sup>-1</sup> (S15), sacarosa 300g L<sup>-1</sup> (S30) y el control de maltosa 200 g L<sup>-1</sup> (M20) sin sacarosa. IMOS representa la suma de isomaltosa, panosa e isomaltotriosa. Las reacciones se llevaron a cabo con 25 U mL<sup>-1</sup> de GAM1.

transcurridas las 24 horas, y coincidiendo en el caso de la menor concentración de xilosa con la disminución de glucosil-xilosa (Figura 4.11A y 4.9B). La sacarosa alteró la síntesis de IMOs en una medida similar en ambas condiciones, reduciendo en un 50% y un 62% esta producción al usar la concentración más baja y más alta de aceptor, respectivamente (Figura 4.11B). En este caso, la reacción en 300 g L<sup>-1</sup> se revirtió parcialmente la producción de IMOs tras 24 horas (Figura 4.11B).

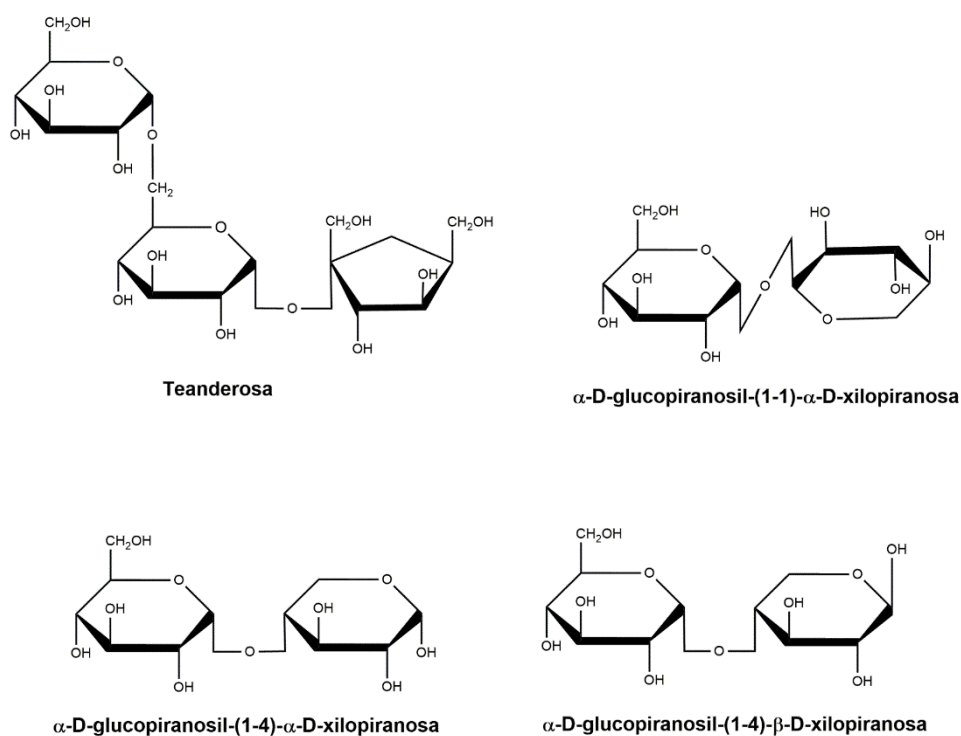
En colaboración con José Luis González del grupo de Francisco José Plou del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica realizamos el estudio de la capacidad de glucosilación de polifenoles. De todos los compuestos probados (epigallocatequina galato [EGCG], hidroquinona e hidroxitirosol) solamente la reacción de transglucosilación del piceido (polidatina) por la  $\alpha$ -glucosidasa GAM1 dio como resultado nuevos productos glucosilados. La reacción se monitorizó durante 52 horas, y se detectaron por HPLC-PDA dos compuestos glucosilados y uno minoritario (Figura S4). El producto de glucosilación mayoritario detectado en el análisis, tras 46 horas de reacción, fue el monoglucósido del piceido con una concentración aproximada de 3,4 g L<sup>-1</sup> (Figura 4.12 y S4). También se glucosiló el monoglucósido generado por la enzima, alcanzando el nuevo compuesto una concentración de aproximadamente 1 g L<sup>-1</sup> en el mismo tiempo de reacción (Figura 4.12). El producto minoritario (Figura S4) podría deberse a la glucosilación de resveratrol que debería ser generado previamente por la hidrólisis del piceido por la enzima pero GAM1 no mostró actividad hidrolítica en ensayos GOD-POD (Datos no mostrados).



**Figura 4.12 Análisis de la transglucosilación de piceido por GAM1.** La reacción contenía piceido 20 mM (7,6 g L<sup>-1</sup>), 300 g L<sup>-1</sup> de maltosa, 20% (v/v) de DMSO y 50 U mL<sup>-1</sup> de actividad enzimática GAM1 disueltos en acetato sódico 100 mM pH 4,5. La reacción se incubó a 37°C y a los tiempos indicados se analizaron mediante HPLC-PDA.



Los picos mayoritarios se purificaron por columna semipreparativa de HPLC (apartado 3.6.6.4) y los compuestos se analizaron por MS-ESI en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la UAM. En el caso de la xilosa glucosilada se detectó una señal mayoritaria de 335 m/z que correspondía a la masa atómica prevista de 312 Da para la glucosil-xilosa más el aducto de sodio (por el uso en el ensayo de NaI como fase ionizante) (Figura S5). De la misma manera la masa que generó la señal mayoritaria para la sacarosa glucosilada resultó ser la esperada de 504 Da (más el sodio) (Figura S6). El análisis de los productos de la glucosilación del piceido mostraron masas de 737; 575 y 413 Da que corresponden a las masas del



**Figura 4.13 Estructura de los sacáridos formados por transglucosilación.**

diglucósido, monoglucósido de piceido y al resveratrol glucosilado (Figura S7, S8 y S9). Además, se analizaron por RMN los dos productos de glucosilación purificados en colaboración con el grupo de Ana Poveda del CIC bioGUNE (Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias). El pico correspondiente a la xilosa glucosilada resultó ser  $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-4)- $\alpha$ -D-xilopiranososa, detectándose los anómeros alfa y beta de la xilopiranososa. Además, se formó otro producto minoritario que se identificó como  $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-1)- $\beta$ -D-xilopiranososa, un disacárido no reductor. En cuanto, a la sacarosa glucosilada, el trisacárido formado se identificó como el  $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-6)- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1-2)- $\beta$ -D-fructofuranosa, conocido como teanderosa (Figura 4.13).

El análisis RMN de los productos de glucosilación de piceido mostraron que los productos formados tanto del diglucósido como de monoglucósido estaban formados por enlaces  $\alpha$ 1-6

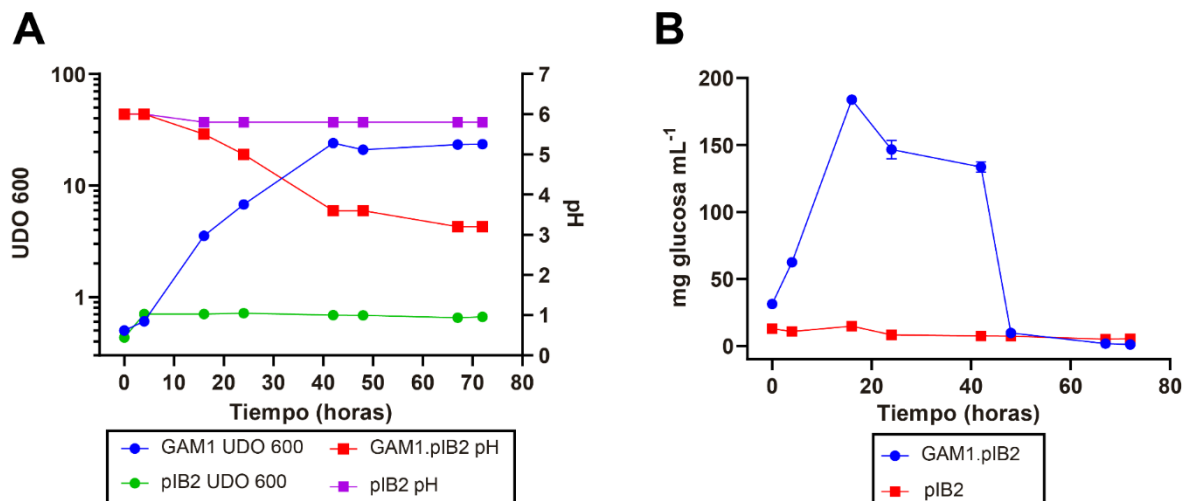
con proporciones de las configuraciones *cis:trans* en 1:1,2 y 2:5, respectivamente (Figuras S10 y S11). El producto minoritario estaba formado principalmente por piceido pero se observaron señales de un producto minoritario que resultó ser el monoglucósido de piceido con enlace  $\alpha$ 1-4 (Figura S12).

#### 4.1.7 Reacción de transglucosilación *one-pot*

La levadura *P. pastoris* carece de enzimas capaces de romper la maltosa, además, es incapaz de usar este azúcar como fuente de carbono. Por tanto, se planteó el uso de esta levadura transformada con la construcción GAM1.pIB2 para la expresión constitutiva de la  $\alpha$ -glucosidasa en cultivos con medio BMMal (medio mínimo tamponado con maltosa 10% p/v) para evaluar la producción de IMOs y a la vez eliminar la presencia de glucosa.

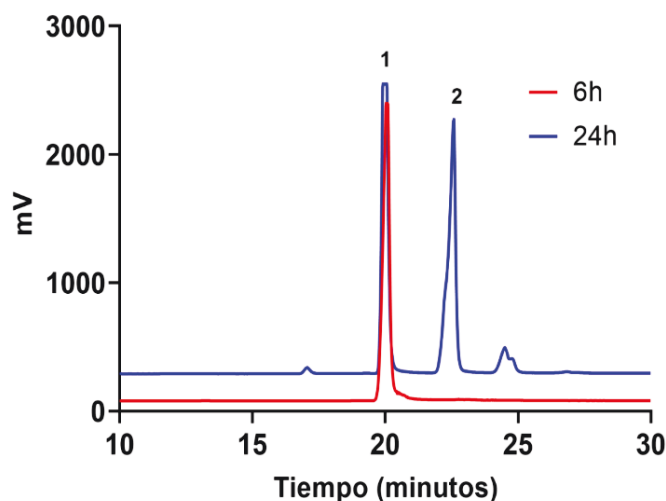
El crecimiento del transformante, monitorizado a 600 nm, que incluía la construcción GAM1.pIB2 fue normal, pero tal como se esperaba no se observó crecimiento alguno con el que incluía el vector vacío (Figura 4.14A). El ligero crecimiento del transformante que se aprecia en el último caso muy probablemente se debe a que la maltosa utilizada en el cultivo contiene una pequeña cantidad de glucosa, tal y como revela la medida por GOD-POD (Figura 4.14B). En el cultivo del clon GAM1.pIB2 la presencia de glucosa se incrementó hasta cerca de 200 mg mL<sup>-1</sup> a las 18 horas y fue descendiendo hasta desaparecer a las 48 horas (Figura 4.14B).

El análisis de la producción de IMOs mediante HPLC-ELSD detectó la presencia de maltosa y panosa (Figura 4.15) tras 24 horas de cultivo, y no se observó glucosa (pico esperado a los



**Figura 4.14** Crecimiento del transformante de *P. pastoris* que incluye la construcción GAM1.pIB2 y presencia de glucosa en la reacción *one-pot*. Cultivo de la levadura- transformada con GAM1.pIB2 y pIB2 en medio BMMal (10% maltosa). **A.** Evolución del crecimiento del cultivo (UDO 600nm) y pH. **B.** Medida de la cantidad de glucosa presente en el medio mediante GOD-POD.

12,5 minutos) a pesar de haber sido detectado este azúcar mediante GOD-POD (Figura 4.14B). También, se detectaron otros picos que no pudieron ser identificados. A las 48 horas los picos presentes en el análisis no correspondían con ninguno de los identificados y su señal fue muy baja (datos no mostrados), probablemente debido a que el cultivo ya se encontraba en estado estacionario y el pH había descendido a 3.



**Figura 4.15** Cromatogramas de la reacción *one-pot* en cultivos de *P. pastoris-GAM1.pIB2*. Se muestran los perfiles obtenidos mediante HPLC-ELSD a los tiempos indicados. (1) maltosa, (2) panosa.

Debido a que fue posible la producción de al menos un IMO en estas condiciones, la panosa, se decidió escalar la reacción de su producción a un fermentador *fed-batch* y tratar de aumentar la aireación para aumentar en lo posible al consumo de glucosa.

El cultivo en fermentador se realizó en el medio FBMS suplementado con las trazas PTM1 y maltosa a una concentración final del 5% (p/v) con un grado de pureza del 92% (Apartado 3.6.6.2). Previamente se hicieron crecer los inóculos en medio BMG y se inocularon en el fermentador a una densidad óptica de 2,32 UDO a 600nm. La actividad de GAM1 se detectó en el fermentador prácticamente desde el inicio del cultivo, aunque el valor máximo de proteína detectada, unos 0,5 mg mL<sup>-1</sup> no se alcanzó hasta transcurridas 40 horas (Figura S5). Las alícuotas tomadas del fermentador a distintos tiempos, ya libres de células, se analizaron por HPAEC-PAD por su mayor resolución debido a que en estas condiciones no fue posible separar la mezcla de fermentación por HPLC-ELSD. La señal correspondiente a panosa se detectó transcurridas 9 horas y solo hasta las 24 horas (Figura 4.16). La maltosa fue hidrolizada por completo por la enzima y hasta las 24 horas no se detectó una producción sustancial de glucosa que fue posteriormente desapareciendo. A las 29 horas, y debido a la limitación de la alimentación del fermentador con maltosa, solo se detectó glucosa, una pequeña señal de isomaltosa y arabitol, probablemente producto de la utilización por el metabolismo fermentativo de glucosa de *P. pastoris* (Figura 4.16).

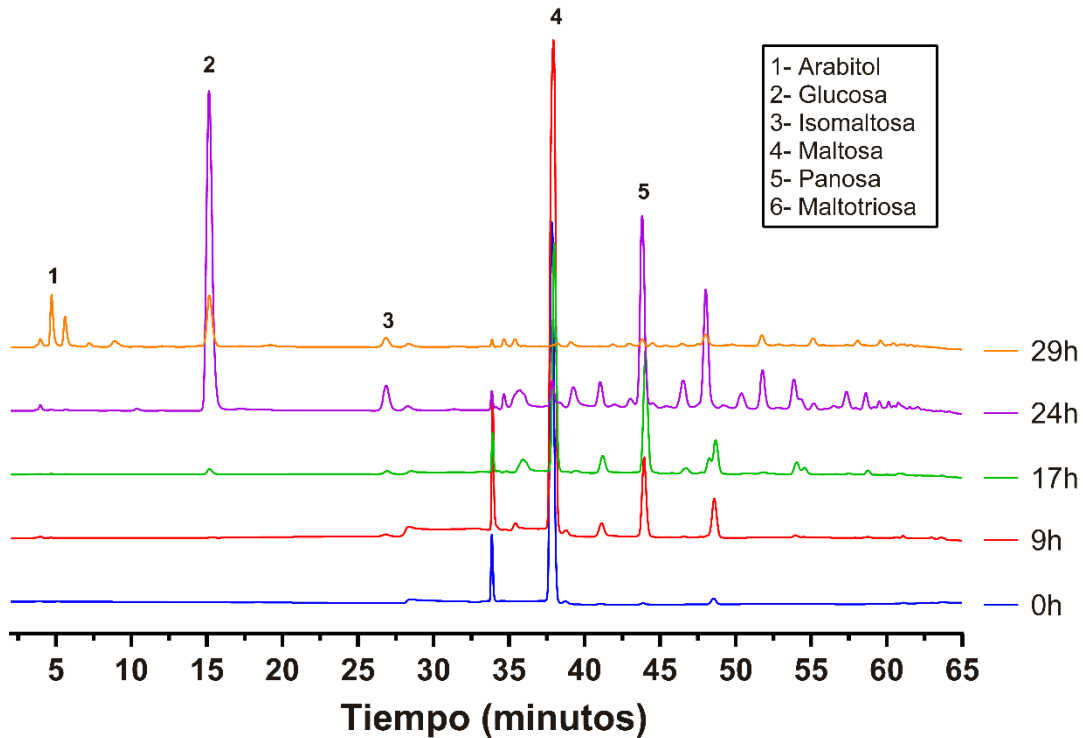


Figura 4.16 Cromatogramas de los productos de la reacción *one-pot* en fermentador *batch* alimentado del cultivo del transformante GAM1 pIB2. Cromatogramas de HPAEC-PAD de los productos de transglucosilación del fermentador con medio FEMS, 5% (p/v) de maltosa y sales PTM. Fue alimentado con maltosa al 40% (p/v). La maltosa tenía una pureza del 92%.

## 4.2 Estudio estructural de GAM1

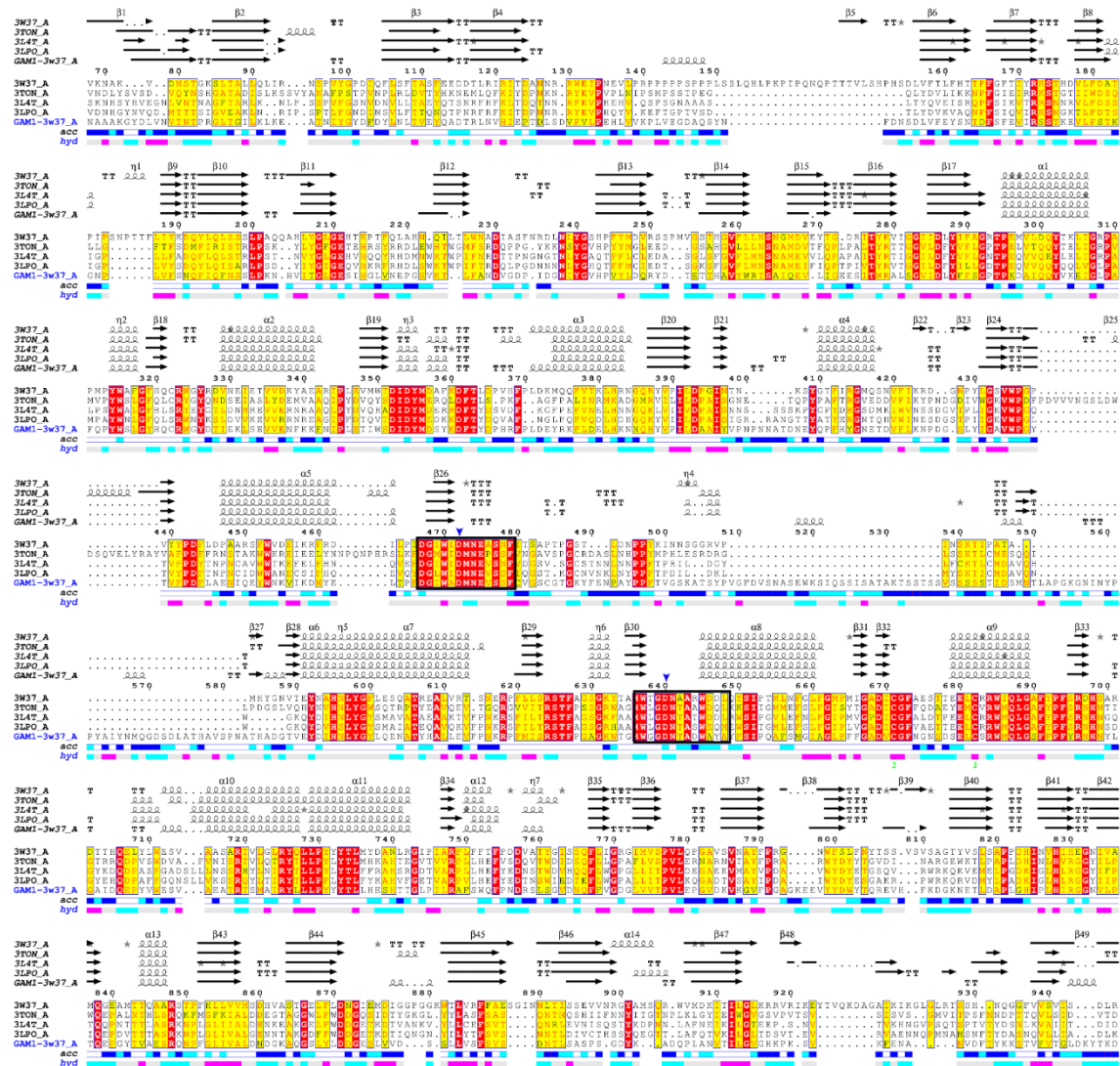
### 4.2.1 Estudio de la secuencia y estructura de GAM1

La secuencia proteica de la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. occidentalis*, GAM1, se analizó mediante la herramienta Swiss-Model para generar un modelo 3D de su estructura proteica. Inicialmente, se generaron varios modelos basados en las secuencias de las proteínas más homologas y estructuralmente resueltas. Los mejores resultados se obtuvieron con las  $\alpha$ -glucosidasas de *Beta vulgaris* (PDB:3W37), con la subunidad N-terminal de la maltasa-glucoamilasa (NtMGAM) intestinal humana (PDB: 2QMJ y 3L4W) y el de la sacarasa-isomaltasa (NtSI) intestinal humana (PDB: 3LPO) con los que se obtuvieron modelos muy similares en fidelidad. En este trabajo se escogió el modelo de la  $\alpha$ -glucosidasa de *B. vulgaris* y posteriormente el de NtSI.

En el modelo generado para GAM1 se observó la característica estructura de barril  $(\beta/\alpha)_8$  de la familia glicosil-hidrolasa 31 (GH31) y en general una gran similitud estructural con la MGAM y la SI humanas (Figura S.4), además de con la proteína usada como referencia para el modelo generado, la  $\alpha$ -glucosidasa de *B. vulgaris*. Se localizaron también las secuencias conservadas  $W_i/h\mathbf{D}MNEa/p/v$  y  $HWt/l/g\mathbf{D}Na/tA$  en las proximidades de los dos aspartatos

catalíticos, tanto el nucleófilo (D472) como el donador de protones (D640) responsable de la reacción ácido-base, respectivamente (subrayados y en negrita) (Figura 4.17).

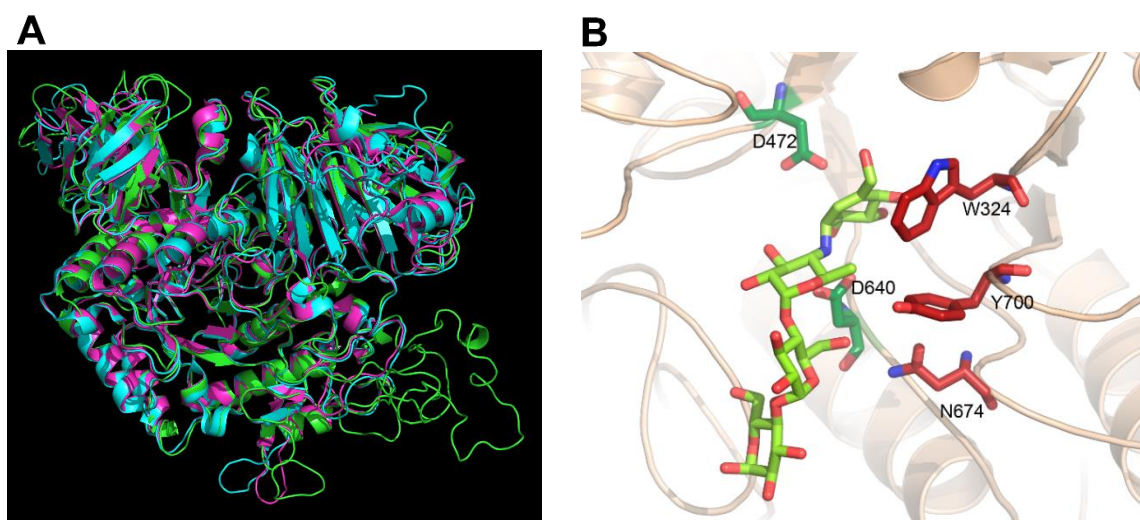
El modelo de GAM1 generado se alineó casi perfectamente con las estructuras de la subunidad N-terminal de la sacarasa-isomaltasa y de la maltasa-glucamilasa (Figura 4.18A).



**Figura 4.17 Alineamiento estructural de secuencias.** Resultado del alineamiento masivo de secuencias del modelo de GAM1 creado en referencia a la  $\alpha$ -glucosidasa de *Beta vulgaris* frente a las 47 secuencias más homólogas obtenidas por ENDscript 2.0 (solo se muestran las 4 secuencias con mejor alineamiento). Las estructuras secundarias se muestran en la parte superior (hélices con espirales,  $\beta$ -láminas con flechas y vueltas con las letras TT). Debajo de las secuencias se muestran 2 barras: la primera muestra la accesibilidad (acc) del disolvente (azul: accesible, cian: intermedio y blanco: enterrado/oculto) y la segunda muestra la hidrofobicidad (hyd) de los residuos (rosa: hidrofóbico, blanco: neutro y cian hidrofílico). Los residuos similares están marcados en amarillo, los idénticos en rojo y los residuos catalíticos con una flecha azul apuntando hacia abajo en la parte superior. Los motivos conservados de la región catalítica están enmarcados en negro. Se muestran las secuencias representativas:  $\alpha$ -glucosidasa de *B. vulgaris* (PDB: 3W37), los dominios C-terminal (PDB: 3TON) y N-terminal de la maltasa-glucoamilasa humana (PDB: 3L4T) y de la sacarasa-isomaltasa humana (PDB: 3LPO).

En la mayor parte del alineamiento se apreció una gran homología entre estas tres proteínas salvo en un largo *loop* detectado entre las posiciones 509 y 590 de GAM1 (Figura 4.18A).

En colaboración con el grupo de Julia Sanz Aparicio del Departamento de Cristalografía y Biología Estructural del Instituto de Química Física Rocasolano (IQFR, CSIC) se estudió el centro catalítico del modelo generado y, mediante inspección visual, se propusieron varios residuos aminoacídicos que potencialmente podrían estar implicados en la especificidad de la actividad enzimática para su modificación por mutación puntual. De este modo, los residuos D472 y D640 identificados como los catalíticos de GAM1 se sustituirían por alanina para comprobar su funcionalidad y obtener variantes inactivas de la enzima (Figura 4.18B). Además, los residuos W324, N674 e Y700 situados en el bolsillo catalítico y que *a priori* podrían ser responsables de la especificidad en la actividad transglucosilasa de la enzima también fueron modificados (Figura 4.18B). Según el modelo generado, el residuo W324 afectaría al subsitio -1, el Y700 al subsitio +1 y finalmente el residuo N674, un residuo poco conservado, en principio podría estar implicado en la especificidad del subsitio +2 y también,



**Figura 4.18 Alineamiento estructural.** **A.** Alineamiento del modelo por homología basado en la  $\alpha$ -glucosidasa de *Beta vulgaris* (PDB:3W37) en verde, alineado con la subunidad N-terminal de la sacarasa-isomaltasa humana en azul cian (PDB: 3LPO) y la subunidad N-terminal de la maltasa-glucoamilasa humana en magenta (PDB: 2QMJ). **B.** Centro catalítico ampliado del modelo 3D. En verde oscuro se muestran los residuos catalíticos y en rojo los residuos estudiados por mutagénesis dirigida. En verde pistacho se representa la acarbosa.

en cierta medida, en la del subsitio +1 (Figura 4.18B). La posición Y700 fue sustituida por alanina, histidina, glicina, serina y treonina (A, H, G, S y T). De esta manera, se trató de cambiar la especificidad de GAM1 intentando crear más espacio en el bolsillo catalítico en mayor o menor medida. Además, con la sustitución Y700H se pretendía generar un menor incremento de espacio, pero también aportar una carga positiva en la cadena lateral del

residuo sustituido. La mutación W324F, en principio más conservadora, a priori permitiría generar mayor espacio en el subsitio -1. Las sustituciones propuestas para el residuo N674 fueron N674T/A/F.

#### 4.2.1 Obtención y caracterización cinética de las variantes de GAM1 generadas

Se generaron las variantes enzimáticas propuestas utilizando mutación puntual y oligos específicos (apartado 3.5.3) y en su mayoría fueron expresados heterológamente con éxito en *P. pastoris*. La presencia de proteína se comprobó en SDS-PAGE (datos no mostrados) y todas las variantes generadas fueron purificadas a partir del medio extracelular de *P.pastoris* usando filtración tangencial. Las variantes D472A y D640A no mostraron actividad hidrolítica alguna por GOD-POD, a pesar de que ambas fueron expresadas perfectamente con buenos niveles proteicos, confirmando que los residuos modificados eran los catalíticos. En cuanto al resto de variantes, se consiguieron expresar heterológamente las que incluían las sustituciones W324F, N674F/T e Y700H/A/T/G. Se analizó su actividad por GOD-POD y se calcularon sus parámetros cinéticos sobre maltosa (Tabla 4.2). Las variantes del residuo Y700 que más vieron afectada su eficiencia catalítica fueron las que incluían las sustituciones Y700T/S, y que presentaban eficiencias unas 8 y 6 veces menor, respectivamente, en relación al control de la enzima *wildtype* (wt) (Tabla 4.2). La eficiencia catalítica de Y700H se redujo a casi la mitad (Tabla 4.2). En cuanto a las sustituciones de Y por G y A, no ejercieron un gran cambio en la eficiencia de la enzima (Tabla 4.2). Las sustituciones por Phe y Thr del residuo N674 provocaron una disminución de la eficiencia catalítica de 3,7 y 4,7 veces, respectivamente, y la sustitución W324F aparentemente no generó modificaciones significativas en los parámetros cinéticos de GAM1 de la enzima (Tabla 4.2).

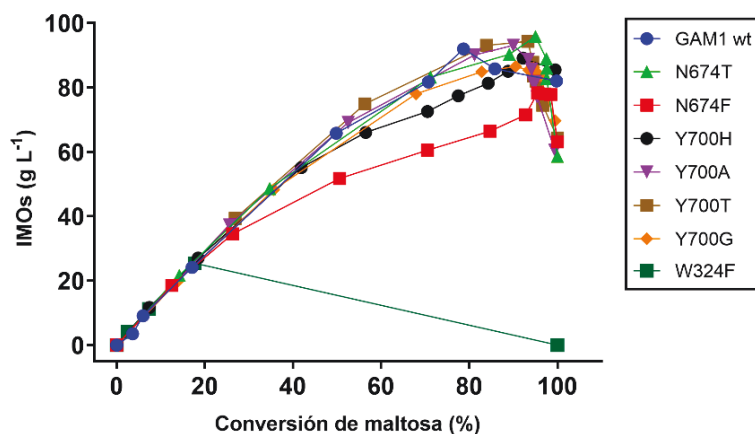
Tabla 4.2 Parámetros cinéticos de los mutantes de GAM1

| Mutante | $V_{max}$<br>( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | $K_M$<br>(mM) | $k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) | $k_{cat} K_M^{-1}$<br>( $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ ) |
|---------|---|---------------|-------------------------------|--|
| Y700G   | 0,70 ± 0,02   | 0,28 ± 0,04   | 426,87 ± 13,39                | 1533,30 ± 0,04   |
| Y700T   | 0,94 ± 0,04   | 0,91 ± 0,05   | 177,32 ± 5,53                 | 194,26 ± 0,05  |
| Y700A   | 1,00 ± 0,03   | 0,46 ± 0,07   | 623,35 ± 19,42                | 1366,09 ± 0,04   |
| Y700S   | 1,00 ± 0,03   | 0,83 ± 0,07   | 224,82 ± 5,67                 | 270,84 ± 0,04  |
| Y700H   | 1,23 ± 0,05   | 0,38 ± 0,06   | 343,52 ± 14,49                | 900,46 ± 0,06  |
| N674F   | 0,30 ± 0,16   | 0,22 ± 0,03   | 101,95 ± 53,03                | 437,07 ± 0,74  |
| N674T   | 0,53 ± 0,14   | 0,33 ± 0,05   | 112,21 ± 29,76                | 344,40 ± 0,38  |
| W324F   | 3,20 ± 0,16   | 0,26 ± 0,05   | 443,16 ± 42,92                | 1721,02 ± 0,11   |
| GAM1 wt | 3,156 ± 0,20  | 0,29 ± 0,07   | 472,97 ± 29,82                | 1615,33 ± 0,09   |

Medidas realizadas con maltosa por triplicado. El valor de  $k_{cat}$  se calculó con la  $V_{max}$  y el peso molecular teórico de 104 kDa. La desviación estándar se obtuvo mediante el ajuste al modelo de Michaelis-Menten de los datos en el módulo cinético de SigmaPlot 12.0.

#### 4.2.2 Evaluación de la actividad transferasa de las variantes proteicas formadas

El análisis de la actividad transferasa de las variantes proteicas generadas se realizó utilizando maltosa como sustrato (Figuras 4.19 y 4.20). Como controles se usaron reacciones con la enzima wt y solo la mezcla de reacción (apartado 3.6.6.1). No fue posible expresar en



**Figura 4.19 Producción de IMOs totales generados por las variantes que incluyen las sustituciones indicadas vs conversión de maltosa.**

La conversión de maltosa se muestra en porcentaje. El total de IMOs representa la suma de isomaltosa, panosa e isomaltotriosa. Todas las reacciones se realizaron con una concentración inicial de maltosa 200 g L<sup>-1</sup> y 25 U mL<sup>-1</sup> de actividad enzimática GAM1 a pH 4,5 y 37°C. Las reacciones se siguieron durante 24 horas.

cantidades suficientes la variante GAM1-Y700S como para realizar el estudio de su actividad transferasa. La producción total de IMOs apenas se vio afectada al utilizar las distintas variantes ensayadas, a excepción de al usar las variantes que portaban las sustituciones W324F y N674F, con las que se produjo una disminución drástica y un ligero descenso de productos de transglucosilación, respectivamente (Figura 4.19). La síntesis de isomaltosa se detectó desde el inicio de la reacción en las variantes del residuo N674 llegando a triplicar la producción la variante que incluía Thr y a cuádruplicar la que contenía Phe a las 6 horas de reacción (Figura 4.20A, Tabla 4.3). De manera análoga, se detectó también isomaltosa desde el inicio de la reacción con los mutantes de la posición Y700, aunque el incremento del disacárido fue menor en relación al control (Figura 4.20B). Sin embargo, la cantidad total producida tras 24 horas fue similar en todas las variantes y el wt (Figura 4.20A y B, Tabla 4.3). La concentración máxima de panosa también se adelantó en el caso de la variante GAM1-N674T, pero no sobrepasó el nivel producido por la variante wt (Figura 4.20C) mientras que la sustitución N674F generó su reducción en más del 50% (Figura 4.20C). Sin embargo, se

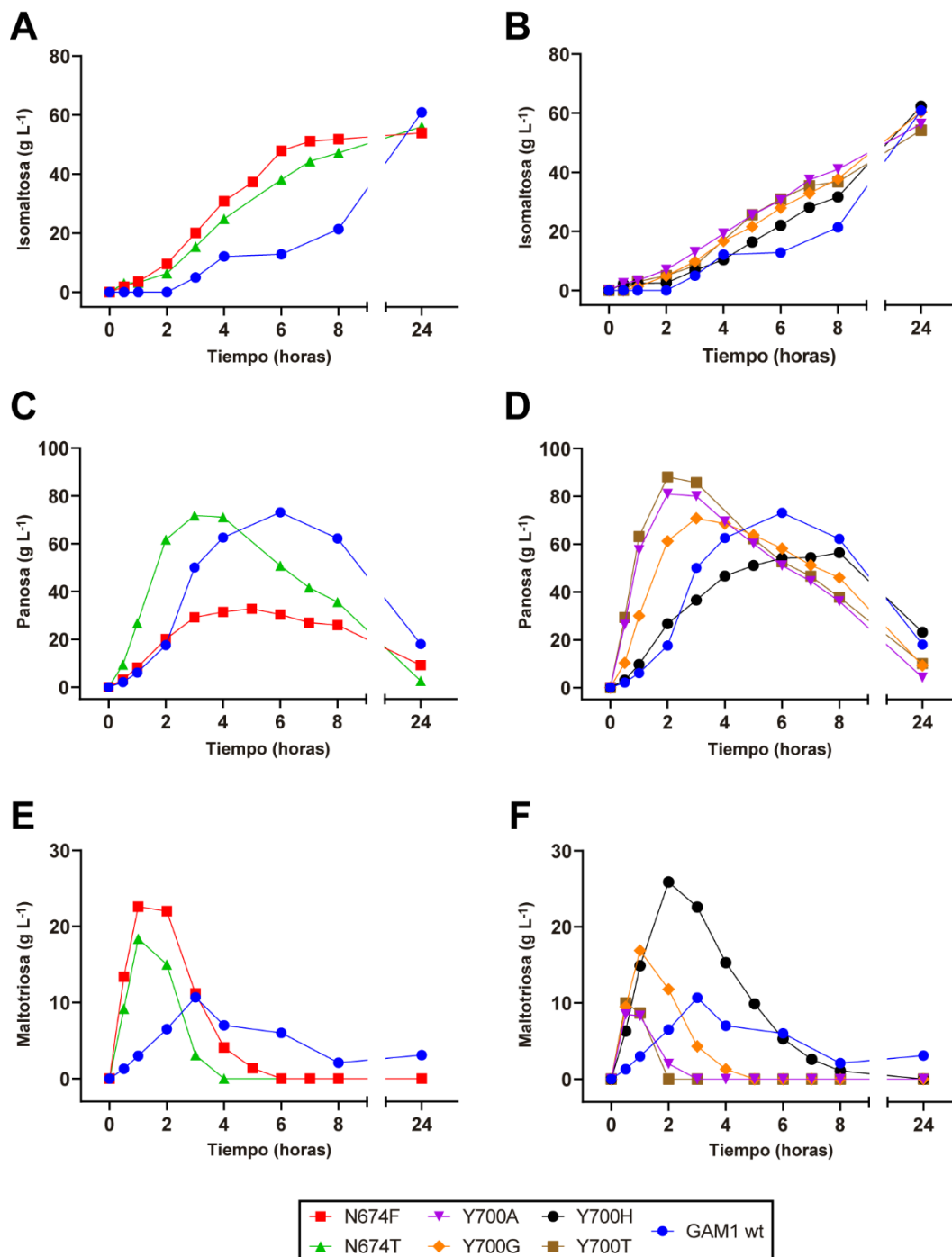
**Tabla 4.3 Máxima concentración de azúcares generados por las variantes indicadas**

|             | Productos de transglucosilación (g L <sup>-1</sup> ) |       |       |       |       |       |       |         |
|-------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
|             | N674F  | N674T | Y700A | Y700G | Y700H | Y700T | W324F | GAM1 wt |
| Isomaltosa  | 53,9   | 56    | 56,3  | 60,4  | 62,3  | 54,2  | N/D   | 60,9    |
| Panosa      | 32,8   | 71,8  | 81    | 70,8  | 56,4  | 88,1  | 6,7   | 73,1    |
| Maltotriosa | 22,6   | 18,4  | 8,5   | 16,9  | 25,9  | 10    | 18,7  | 10,7    |

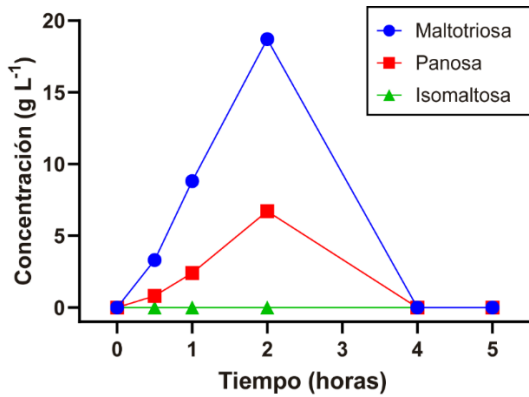
Concentración detectada por HPLC-ELSD. GAM1 wt se usó como control. Condiciones de reacción: maltosa 200 g L<sup>-1</sup>, 25 U mL<sup>-1</sup> de enzima, 37°C y pH 4,5.



observó un ligero incremento en la producción de panosa en el caso de las sustituciones Y700A e Y700T en 10 y 15 g L<sup>-1</sup>, a tiempos cortos de reacción (Figura 4.20D). Con la sustitución Y700H se redujo la producción máxima de panosa a 56 g L<sup>-1</sup> (Figura 4.20D, Tabla



4.3), mientras con las Y700H y N674F, que redujeron la síntesis de panosa, se incrementaron la producción de maltotriosa en 25 y 20 g L<sup>-1</sup> con respecto al control (Figura 4.20E y F, Tabla 4.3).



**Figura 4.21 Análisis de la actividad transferasa de la variante GAM1-W324F.** Productos de la reacción de transglucosilación referenciados obtenidos al usar 200 g L<sup>-1</sup> de maltosa y 25 U mL<sup>-1</sup> de actividad enzimática a 37°C y pH 4,5.

Mención aparte merece el mutante GAM1-W324F con el que la síntesis de IMOs se vio seriamente afectada ya que no llegó a producir isomaltosa y la de panosa alcanzó unos escasos 6,7 g L<sup>-1</sup>, mientras que la maltotriosa llegó a duplicar la concentración del control (Figura 4.21). Cabe destacar que después de 4 horas, esta variante había hidrolizado por completo todos los productos de la reacción (Figura 4.21).

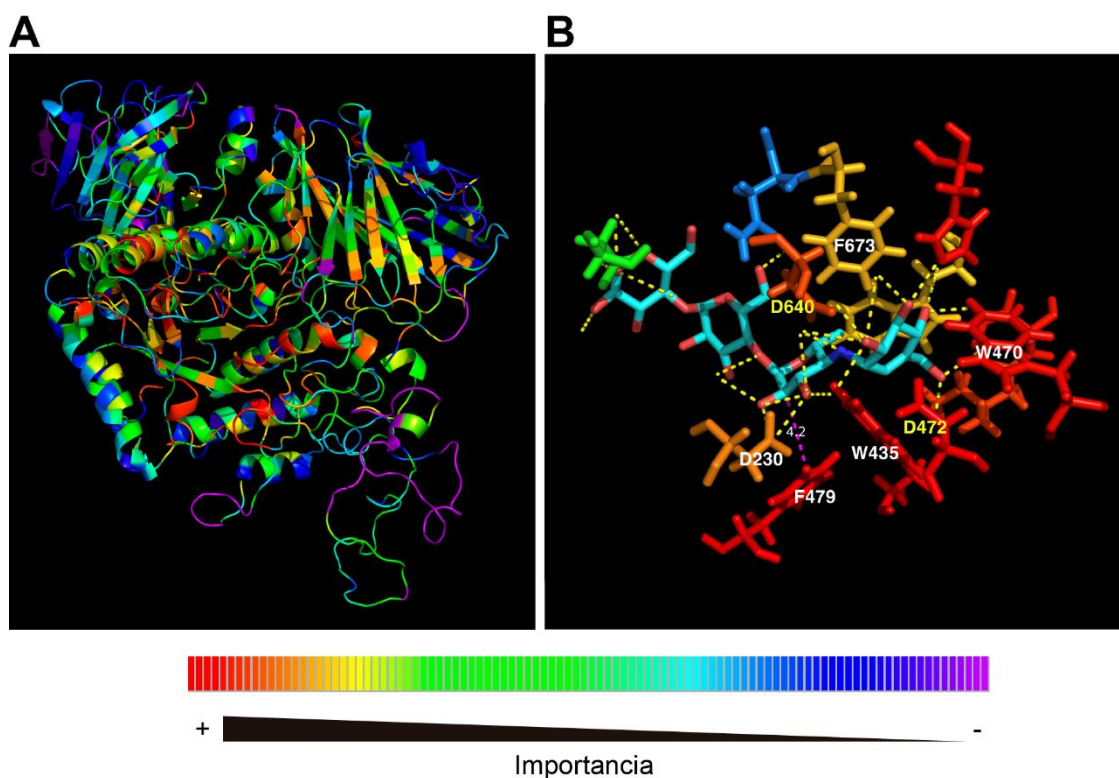
#### 4.2.3 Estudio del centro catalítico mediante análisis por *Evolutionary Trace*

Con el fin de profundizar en el estudio del centro catalítico de la enzima caracterizada en este trabajo, se decidió realizar un nuevo modelo de GAM1 utilizando Swiss-Model y en esta ocasión la proteína homóloga de la subunidad N-terminal de la sacarasa-isomaltasa humana (NtSI) que ya habíamos citado en el apartado 4.2.1. De nuevo, y como era de esperar, la estructura alineó perfectamente con la de proteínas con las que GAM1 tenía gran homología (Figura 4.22).



**Figura 4.22 Alineamiento estructural.** Alineamiento del modelo de GAM1 basado en la sacarasa-isomaltasa humana (PDB: 3LPO) en verde, alineado con la subunidad N-terminal de la sacarasa-isomaltasa humana en magenta (PDB: 3W37) y la subunidad N-terminal de la maltasa-glucoamilasa humana en azul cian (PDB: 2QMJ).

Se utilizó el servidor de traza evolutiva “*Evolutionary Trace server*” (ET) (Wilkins *et al.*, 2012) para analizar el modelo 3D de la enzima GAM1 generado con la herramienta online Swiss-Model (Figura 4.23A). ET utiliza un método filogenómico para identificar los residuos importantes en una proteína (Figura 4.23A y S5). Puntuó los distintos residuos mediante el alineamiento múltiple con gran cantidad de secuencias (210 en este caso) (Figura 4.23A y S5). Tras la puntuación de los residuos se alineó el modelo de GAM1 con la NtMGAM (PDB:2QMJ), cuya estructura acomplejada con acarbossa se encuentra resuelta y publicada en las bases de datos. Se centró el detalle en el centro catalítico de las dos proteínas alineadas y se observó que los residuos más conservados coincidían espacialmente (Figura 4.23B). Los residuos F673 y W470 interactuaban con la unidad de acarbossina, situada en el subsitio -1 de la GAM1 (Figura 4.23B). Ambos residuos están muy conservados, aunque W470 en mayor medida (Figura 4.23B). El primer anillo de glicona situado en el subsitio +1 interactuaba principalmente con los residuos D230 y el F479, ambos muy conservados, y en mayor medida el último (Figura 4.23B). Además, el residuo W435 parecía interactuar tanto en el subsitio +1 como en el subsitio -1 (Figura 4.23B).



**Figura 4.23 Análisis de la secuencia del modelo de GAM1 por *Evolutionary Trace*.** **A.** Modelo de GAM1 basado en NtSI (PDB:3LPO) con la asignación de las puntuaciones a los residuos de la secuencia por el servidor Evolutionary Trace. **B.** Detalle del centro catalítico previamente alineado con NtMGAM (PDB:2QMJ) que está acomplejado con la acarbossa donde se muestran por analogía las interacciones de los residuos previamente puntuados con ET. En la parte inferior se muestra la escala de colores con el gradiente de importancia para ambas imágenes (**A** y **B**).

#### 4.2.4 Obtención y caracterización cinética de los mutantes de GAM1 diseñados por *Evolutionary Trace*

A través de la aplicación ET, como ya se ha mencionado, los residuos de la enzima GAM1 fueron puntuados. Además, la herramienta facilitó los residuos alternativos en posiciones similares a las proteínas emparentadas (Tabla S2). Algunos de estos cambios de residuos eran muy drásticos. Los residuos altamente conservados ya comentados, como es el caso de W470 o F479 dieron como resultado de este análisis dos residuos (Ser y Leu) y uno (Lys), respectivamente, como alternativas presentes en la naturaleza. Atendiendo a las alternativas generadas por ET se realizaron distintas sustituciones en GAM1. Algunos de los cambios introducidos en la secuencia eran radicales (como W435K), aunque estaban presentes en enzimas homólogas. En general, el resto de las mutaciones se plantearon de manera que se creara más espacio en el bolsillo catalítico sin cambiar sustancialmente las propiedades de la cadena lateral de los residuos aminoacídicos sustituidos. En este caso, las sustituciones diseñadas y obtenidas por mutagénesis dirigida y expresadas heterológicamente en *P. pastoris* incluían las sustituciones: F673Y, W470F/Y, F479V/W, W435K/Y y D230N. Se comprobó nuevamente la expresión de proteínas por SDS-PAGE y las variantes enzimáticas se purificaron del medio extracelular de *P. pastoris* por concentración fraccionada.

Se analizaron las cinéticas de estas variantes mediante GOD-POD usando maltosa e isomaltosa como sustrato (Tabla 4.4). Todas las variantes presentaron un cambio en su eficiencia catalítica bastante notorio sobre maltosa, salvo la que incluía W470F (Tabla 4.4). El mutante que portaba la sustitución W435K mostró la mayor disminución de la  $k_{cat}/K_M$  que se produjo a tan solo  $0,2 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  ( $1615,33 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  del wt) y la  $K_M$  prácticamente duplicaba a la del wt (Tabla 4.4). También se redujo considerablemente la eficiencia catalítica sobre maltosa de la otra variante que afecta al mismo residuo, W435Y, a pesar de haberse realizado en principio un cambio más conservador, y aunque su  $K_M$  aumentó en menor medida (Tabla 4.4). Además, se redujo drásticamente la eficiencia catalítica sobre la isomaltosa, aunque su  $K_M$  fue menor a la del wt.

La sustitución D230N también disminuyó la eficiencia de la enzima sobre maltosa a  $13,8 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  y su  $K_M$  cuadruplicaba a la de la enzima nativa, además no mostró actividad con isomaltosa (Tabla 4.4). Sin embargo, las mutaciones en el residuo F479 provocaron un aumento en la eficiencia catalítica de esta enzima usando maltosa como sustrato, en el caso de la sustitución por un aminoácido más pequeño, la valina, y por el contrario el cambio por uno de mayor tamaño provocó una reducción en este parámetro (Tabla 4.4).

De manera similar, la actividad sobre isomaltosa obtuvo una eficiencia catalítica mayor en el caso de F479V que en de F479W, aunque ambas fueron menores que GAM1 wt, siendo más

drástica la reducción del valor de esta última (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4 Parámetros cinéticos de las variantes de GAM1 generadas por ET.**

| Mutantes | Sustrato   | $V_{max}$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | $K_M$ (mM)  | $k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) | $k_{cat} K_M^{-1}$ ( $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ ) |
|----------|------------|--|-------------|-------------------------------|---|
| F673Y    | Maltosa    | 3,21 ± 0,03  | 0,16 ± 0,01 | 536,39 ± 4,76                 | 3434,00 ± 0,04  |
|          | Isomaltosa | 1,01 ± 0,06  | 0,28 ± 0,05 | 7,88 ± 0,027                  | 27,75 ± 0,18  |
| W470Y    | Maltosa    | 3,26 ± 0,19  | 0,29 ± 0,01 | 283,38 ± 16,62                | 971,16 ± 0,04   |
|          | Isomaltosa | 1,70 ± 0,27  | 1,85 ± 0,45 | 2,50 ± 0,397                  | 1,35 ± 0,29   |
| W470F    | Maltosa    | 2,95 ± 0,04  | 0,35 ± 0,02 | 560,73 ± 7,25                 | 1582,65 ± 0,07  |
|          | Isomaltosa | 0,93 ± 0,07  | 0,43 ± 0,10 | 1,77 ± 0,135                  | 4,1 ± 0,24  |
| F479V    | Maltosa    | 3,24 ± 0,03  | 0,52 ± 0,02 | 1051,12 ± 10,36               | 2024,89 ± 0,04  |
|          | Isomaltosa | 0,89 ± 0,05  | 0,20 ± 0,04 | 1,28 ± 0,065                  | 6,23 ± 0,2  |
| F479W    | Maltosa    | 2,21 ± 0,03  | 0,55 ± 0,03 | 499,55 ± 0,38                 | 900,42 ± 0,05   |
|          | Isomaltosa | 0,78 ± 0,03  | 3,52 ± 0,28 | 1,80 ± 0,059                  | 0,51 ± 0,09   |
| W435Y    | Maltosa    | 3,87 ± 0,04  | 0,39 ± 0,02 | 89,02 ± 0,98                  | 228,43 ± 0,05   |
|          | Isomaltosa | 0,78 ± 0,04  | 0,36 ± 0,08 | 0,27 ± 0,015                  | 0,74 ± 0,22   |
| W435K    | Maltosa    | 1,47 ± 0,07  | 0,57 ± 0,09 | 0,12 ± 0,01                   | 0,21 ± 0,17   |
|          | Isomaltosa | N/D ± N/D  | N/D ± N/D   | N/D ± N/D                     | N/D ± N/D   |
| D230N    | Maltosa    | 3,98 ± 0,07  | 1,19 ± 0,06 | 16,46 ± 0,29                  | 13,84 ± 0,06  |
|          | Isomaltosa | - ± -  | - ± -       | - ± -                         | - ± -   |
| GAM1 wt  | Maltosa    | 3,16 ± 0,20  | 0,29 ± 0,08 | 472,97 ± 29,819               | 1615,33 ± 0,09  |
|          | Isomaltosa | 0,97 ± 0,07  | 0,30 ± 0,06 | 6,86 ± 0,47                   | 22,57 ± 0,22  |

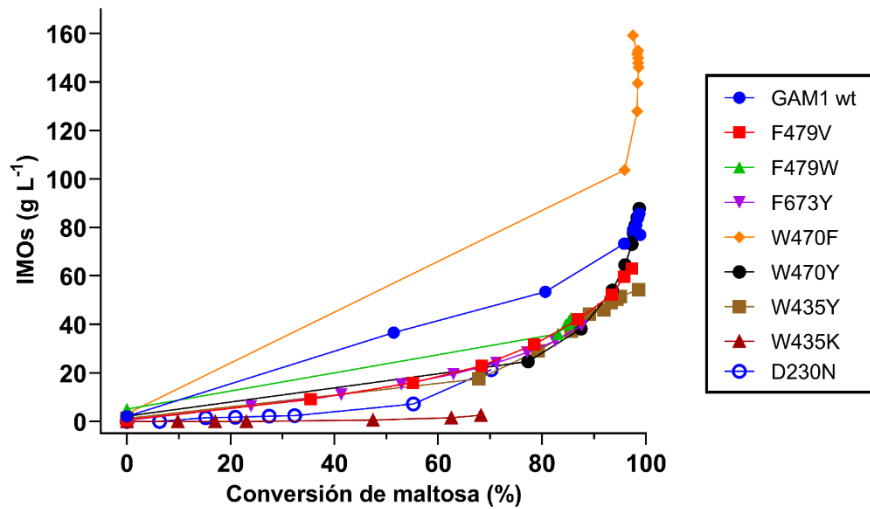
Medidas realizadas con maltosa por triplicado. El valor de  $k_{cat}$  se calculó con la  $V_{max}$  y el peso molecular teórico de 104 kDa. La desviación estándar se obtuvo mediante el ajuste al modelo de Michaelis-Menten con el módulo cinético de SigmaPlot 12.0.

En cuanto a los residuos que afectan al subsitio -1, el cambio F673Y provocó un incremento de la eficiencia catalítica superior al doble, así como una disminución del valor de  $K_M$  cercano a la mitad del control cuando se usó maltosa como sustrato (Tabla 4.4). Además, la eficiencia de la enzima al usar isomaltosa fue la más alta de todas las variantes utilizadas, incluido el wt (Tabla 4.4). La sustitución W470F, más conservadora, no mostró un cambio sustancial en la afinidad y la eficiencia catalítica de la variante generada al usar maltosa, pero la modificación a tirosina redujo tanto la eficiencia como la constante catalítica al 50%, si bien la  $K_M$  mostró valores similares al control (Tabla 4.4). Asimismo, las dos variantes del residuo W470 provocaron una reducción importante en la eficiencia enzimática sobre isomaltosa (Tabla 4.4).

#### 4.2.5 Caracterización de la actividad transferasa de los mutantes obtenidos mediante análisis por *Evolutionary Trace*

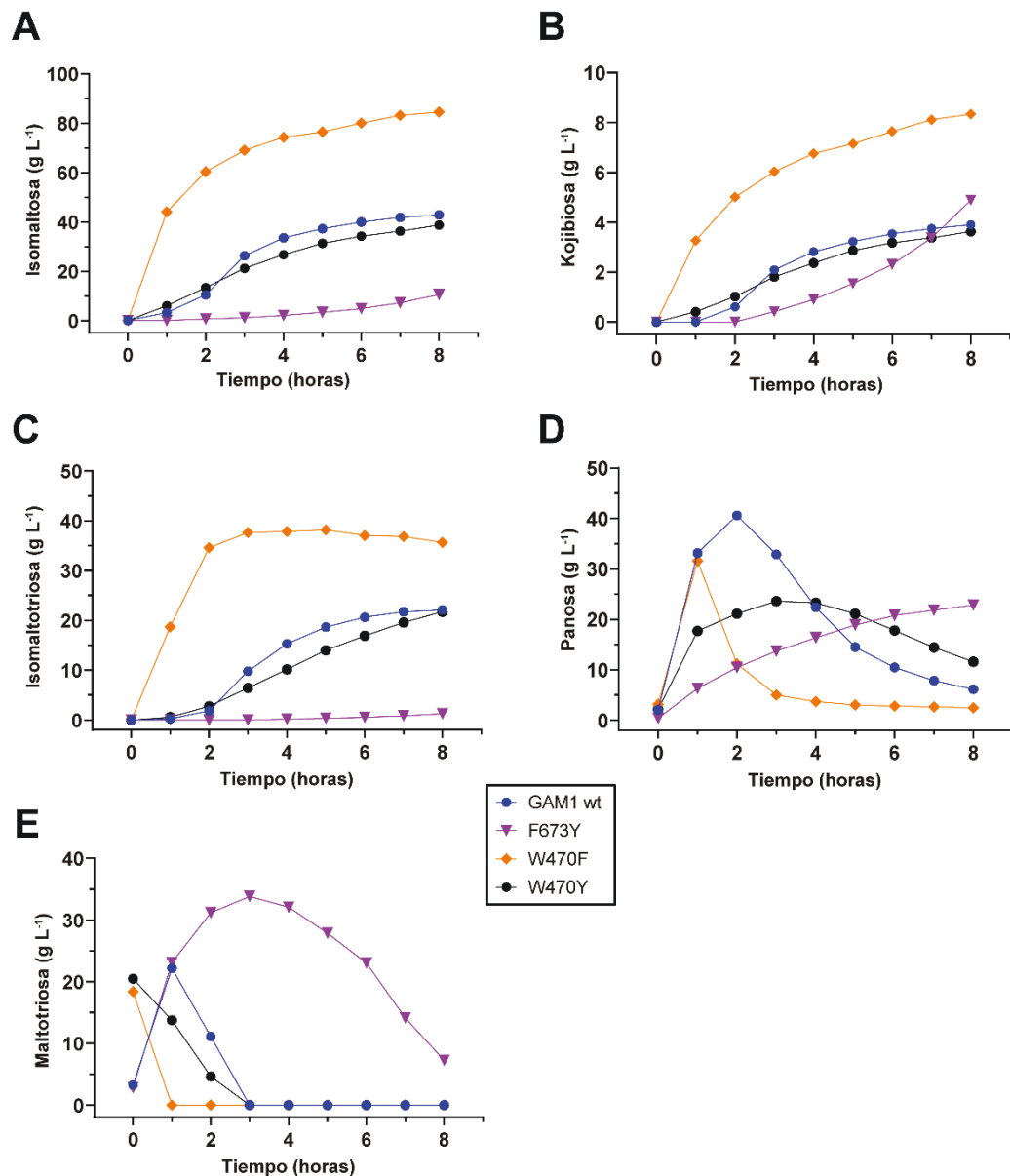
La actividad transferasa de los mutantes obtenidos en este caso por ET se realizó en presencia de maltosa, se tomaron alícuotas de las reacciones a distintos tiempos que se analizaron por cromatografía de intercambio de aniones de alta eficacia acoplado a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD). La síntesis de IMOs total de la variante que tenía W470F aumento hasta aproximadamente el doble de la obtenida con la GAM1 wt en relación a la conversión de maltosa de la reacción (Figura 4.24). Salvo el mutante que tenía

la sustitución W470Y, el resto de mutantes vio reducida en mayor o menor medida la síntesis de productos de transferencia, y en especial el que tenía W435K.

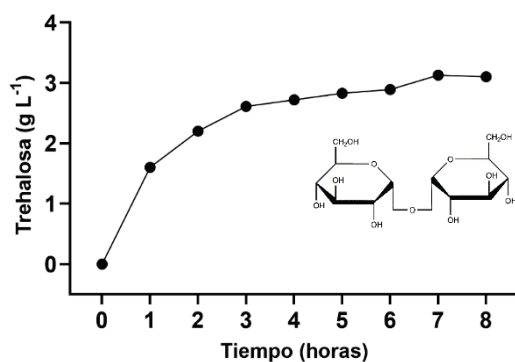


**Figura 4.24 Producción de IMOs total de los mutantes obtenidos por ET referenciados vs conversión de maltosa.** La maltosa convertida se muestra en porcentaje. Todas las reacciones se realizaron a una concentración inicial de  $200 \text{ g L}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ , pH 4,5 y  $50 \text{ U mL}^{-1}$  de actividad enzimática, excepto cuando se usó la variante con la sustitución W435K de la que se usaron  $0,26 \text{ U mL}^{-1}$ . Los IMOs representados son el resultado de la suma de las concentraciones de trehalosa, isomaltosa, kojibiosa,

Los resultados de los productos de transglicosilación de los mutantes de los residuos que tienen sus interacciones con el subsitio -1 se muestran en la Figura 4.25. La sustitución W470F fue la que mostró un mayor incremento en la síntesis de productos generados con enlace  $\alpha$ 1-6, es decir isomaltosa e isomaltotriosa (Figura 4.25A y B). La concentración máxima de isomaltosa alcanzó el doble que la del wt (Figura 4.25A, Tabla 4.5). Cantidades similares se detectaron en el caso de la isomaltotriosa (Figura 4.25C, Tabla 4.5). La síntesis de kojibiosa también se duplicó (Figura 4.25B, Tabla 4.5). Así mismo, cabe destacar que la obtención de estos oligosacáridos se detectó de manera adelantada y en cantidades considerables (Figura 4.25A-C). La panosa, sin embargo, fue detectada en una cantidad algo menor al wt y rápidamente fue hidrolizada (Figura 4.25D, Tabla 4.5). La maltotriosa solo se detectó a las 0 horas de reacción, a pesar de que las alícuotas se inactivaban relativamente rápido a  $100^\circ\text{C}$ , la alta actividad de la variante que incluía W470F produjo una concentración máxima del trisacárido algo menor a la de proteína wt (Figura 4.25E, Tabla 4.5). El mutante que portaba W470Y fue similar en la síntesis de isomaltosa, isomaltotriosa, maltotriosa y kojibiosa, así como en la evolución de la reacción general de transglicosilación a la proteína wt (Figura 4.25A-C y E, Tabla 4.5), aunque la síntesis de panosa se vio afectada, detectándose una concentración  $\sim 42\%$  inferior a la del control (Figura 4.25D, Tabla 4.5). Cabe destacar que los mutantes que portaban las sustituciones W470F (Figura 4.25) y D230N sintetizaron un nuevo producto de transglicosilación, la trehalosa, que es la unión de dos monómeros de glucosa a



**Figura 4.25** Análisis de los productos de transglucosilación obtenidos por las variantes de **GAM1** del subsitio -1. Síntesis de los productos de transglucosilación isomaltosa (A), kojibiosa (B), isomaltotriosa (C), panosa (D) y maltotriosa (E) por las variantes enzimáticas indicadas. Todas las reacciones se llevaron a cabo con 200 g L<sup>-1</sup> de maltosa y 50 U mL<sup>-1</sup> de actividad enzimática a pH 4,5 y 37°C.

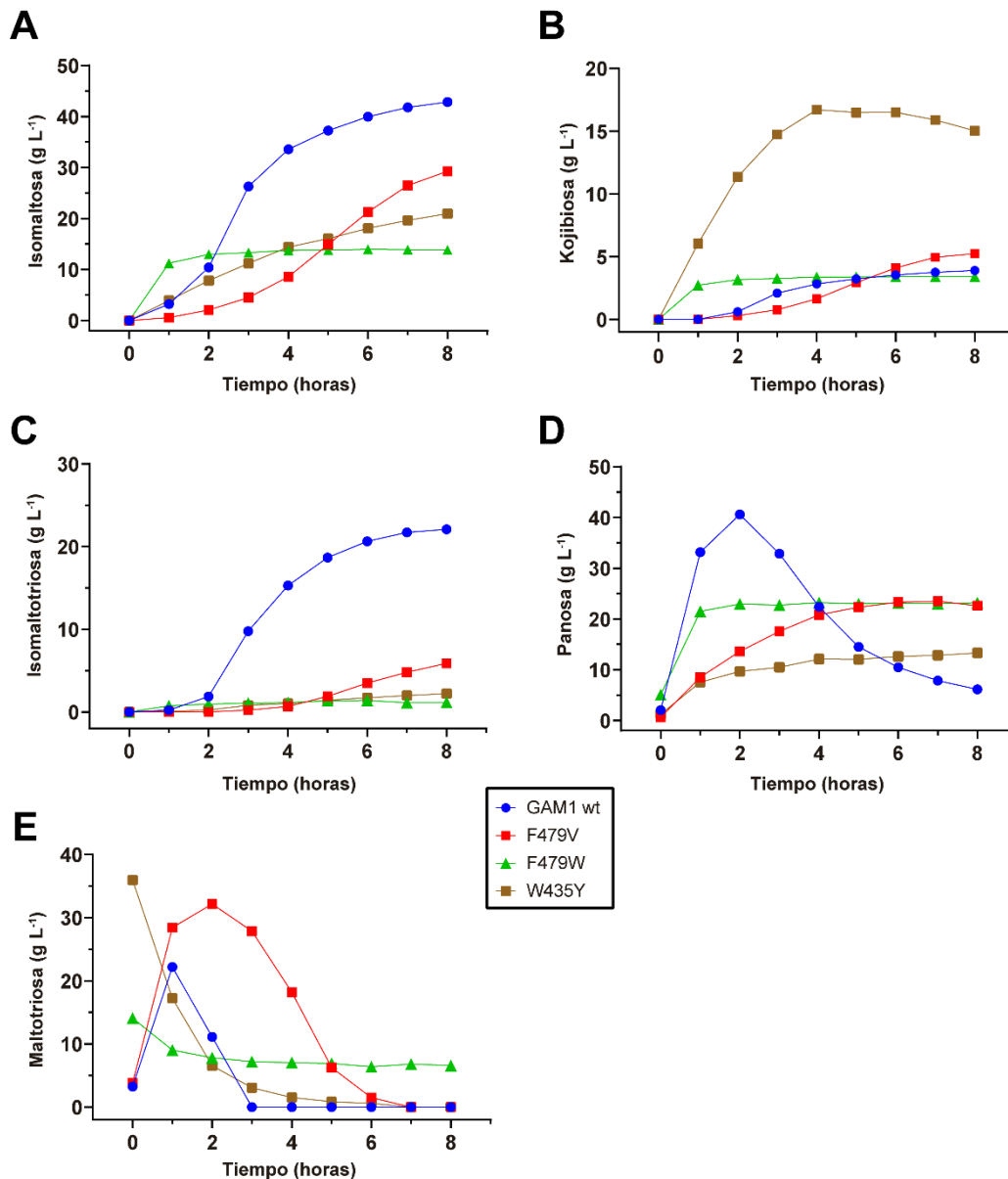


**Figura 4.26** Producción de trehalosa obtenida con el mutante **W470F**. Desarrollo de la síntesis de trehalosa obtenida tras la sustitución **W470F**. La reacción contenía 50 U mL<sup>-1</sup>, 200 g L<sup>-1</sup> de maltosa y tampón acetato sódico 100 mM pH 4,5 y se llevó a cabo a 37°C. Se muestra también la estructura del azúcar producido a la derecha.

través de un enlace  $\alpha$ -1-1, aunque tan solo se produjo con una concentración máxima de 3 y

0,7 g L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 4.26 y 4.28B). La variante F673Y causó una reducción drástica de la formación del enlace  $\alpha$ 1-6 (Figura 4.25 A y C), detectándose tan solo un máximo de 10,5 g L<sup>-1</sup> de isomaltosa y de 1,2 g L<sup>-1</sup> de isomaltotriosa (Tabla 4.5). La panosa detectada también se redujo hasta valores máximos similares a los de la variante GAM1-W470Y (Figura 4.25D, Tabla 4.5).

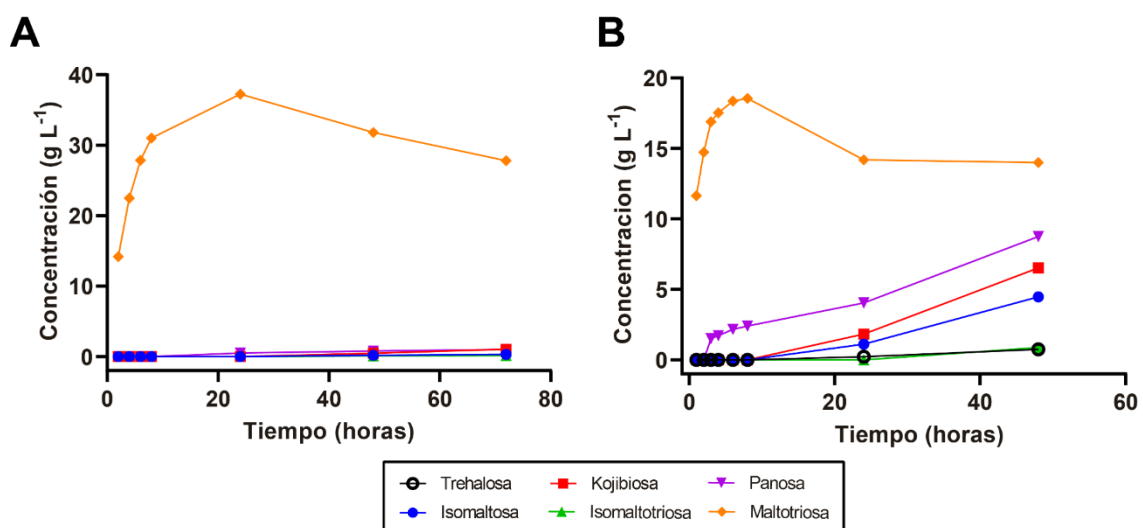
El análisis de las reacciones de los residuos mutados implicados en las interacciones del subsitio +1 (F479) y del subsitio -1/+1 (W435) se muestra en la Figura 4.27. La producción de isomaltotriosa se redujo drásticamente en el caso de todos los mutantes mencionados (Figura



**Figura 4.27 Análisis de los productos de transglucosilación obtenidos por las variantes de GAM1 del subsitio +1.** Síntesis de los productos de transglucosilación: isomaltosa (A), kojibiosa (B), isomaltotriosa (C), panosa (D) y maltotriosa (E) por las variantes enzimáticas indicadas. En el caso de la mutación W435Y también se afectó al subsitio -1. Todas las reacciones se llevaron a cabo con 200 g L<sup>-1</sup> de maltosa y 50 U mL<sup>-1</sup> de actividad enzimática, a pH 4,5 y 37°C.



4.27C y Tabla 4.5), y especialmente con los mutantes GAM1-W435K y GAM1-D230N donde se detectó una cantidad ínfima de 0,14 y 0,87 g L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 4.28 y Tabla 4.5). El análisis de la reacción realizada con la variante GAM1-F479W pareció indicar que la reacción terminó en 1 hora, ya que el seguimiento hasta las 8 horas conducía a la misma concentración de producto (Figura 4.27). Con esta variante hubo un claro detrimento en la síntesis de todos los IMOs, así como en la maltotriosa, excepto la kojibiosa que mantuvo unos niveles similares a los de la enzima wt (Figura 4.27, Tabla 4.5). Sin embargo, con la variante que contenía W435Y se incrementó la síntesis de kojibiosa (enlace  $\alpha$ 1-2 entre dos unidades de glucosa) hasta los 16,7 g L<sup>-1</sup> (Figura 4.27B, Tabla 4.5) y su producción se detectaba desde el inicio de la reacción en cantidades que superan ampliamente la del resto de las variantes ensayadas, incluyendo la wt (Figura 4.27B). Las mutaciones en el subsitio -1/+1 W435Y/K aumentaron la síntesis de maltotriosa, aunque en el caso de la W435Y fue rápidamente hidrolizada (Figura 4.27E y 4.28A). Con la variante D230N se detectó una concentración de maltotriosa más o menos constante a lo largo de la reacción de aproximadamente 15 g L<sup>-1</sup> (Figura 4.28B) aunque la máxima fue superior (Tabla 4.5). Además, esta sustitución consiguió duplicar la producción de kojibiosa respecto a GAM1 wt, pero perjudicó la formación de enlaces tipo  $\alpha$ 1-6, reduciéndose la síntesis de panosa e isomaltosa (Figura 4.27B y Tabla 4.5). La panosa y la isomaltosa se produjeron de manera más lenta y se consiguieron menores cantidades tras la sustitución W435Y (Figura 4.27A y D). Sin embargo, la W435K prácticamente fue incapaz de sintetizar estos oligosacáridos (Figura 4.27A, Tabla 4.5). Por último, la mutación F479V mejoró la producción de maltotriosa (Figura 4.27E, Tabla 4.5) y con ella se obtuvieron cantidades de kojibiosa similares a las de la enzima wt (Figura 4.27B, Tabla 4.5). Por último, la producción de panosa fue similar a la que se obtuvo con la sustitución



**Figura 4.28** Reacción de transglucosilación de las variantes que incluían las sustituciones W435K y D230N. Productos de la reacción de transglucosilación de las variantes de GAM1: **A.** W435K y **B.** D230N llevada a cabo con 200 g L<sup>-1</sup> de maltosa a 37°C y pH 4,5. Se utilizaron 0,26 U mL<sup>-1</sup> de la enzima GAM1 mutante W435K y 3,7 U mL<sup>-1</sup> de la variante D230N.

F479W (Figura 4.27B, Tabla 4.5). Aun así, la síntesis de isomaltosa fue la que menos se vio afectada al alterar los residuos que interactúan con el subsitio +1 (Figura 4.27A, Tabla 4.5).

**Tabla 4.5 Máxima concentración de azúcares generados por las variantes indicadas**  
Productos de transglicosilación (g L<sup>-1</sup>)

|                | F479V | F479W | F673Y | W470F | W470Y | W435Y | W435K | D230N | GAM1 wt |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| Isomaltosa     | 21,27 | 13,94 | 10,50 | 84,53 | 38,68 | 20,96 | 0,32  | 4,47  | 42,83   |
| Kojibiosa      | 5,24  | 3,40  | 4,89  | 8,34  | 3,63  | 16,70 | 1,04  | 6,51  | 3,90    |
| Isomaltotriosa | 5,88  | 1,39  | 1,24  | 38,17 | 21,72 | 2,22  | 0,14  | 0,87  | 21,72   |
| Panosa         | 23,51 | 23,22 | 22,85 | 31,58 | 23,6  | 13,3  | 1,01  | 8,75  | 40,58   |
| Maltotriosa    | 32,16 | 14,09 | 33,83 | 18,4  | 20,48 | 35,95 | 37,25 | 18,54 | 22,18   |

Concentración máxima detectada por HPAEC-PAD de productos de TG de los distintos mutantes. GAM1 wt se usó como control. Condiciones de reacción: maltosa 200 g L<sup>-1</sup>, 50 U mL<sup>-1</sup> de enzima, 37°C y pH 4,5.

### 4.3 Inmovilización de GAM1

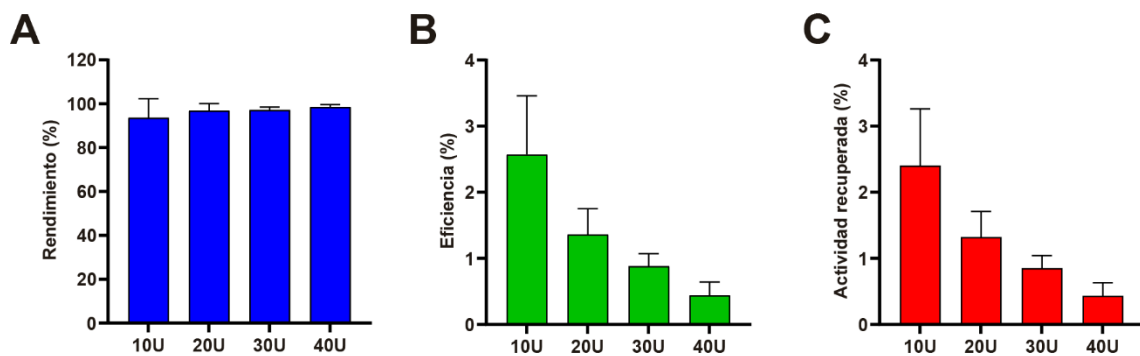
La inmovilización de enzimas es un proceso ampliamente utilizado para mejorar su utilidad operacional, sobre todo, si se persigue aumentar la estabilidad del biocatalizador con el objetivo de alargar su vida útil y poder reutilizarlas para que los costes de los procesos industriales disminuyan. A menudo la estabilización del biocatalizador suele producir también mejoras operacionales como aumentar el rango de temperaturas y pH al que actúa la actividad enzimática. Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas que ofrece la inmovilización, el proceso también puede causar desventajas como la disminución de la actividad o los cambios de especificidad del catalizador.

En este trabajo se abordó la inmovilización de la  $\alpha$ -glucosidasa GAM1 sobre bolas de quitosano (*chitosan beads*). El quitosano es un producto desacetilado de la hidrólisis de quitina, polisacárido que, en la mayoría de los casos, proviene del exoesqueleto de organismos marinos. Este polisacárido es un soporte de gran interés biotecnológico puesto que es respetuoso con el medio ambiente. En este trabajo se usó un método de inmovilización de unión covalente en el que se usaron como *linker* el glutaraldehído o la genipina. La genipina está presente en el extracto de la fruta de *Genipa americana* (huito o jagua), y es un excelente entrecruzador natural de proteínas y quitosano que presenta una toxicidad mucho menor que la del glutaraldehído y otros *linkers* sintéticos.

#### 4.3.1 Obtención de los *chitosan beads*

La formación de *chitosan beads* se realizó con una mezcla de quitosano disuelta en ácido acético. Las bolitas se formaron precipitándose gota a gota la solución anterior sobre una disolución de coagulación que contenía NaOH y etanol (apartado 3.8.1). Los *chitosan beads* obtenidos tenían un tamaño aproximado de 1-2 mm y un peso aproximado de entre 1,6 y 3,7 mg.

Inicialmente y para fijar las condiciones de la inmovilización se usaron 200 mg de chitosan beads y distintas cantidades de actividad enzimática, medida en unidades hidrolíticas, usando como *linker* el glutaraldehído (GA). Se usaron 10- 40 U de GAM1 en 1 mL de fosfato sódico 50 mM pH 7 que fueron incubadas durante 18 horas a temperatura ambiente con el soporte previamente activado con GA 0,5% (1mL). Como control, la enzima libre fue también incubada en las mismas condiciones y sin soporte para valorar su posible pérdida de actividad. Tras la incubación, se realizaron 4 lavados con 1 mL del tampón citado y se midió la posible actividad  $\alpha$ -glucosidasa de todos ellos. Las suaves condiciones empleadas en la inmovilización, a pH



**Figura 4.29 Parámetros de inmovilización con distintas cantidades de actividad de GAM1.**

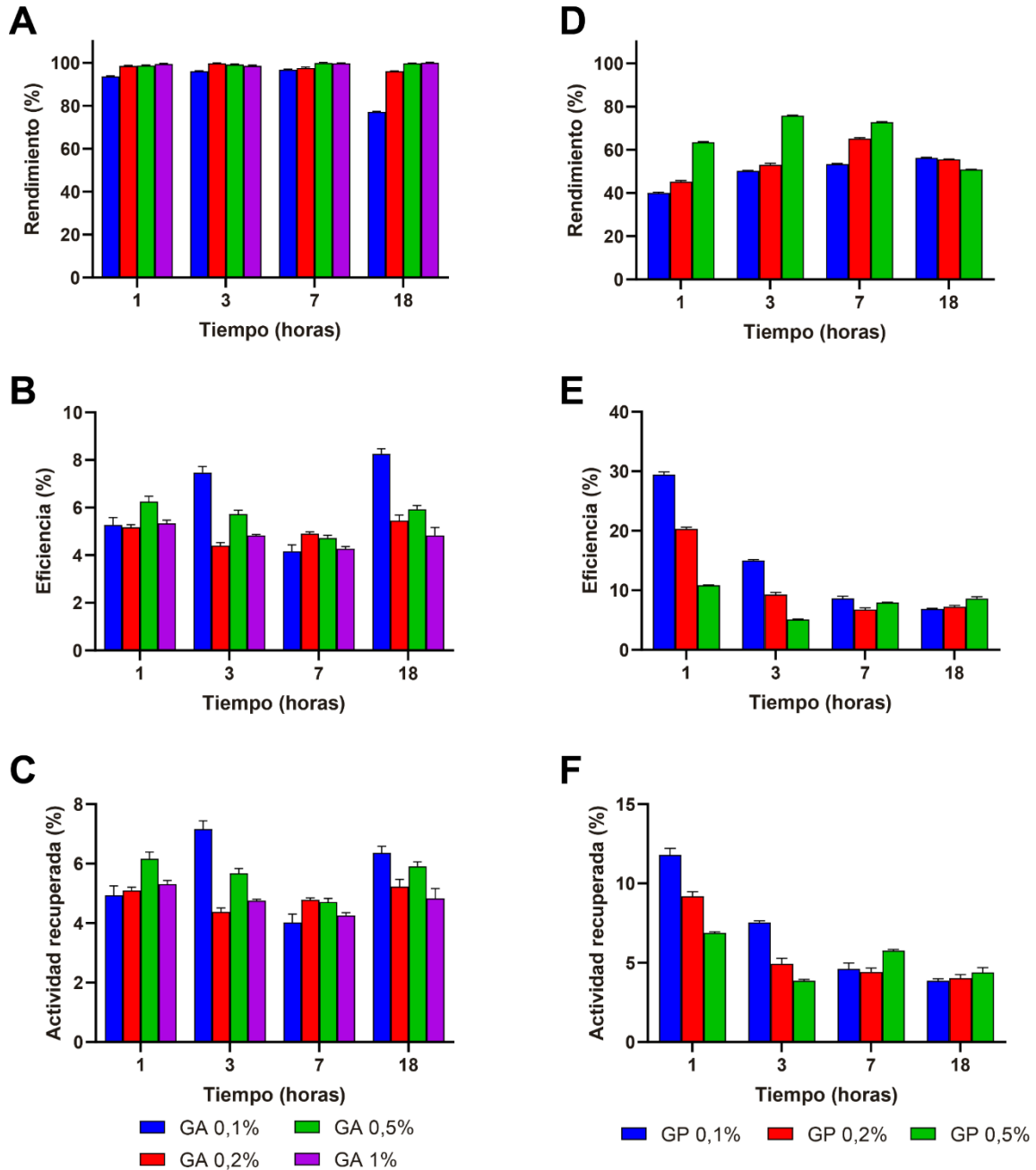
Se muestran los parámetros de inmovilización de 10, 20, 30 y 40 U de GAM1. **A.** Rendimiento, **B.** Eficiencia, y **C.** Actividad recuperada. Las inmovilizaciones se realizaron tras la preactivación del soporte (bolas de quitosano) con 0,5% de glutaraldehído e incubado durante 18 horas después se incubaron las distintas cantidades de unidades de actividad enzimática. Los ensayos de actividad se hicieron por triplicado y se muestra la desviación estándar del valor medio.

neutro y GA, provocan la unión de la proteína al soporte predominantemente a través de su extremo N-terminal. La valoración de la actividad del biocatalizador inmovilizado generado se realizó colocando una chitobead, previamente pesada, en un tubo con filtro al que se le añadió un volumen de 100  $\mu$ L de maltosa disuelta en acetato sódico 100 mM pH 4,5 y previamente incubada a 37°C (apartado 3.8.2.1).

El rendimiento de la inmovilización, calculado como el porcentaje de enzima unida al soporte (apartado 3.8.8.2), fue superior al 93% con todas las cantidades de actividad enzimática utilizadas (Figura 4.29A). Sin embargo, a pesar del alto porcentaje de enzima aparentemente inmovilizada la eficiencia del proceso, definida como la relación porcentual de la actividad observada en el biocatalizador inmovilizado entre la actividad inmovilizada, fue muy baja (Figura 4.29B). La mejor eficiencia se logró al usar una menor cantidad de actividad enzimática, cerca del 2,6%, disminuyendo proporcionalmente a medida que se incrementaban las unidades utilizadas hasta 40 U donde se detectó una eficiencia de tan sólo 0,44% (Figura 4.29B). Por tanto, la actividad recuperada, definida como la relación porcentual entre la

actividad observada y la actividad inicial, también fue muy baja en todos los casos (Figura 4.29C). La actividad recuperada máxima, de 2,4%, se consiguió con la inmovilización de 10U de GAM1 y la menor nuevamente fue al usar 40 U, con un 0,43% (Figura 4.29C).

Para optimizar la cantidad de *linker* utilizado y el tiempo de incubación de la preactivación del soporte se usaron concentraciones de GA comprendidas entre 0,1-1% y de 1-18 h (Figura



4.30). Además, se utilizó también genipina (GP), pero debido a su menor solubilidad en agua este *linker* se utilizó solo hasta una concentración máxima de 0,5%. El rendimiento de la inmovilización al usar GA se encontró en rango del 95-100% en la mayoría de los casos, ya que solo al usar GA 0,1% y preactivación de 18 horas se obtuvo un rendimiento más bajo, un 77% (Figura 4.30A). Sin embargo, la inmovilización con GP mostró rendimientos muy inferiores a los obtenidos con GA, el menor valor se obtuvo tras la preactivación durante 1 hora con GP al 0,1%. En estas condiciones se obtuvo un rendimiento de inmovilización del 40%, y el mayor con GP al 0,5% y preactivación de 3 horas, con el que se alcanzó cerca del 76% (Figura 4.30D).

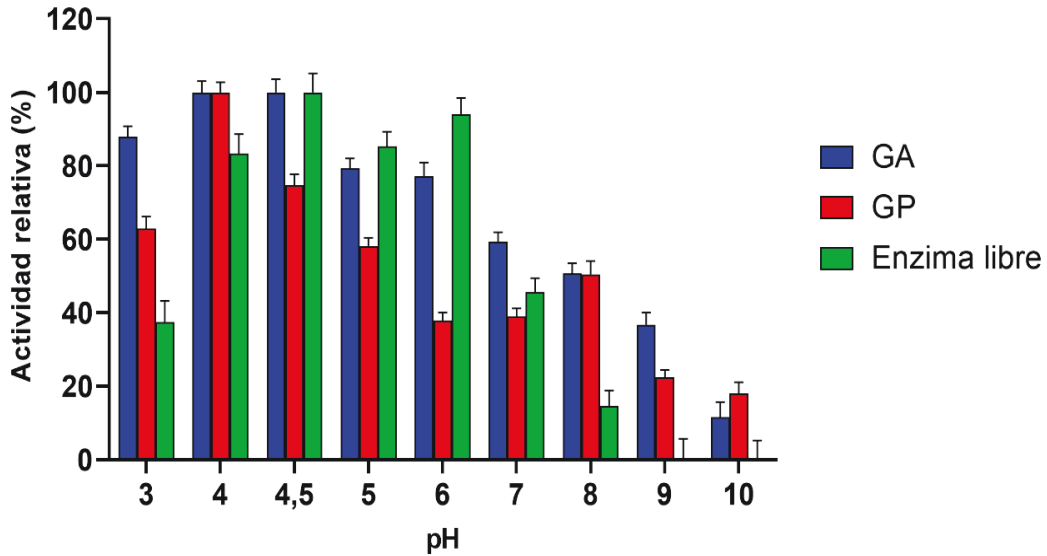
La activación con GA 0,1% durante 18 horas mostró la mejor eficiencia de inmovilización de 8,3%, seguida de la preactivada durante 3 horas con un 7,5% (Figura 4.30B). El resto de condiciones de preactivación con GA mostraron unos resultados similares entre sí, que rondaban valores inferiores a un 6% de eficiencia (Figura 4.30B). Por otro lado, la preactivación con GP 0,1% durante 1 hora dio como resultado la mayor eficiencia de inmovilización, cercana a un 30% (Figura 4.30E). La eficiencia de la inmovilización con GP tiende a ser mayor, al usar todas las concentraciones, a tiempos más cortos de incubación para la preactivación, y a medida que el tiempo de pretratamiento tiende a ir disminuyendo (Figura 4.30E). Las actividades máximas recuperadas se obtuvieron con las concentraciones más bajas de linker, tanto de GA como de GP y a menores tiempos de preactivación del soporte, cercano al 12% al usar GP 0,1% y 1 hora de preactivación, mientras que al usar GA 0,1% y 3 horas de preactivación se logró aproximadamente un 7% (Figura 4.30C y F).

### 4.3.2 Análisis de la actividad y estabilidad de la inmovilización

Optimizadas en lo posible las condiciones de inmovilización, se valoraron tanto las capacidades del biocatalizador inmovilizado como su actividad y estabilidad a distintos valores de pH y temperaturas. El análisis de la actividad a distintos pH se realizó usando el tampón universal Britton-Robinson, y para valorar la estabilidad frente a cambios de pH se utilizó también este tampón universal y la medida de la actividad enzimática se realizó en acetato sódico pH 4,5 usando maltosa como sustrato.

Con independencia del *linker* utilizado, GA o GP, se amplió el rango de pH en el que el biocatalizador tenía actividad respecto a la enzima libre (Figura 4.31). A pH 9 y 10 la enzima libre no presentó actividad alguna mientras que la inmovilización con GA mantenía aún valores cercanos al 37 y 12% de su actividad máxima, respectivamente (Figura 4.31).

Con GP se obtuvo una actividad cercana al 22 y el 18% respecto a su actividad máxima (Figura 4.31). A pH 3 la enzima libre retuvo aproximadamente la tercera parte de la actividad



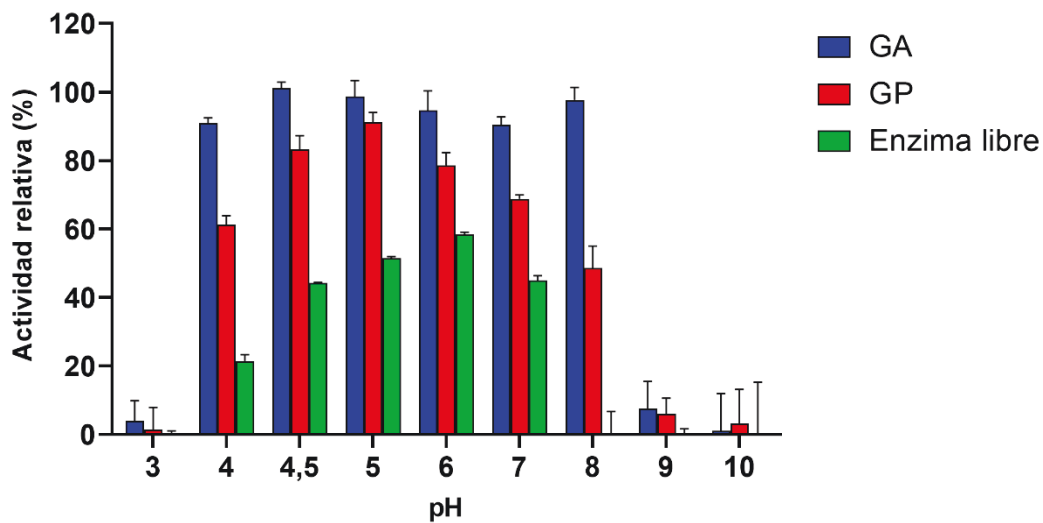
**Figura 4.31 Actividad relativa del biocatalizador inmovilizado a distintos valores de pH.**

Actividad relativa en porcentaje de la enzima GAM1 inmovilizada en bolas de quitosano con glutaraldehído (GA) y Genipina (GP) a los valores de pH indicados. Se muestran los porcentajes obtenidos respecto al valor que presenta mayor actividad en cada caso. Se muestra también el valor obtenido con la enzima no inmovilizada (libre) para cada valor de pH.

de la inmovilizada con GA, y la mitad de la inmovilizada con GP (Figura 4.31). Sin embargo, en el rango de pH de 4,5-6 la enzima libre mostró una actividad mucho más cercana o superior a la de las inmovilizadas. Sobre todo, al usar GP la actividad disminuyó considerablemente dentro de ese rango, llegando solo hasta el 40% del control a pH 6 (Figura 4.31). El inmovilizado con GA fue el que presentó una mejora de actividad más generalizada (Figura 4.31).

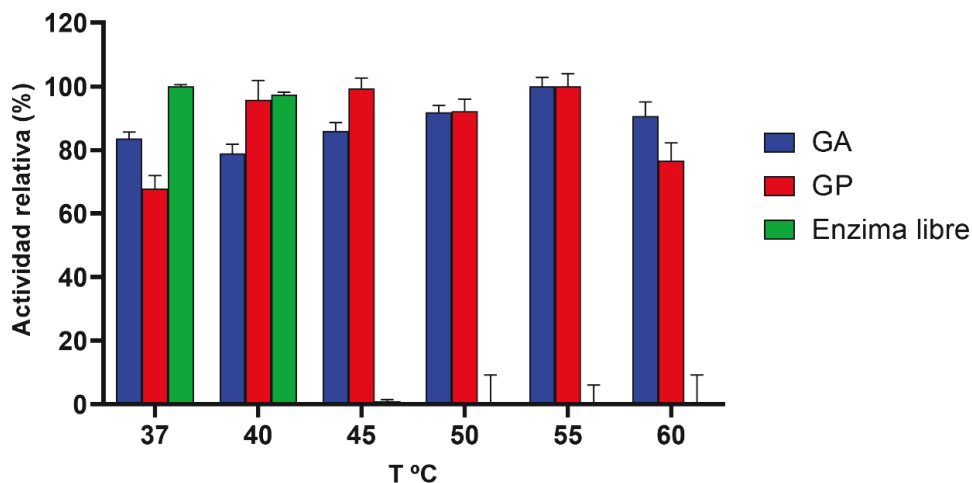
La estabilidad de los biocatalizadores a los cambios de pH se valoró incubándolos durante 24 horas a distintos valores de pH y a continuación realizando ensayos de actividad estándar. Los biocatalizadores inmovilizados retuvieron mayor actividad que la enzima libre en un rango de pH de 4 a 8 unidades (Figura 4.32). La enzima inmovilizada con GA mostró los valores de retención de actividad más altos, y con valores muy similares en este mismo rango de pH 4-8 (Figura 4.32). La inmovilización con GP retuvo una actividad inferior a la de GA, más acusada a pH 4 y 8 (Figura 4.32). Los pHs extremos de 3, 9 y 10 solamente mantuvieron un pequeño porcentaje de actividad en los inmovilizados (Figura 4.32). Además, cabe resaltar que la integridad de las chitosan beads se vio comprometida a valores de pH inferiores a 7, tanto fue así que las bolas de quitosano prácticamente se desintegraron a pH menores o iguales a 5. Afortunadamente, el uso de tubos con filtro para realizar las reacciones de actividad posibilitó la medida de la actividad hidrolítica que continuaba aún presente.

La  $\alpha$ -glucosidasa GAM1 es una enzima muy termosensible que como ya se mostró



**Figura 4.32 Estabilidad de los biocatalizadores inmovilizados a distintos valores de pH.** Estabilidad de la inmovilización de 10 U de GAM1 sobre bolas de quitosano con el *linker* glutaraldehído (GA; columnas azules) o genipina (GP; columnas rojas). Se muestran también los valores obtenidos con la enzima libre (columnas verdes). Todas las medidas de actividad se llevaron a cabo con maltosa 2 mM en tampón acetato sódico 100 mM pH 4,5 a 37°C tras incubar los biocatalizadores inmovilizados a los pH indicados durante 24 horas. Los ensayos de actividad se hicieron por triplicado y se muestra la desviación estándar del valor medio.

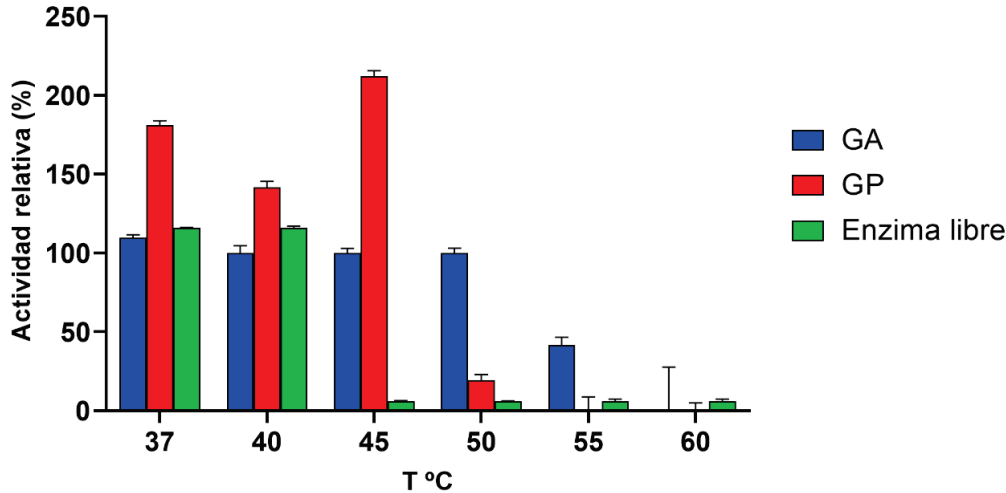
anteriormente (apartado 4.1.4) no tiene actividad a temperaturas mayores o iguales a 45°C (Figura 4.33). Sin embargo, la enzima inmovilizada sobre bolas de quitosano, y con independencia del linker usado (GA o GP), mostró actividad a temperaturas superiores a 45°C



**Figura 4.33 Actividad relativa de los biocatalizadores inmovilizados a distintas temperaturas.** Actividad relativa en porcentaje de las inmovilizaciones, realizadas con glutaraldehído (GA), genipina (GP) y de enzima libre, en relación a la mayor actividad para cada condición. Todas las actividades se realizaron con maltosa 2 mM y tampón acetato sódico 100 mM pH 4,5. Los ensayos de actividad se hicieron por triplicado y se muestra la desviación estándar del valor medio.

(Figura 4.33). De hecho, la temperatura a la que los inmovilizados fueron más activos fue la de 55°C (Figura 4.33).

Al analizar la termoestabilidad, los biocatalizadores inmovilizados con GP no mostraron



**Figura 4.34 Estabilidad de los biocatalizadores generados a distintas temperaturas.** Se usaron inmovilizados de 10U de actividad enzimática en bolas de quitosano con el linker glutaraldehído (GA; columnas azules), genipina (GP; columnas rojas) y 10U de actividad de enzima libre (columnas verdes). Todas las reacciones se llevaron a cabo con maltosa 2 mM en tampón acetato sódico 100 mM pH 4,5 a 37°C. La actividad relativa se calculó dividiendo la actividad final, tras las incubaciones a las temperaturas indicadas durante 24 horas, entre la actividad a tiempo inicial. Los datos se representan en porcentaje.

actividad al se preincubados a 55 y 60°C durante 24 h, y conservaron solo un 20% de actividad a 50°C (Figura 4.34). Sin embargo, la actividad se incrementó notablemente tras la preincubación a 37, 40 y 45°C, llegando a duplicar los valores tras 24 horas a 45°C con respecto a la actividad inicial (Figura 4.34). También se observaron incrementos en la actividad de la enzima libre tras la incubación a 37 y 40°C, aunque en una magnitud menor (Figura 4.34).

En las inmovilizaciones con GA se conservó la actividad, respecto al valor inicial, en un 41,7% tras la incubación a 55°C durante 24h, pero ésta se perdió totalmente por incubación a 60°C (Figura 4.34). Al usar este linker, se mantuvo el 100% de actividad tras incubación durante 24h hasta 50°C, produciéndose un ligero incremento, cercano al 10%, a 37°C (Figura 4.34).

### 4.3.3 Análisis de la estabilidad operacional de la actividad hidrolasa de los biocatalizadores inmovilizados

La estabilidad operacional hidrolasa de la enzima inmovilizada fue examinada tras varios ciclos de reacción. Para ello, se utilizó una única bola de quitosano con la enzima inmovilizada

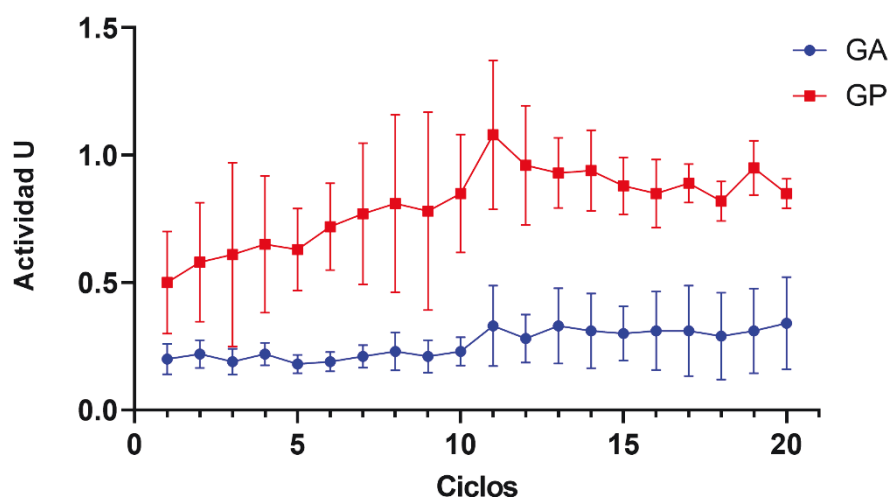


(con el *linker* GA o GP) por cada tubo con filtro utilizado. Estos tubos con filtro se usaron para facilitar tanto la separación del biocatalizador de la solución de reacción como su lavado. Se realizaron un total de 20 ciclos de actividad hidrolítica a 37°C con 100  $\mu$ L de maltosa 2 mM en cada uno de ellos.

Los resultados del análisis de este ensayo de reutilización no mostraron, con ninguno de los dos *linkers* utilizados, pérdida de actividad hidrolítica del biocatalizador (Figura 4.35). La actividad de la inmovilización incrementó de 0,5 a 1 U por 200 mg de soporte utilizado al usar 0,1% de GP (Figura 4.35). Sin embargo, la integridad de las bolas de quitosano, inmovilizadas con este *linker*, sí que se vio comprometida tras su reutilización ya que se formó una especie de gel sobre la superficie del filtro al concluir el ensayo. Por otro lado, al usar 0,1% de GA la actividad hidrolasa del biocatalizador fue más constante a lo largo de los ciclos, experimentando incluso un ligero incremento en la segunda mitad del ensayo (Figura 4.35). Además, las bolas de quitosano tratadas con GA conservaron mejor su integridad, aunque también se observó el desprendimiento de algún fragmento del soporte a partir de los 10 ciclos de reutilización.

#### 4.3.4 Análisis de la actividad glucosiltransferasa de los biocatalizadores inmovilizados

Debido a la baja actividad hidrolasa que mostraron los biocatalizadores inmovilizados al usar 200 mg de bolas de quitosano se optó por usar una con mayor cantidad de biocatalizador y soporte. Para ello, se usaron 10 g de bolas de quitosano y 500 U de actividad enzimática



**Figura 4.35 Estabilidad operacional de los biocatalizadores generados.** Se realizaron 20 ciclos de valoración de actividad hidrolítica. Los biocatalizadores contenían 10 U de actividad enzimática GAM1 inmovilizada en bolas de quitosano con el linker glutaraldehído (GA) en azul y genipina (GP) en rojo. Se analizó la actividad hidrolítica de 3 réplicas y los datos se expresan en unidades totales por 200 mg de biocatalizador inmovilizado, incluyendo la desviación estándar de las determinaciones.

GAM1 (proporcionalmente las condiciones óptimas de 10 U por 200 mg de soporte). Todas las condiciones de inmovilización se realizaron de la misma manera, excepto el volumen de la disolución de la enzima en el tampón que fue de 5 mL. Además, debido a la fragilidad de las bolas de quitosano, y sobre todo tras realizar el tratamiento con GP a valores de pH 6 o inferiores durante tiempos de incubación prolongados, se optó por analizar la actividad hidrolítica para el cálculo de los parámetros de inmovilización y realizar las reacciones de transglucosilación a pH 7 para aumentar la integridad del soporte.

En la tabla 4.6 se muestran los resultados de la inmovilización, el rendimiento de la inmovilización fue muy similar al obtenido en los ensayos anteriores salvo con la GP que resultó ser de más del doble. La eficiencia y actividad recuperada, en este caso fueron inferiores debido a que, como ya se ha mencionado, el análisis de la actividad hidrolítica se llevó a cabo a pH 7. Las actividades hidrolíticas observadas en este caso de los inmovilizados en bolas de quitosano con GA y GP fueron de 7,8 y 8 U, respectivamente (Tabla 4.6).

Tabla 4.6 Análisis de los parámetros de inmovilización sobre 10 g de soporte.

|    | Actividad Observada (U) |        | Rendimiento (%) |        | Eficiencia (%) |        | Activ. recuperada (%) |        |
|----|-------------------------|--------|-----------------|--------|----------------|--------|-----------------------|--------|
| GA | 7,83                    | ± 1,74 | 96,72           | ± 1,01 | 2,66           | ± 0,23 | 2,57                  | ± 0,23 |
| GP | 8,06                    | ± 1,27 | 87,13           | ± 1,06 | 3,04           | ± 0,18 | 2,65                  | ± 0,17 |

La inmovilización se realizó con aproximadamente 10 g de soporte y 500U de GAM1 en 10 mL de tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7. El análisis se realizó en este mismo tampón con 2 mM de maltosa. Condiciones de preactivación: GA 0,1%, 3 horas de incubación; GP 0,1%, 1 hora de incubación.

Para analizar la capacidad transferasa de la enzima inmovilizada se realizaron reacciones de transglucosilación con la cantidad total de inmovilizado en 5 mL y 200 g L<sup>-1</sup> de maltosa. Se

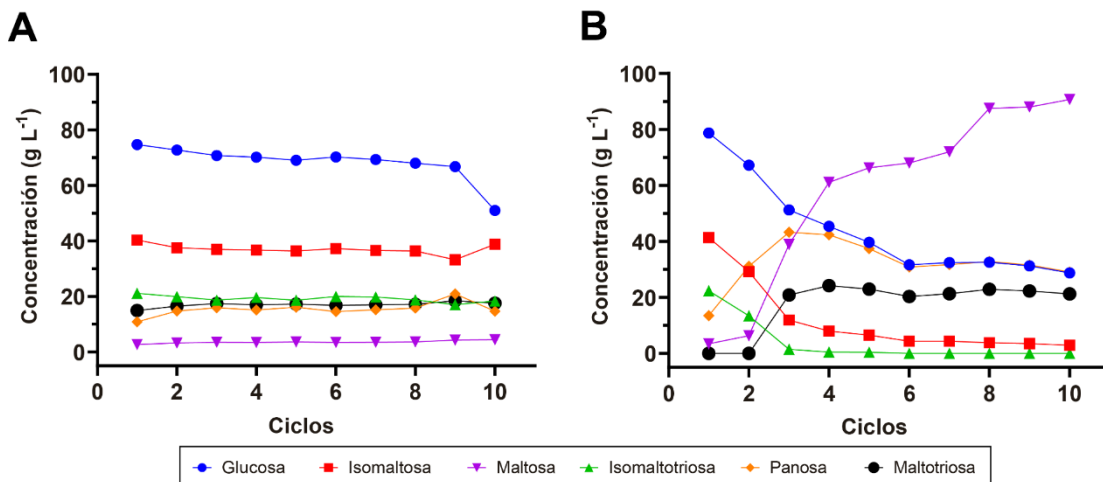


Figura 4.36 Evaluación de la actividad transferasa de los biocatalizadores inmovilizados tras 10 ciclos de transglucosilación. La enzima se inmovilizó en bolas de quitosano con el linker **A.** glutaraldehído y **B.** genipina. Se utilizaron 10 g de chitosan beads y 50 U g<sup>-1</sup> de actividad enzimática. La actividad observada de los biocatalizadores fue de 7,8 y 8 U totales. Para cada ciclo se utilizaron 200 g L<sup>-1</sup> de maltosa a pH 7 para mayor estabilidad del soporte. Se muestran la concentración de los azúcares de la mezcla de reacción en

tomó el tiempo de incubación a las 24 horas como el óptimo para evaluar los azúcares de la mezcla, realizar una serie de ciclos y estudiar la estabilidad del biocatalizador.

Con los biocatalizadores inmovilizados con GA y GP se obtuvieron cantidades similares de productos en el primer ciclo de transglicosilación, con la excepción de la ausencia de maltotriosa en el caso de haber usado GP como linker (Figura 4.36). La actividad transglicosilasa de la enzima GAM1 inmovilizada con GA se mantuvo constante durante los 10 ciclos realizados (Figura 4.36A). Si bien en el último ciclo se detectó una leve disminución de glucosa al mismo tiempo que se produjo un incremento de isomaltosa (Figura 4.36A).

Por el contrario, al inmovilizar con GP la estabilidad operacional del biocatalizador se vio comprometida desde el primer ciclo (Figura 4.36B). La cantidad de glucosa, isomaltosa e isomaltotriosa fueron las primeras en descender, unido a un aumento en la cantidad de maltosa que dejó de hidrolizarse (Figura 4.36B). Además, la isomaltotriosa dejó de detectarse en las reacciones a partir del tercer ciclo, y la concentración de panosa experimentó una subida hasta el ciclo 3, donde hizo aparición la maltotriosa que, junto con el aumento de la concentración de maltosa, son hechos directamente relacionados con la menor actividad hidrolasa y por tanto de actividad transferasa (Figura 4.36B). La concentración de panosa disminuyó hasta el ciclo 6 a partir del cual se estabilizó la concentración de este azúcar en la reacción (Figura 4.36B). La maltosa sin embargo continuó aumentando hasta el último ciclo analizado, una señal inequívoca de la disminución de la actividad del biocatalizador inmovilizado (Figura 4.36B).

# DISCUSIÓN

## 5 DISCUSIÓN

El objetivo de esta tesis se centró en la  $\alpha$ -glucosidasa GAM1 de *Schwanniomyces occidentalis*, una enzima con gran capacidad de producir distintos tipos de IMOs. En este trabajo, se usó el sistema de expresión heteróloga de *Pichia pastoris* con objeto de conseguir cantidades suficientes de GAM1 para posibilitar su estudio y manipulación mediante técnicas de biología molecular. Se exploró la capacidad de la enzima para generar nuevos compuestos glicosilados de potencial interés industrial, así como elucidar el mecanismo de la reacción de transglicosilación. Además, mediante modelos estructurales se analizaron los determinantes responsables de la especificidad de sustrato y los productos de transglicosilación. Por último, se abordó el estudio de la inmovilización de la enzima sobre bolas de quitosano para intentar mejorar la aplicabilidad del biocatalizador.

### 5.1 Caracterización bioquímica y capacidad transglicosilasa de GAM1

La  $\alpha$ -glucosidasa GAM1 de *S. occidentalis* ATCC 26077 fue expresada en *P. pastoris* y debido a que *S. occidentalis* muestra una alteración de lectura del código genético estándar en la que el triplete CTG se traduce como serina en lugar de leucina (Álvaro-Benito *et al.*, 2010), la proteína heteróloga contenía ya las correspondientes sustituciones (leucina por serina) en los residuos 4, 6 y 142. Las dos primeras localizadas en el péptido señal de exportación de la proteína y la última en una región distante del bolsillo catalítico situado en el  $\beta$ -sandwich de su extremo N-terminal. Sin embargo, con la estrategia usada en este trabajo, los niveles de actividad  $\alpha$ -glucosidasa valorados en los medios extracelulares de la levaduras que expresaban la proteína GAM1 ( $1,9 \text{ U mL}^{-1}$ ; Figura 4.1) superaron en casi 10 veces a los valores reportados por otros autores al usar esta misma enzima proveniente de la cepa *S. occidentalis* ATCC 26074 (Sato *et al.*, 2005). Estos mismos autores estimaron también un peso molecular para la proteína de aproximadamente 130 kDa, unos 13 kDa inferior al obtenido en este trabajo (Figura 4.2). El tratamiento con PNGasa F redujo el peso molecular de la proteína en 4 kDa, lo que mostró que GAM1 estaba glicosilada (Sato *et al.*, 2005). En este trabajo conseguimos también reducir en mayor medida la glicosilación de GAM1, aunque no totalmente, al usar otras desglucosilasas (Figura 4.2). El análisis de los parámetros cinéticos de GAM1 mostró que la enzima tenía una eficiencia catalítica ( $k_{\text{cat}} K_M^{-1}$ ) sobre maltosa similar a la obtenida por otros autores, sin embargo, sobre isomaltosa fue unas 6 veces menor (Sato *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2013). La  $\alpha$ -glucosidasa de *S. occidentalis* muestra un comportamiento michaeliano para la actividad hidrolítica a concentraciones bajas de maltosa (hasta 2,5 mM), pero a concentraciones superiores muestra una aparente inhibición de sustrato, un fenómeno que ha sido observado ya en otras  $\alpha$ -glucosidasas de la misma familia

estructural (GH31) (Kawano *et al.*, 2019). Hasta donde sabemos, la eficiencia catalítica de GAM1 sobre maltosa obtenida en este trabajo,  $1615 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ , es el valor más alto reportado hasta el momento (Tabla 4.1), supera en hasta cinco veces el valor obtenido con la  $\alpha$ -glucosidasa de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Marín, Linde y Fernández Lobato, 2006) y hasta tres veces el de la enzima de *Aspergillus niger* (Ma *et al.*, 2017), una de las  $\alpha$ -glucosidasas de hongos más estudiadas. Además, en comparación con algunas enzimas de arquea y bacteria muestra una eficiencia catalítica de hasta dos órdenes mayor (Seo *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2014; Saburi *et al.*, 2015).

Cuando las reacciones enzimáticas con  $\alpha$ -glucosidasas microbianas se realizaron utilizando concentraciones saturantes de sustrato, la mayoría de las enzimas analizadas mostraron también actividad transferasa, y produjeron un amplio espectro de IMOs (Kato *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2010). También, como GAM1, produjeron maltotriosa, un disacárido que es hidrolizado eficientemente por las glicosil hidrolasas presentes en el intestino humano y que por tanto carecen de propiedades prebióticas (Lee *et al.*, 2014). Los IMOs formados por las enzimas de la familia GH31 suelen contener, mayoritariamente, al menos un enlace  $\alpha 1-6$ , si bien algunas enzimas de esta familia son capaces de formar también otros azúcares como la kojibiosa o la nigerosa, entre otros (Wu *et al.*, 2010; Saburi *et al.*, 2015; Kawano *et al.*, 2019, 2020). Del mismo modo, GAM1 produce mayoritariamente panosa e isomaltosa, aunque también produce en menor cantidad kojibiosa (Figura 4.5 y 4.6). La panosa de la reacción es producida por transferencia de glucosa a maltosa si el disacárido está presente en la mezcla, pero a medida que la concentración de maltosa disminuye la panosa comienza a ser también hidrolizada. GAM1 cataliza la síntesis de isomaltosa tanto por hidrólisis de panosa como por la formación del enlace  $\alpha 1-6$  entre dos unidades de glucosa, ya que, la adición de glucosa a las mezclas de reacción desplazó los productos de transglicosilación formados hacia la producción de azúcares con enlaces  $\alpha 1-6$ , y disminuyeron la formación de panosa (Figura 4.8), y la producción de isomaltosa e isomaltotriosa casi se triplicó mientras que la de panosa prácticamente desaparece (Figura 4.8). En este contexto, en el ensayo de transglicosilación realizado con la  $\alpha$ -glucosidasa de *A. niger* por Casa-Villegas y colaboradores (2017) en presencia de maltosa y glucosa se consiguió formar isomaltosa, a tiempos de incubación cortos, y simultáneamente reducir la cantidad de panosa formada, pero no se incrementó la síntesis de isomaltosa en la misma medida que con GAM1.

Dependiendo del tipo de enlace que une las unidades de glucosa, los azúcares presentan mayor o menor resistencia a la hidrólisis. Entre los disacáridos formados en las reacciones con GAM1, la trehalosa con un enlace  $\alpha 1-1$  tendría la menor tasa relativa de hidrólisis, seguida por la isomaltosa con un enlace  $\alpha 1-6$  y la kojibiosa seguida de la nigerosa (Lee *et al.*, 2016). En los animales, las mezclas de IMOs son digeridas parcialmente y en el intestino son

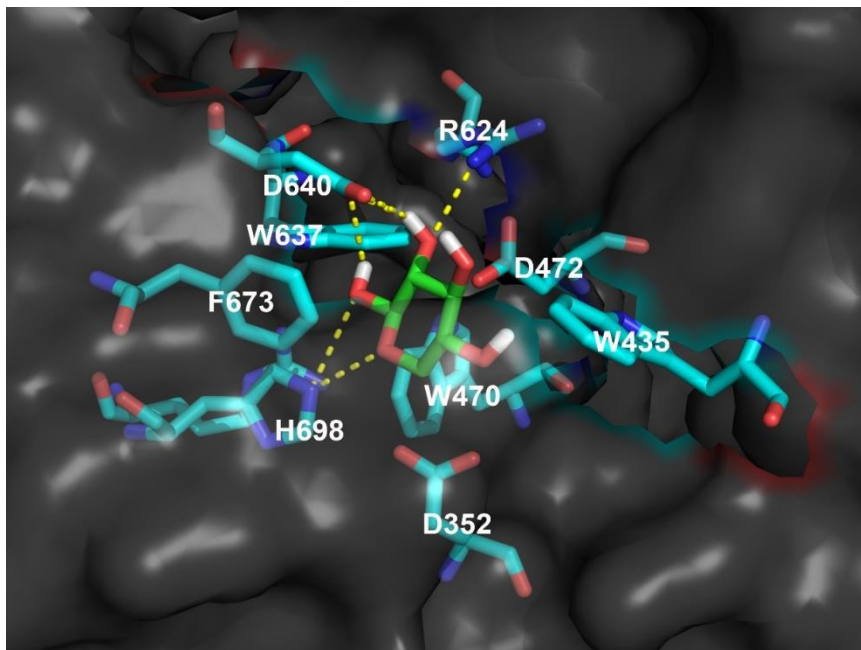
utilizadas por la microbiota favoreciendo la proliferación/metabolismo de las bifidobacterias y lactobacilos (Kaneko *et al.*, 1994; Ketabi, Dieleman y Gänzle, 2011; Hu, Winter y Gänzle, 2020). El hecho de que la  $\alpha$ -glucosidasa GAM1 forme principalmente azúcares con enlaces  $\alpha$ 1-6, a tiempos largos de reacción en presencia de maltosa, sobre todo isomaltosa e isomaltotrios, y de que además, la síntesis de estos azúcares se incrementa cuando se añaden altas concentraciones de glucosa aumenta su potencial como posible biocatalizador de aplicación industrial para la producción de IMO que bien podrían utilizarse para el consumo humano o en la alimentación animal.

Algunas glicosil hidrolasas son capaces de formar nuevos heteroligosacáridos en presencia de su sustrato natural y otro azúcar que puede actuar como aceptor de glucosilación alternativo (Nimpiboon *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2019). El análisis de la capacidad de GAM1 para glucosilar nuevos aceptores revela que la enzima muestra una clara preferencia por las moléculas de glucosa y similares, ya que en los experimentos realizados en este trabajo no se pudieron glucosilar azúcares como la fructosa, galactosa, glucosamina y lactosa, pero sí la xilosa, una aldopentosa (similar a la glucosa a excepción de la falta del carbono 6), y la sacarosa, que contiene una glucosa unida por enlace  $\alpha$ 1-2 a la fructosa (Figura 4.9 y 4.10). La  $\alpha$ -glucosidasa de *A. niger*, una enzima también con actividad transferasa, tampoco pudo glucosilar ni la galactosa ni la fructosa (Mangas-Sánchez y Adlercreutz, 2015). En cuanto a los compuestos fenólicos ensayados, GAM1 solo pudo glucosilar el piceido (polidatina) que ya contiene una glucosa unida por enlace  $\beta$  a su unidad básica de resveratrol (Figura 4.12).

Las reacciones de transglucosilación de GAM1 en presencia del aceptor xilosa formaron mayoritariamente el enlace  $\alpha$ 1-4 debido a la ausencia del carbono 6. La síntesis de este azúcar por catálisis enzimática solamente ha sido descrita por Putman *et al.* (1955) al emplear una maltosa fosforilasa de *Neisseria meningitidis*. GAM1 también formó en muy pequeña cantidad enlace  $\alpha$ 1-1 entre la glucosa y la xilosa, que por su analogía con la trehalosa podría tener un efecto prebiótico mejorado. Este compuesto ha sido sintetizado tanto químicamente (Nishizawa *et al.*, 1994) como enzimáticamente utilizando una trehalasa de *Trichoderma reesei* (Brewer *et al.*, 1986).

La xilosa debido a su similitud con la glucosa es capaz de entrar en el bolsillo catalítico de GAM1 (Figura 5.1). Los análisis de docking mostraron que podrían producirse interacciones entre este azúcar y GAM1 mediante dos puentes de hidrógeno con el residuo catalítico D640, además de otros residuos del bolsillo catalítico. Esto nos lleva a pensar que la disminución de síntesis de IMO que se detectó en este trabajo pudo deberse a una posible inhibición

competitiva de la xilosa, aunque solo explicaría en parte la aparición tardía de productos de



**Figura 5.1 Unión de xilosa con el modelo de GAM1.** *Docking* realizado con Autodock Vina. Se muestran las interacciones con el bolsillo catalítico. La afinidad de la unión de la xilosa estimada fue de  $-5,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

glucosilación a concentraciones muy altas de xilosa. Las reacciones de transglucosilación de GAM1 con maltosa, en presencia del aceptor sacarosa, forman distintos compuestos de los cuales el mayoritario fue el formado por unión de la glucosa por medio de un enlace  $\alpha$ 1-6 a la sacarosa, es decir la teanderosa. El azúcar teanderosa se encuentra principalmente en la miel y en pequeñas cantidades en la caña de azúcar, siendo poco rentable su extracción de estas fuentes naturales (hasta 0,3 g por cada 100 g de miel) (Ruiz-Matute *et al.*, 2010). Al emplear GAM1 se han sintetizado enzimáticamente unas cantidades suficientes de este azúcar como para hacer factible su posible uso en la industria alimentaria, ya que hay datos ya publicados que indican que este azúcar aumenta la presencia de bifidobacterias en el intestino (Shimokawa *et al.*, 1995). Se han descrito también algunas glucosil hidrolasas de la familia 13 que sintetizan teanderosa al usar sacarosa como sustrato, este es el caso de las  $\alpha$ -glucosidasas de *Bacillus* sp. y *Metshnikowia* spp., si bien la cantidad de este azúcar producida ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ) es inferior a la obtenida con GAM1 (Inohara-Ochiai *et al.*, 2000; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2020). Cantidades mayores de este azúcar se obtuvieron por Ruíz-Aceituno *et al.* (2017) al usar una levansacarasa, sacarosa como sustrato e isomaltosa como molécula aceptora, estrategia con la que consiguiendo un 50% más de teanderosa que los  $82 \text{ g L}^{-1}$  obtenidos en este trabajo. Aun así, la reacción de GAM1 resulta más económica ya que no hay que suministrar isomaltosa, un azúcar de alto coste económico.



La enzima GAM1 también pudo glucosilar el piceido, un glucósido derivado del resveratrol. Los polifenoles tienen una muy baja solubilidad en agua, afortunadamente GAM1 mostró una buena actividad en el disolvente orgánico DMSO (Figura 4.4B). A pesar de que las cantidades producidas de piceido glucosilado en este trabajo fueron bastante bajas, unos 3,4 g L<sup>-1</sup> en el caso del derivado monoglucosilado y 1 g L<sup>-1</sup> en el caso del diglucosilado, el rendimiento de la reacción fue aproximadamente del 56% (Figura 4.12). Otras  $\alpha$ -glucosidasas de la familia GH31 también han podido glucosilar piceido y otros compuestos fenólicos glucosilados, como es el caso de la arbutina produciendo también un enlace  $\alpha$ 1-6 mayoritariamente, y con rendimientos muy similares a los obtenidos con GAM1 (Seo *et al.*, 2011).

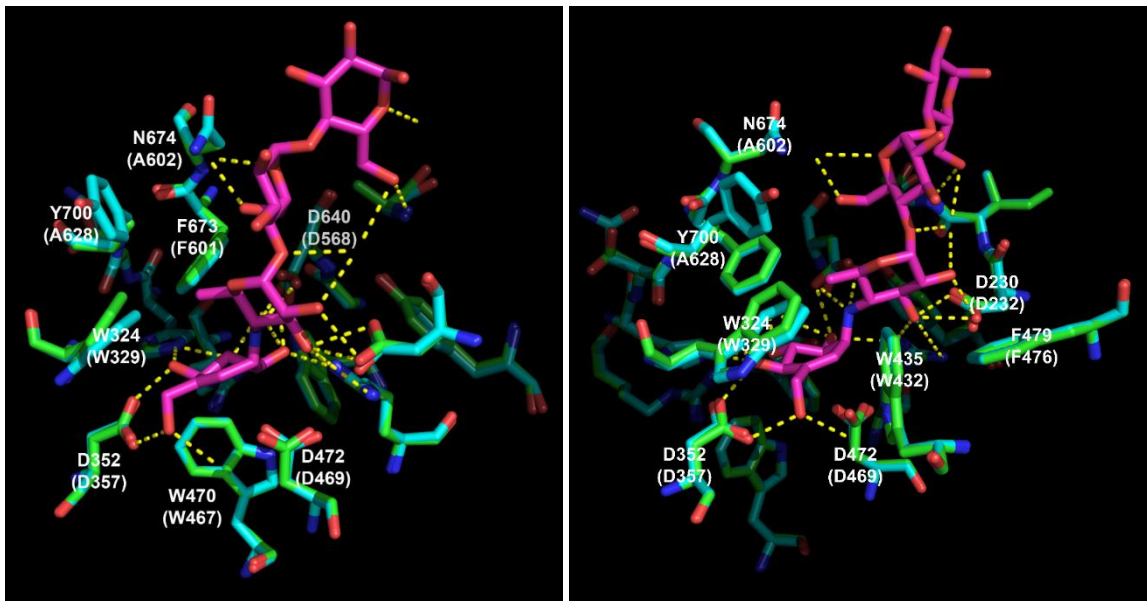
El piceido es interesante desde el punto de vista biotecnológico porque tiene excepcionales propiedades antioxidantes y es un potencial candidato para el tratamiento de algunas enfermedades mentales como el Alzheimer (Su *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2015). La glicosilación a priori aumentaría la solubilidad de este compuesto fenólico en disoluciones acuosas permitiendo una mayor estabilidad y biodisponibilidad, además debido a la formación del enlace  $\alpha$ 1-6 lo convertiría también en potenciales compuestos prebióticos.

La producción enzimática industrial de IMO por lo general requiere de múltiples pasos en los que además se producen mono y oligosacáridos (digeribles) no deseados que permanecen en el producto final (Yoo, 1997). En la reacción *one-pot* en matraz realizada en este trabajo en la que se cultivaron células de *P. pastoris* transformadas con la construcción GAM1.pIB2, de expresión constitutiva, se produjo panosa, junto a cantidades reducidas de glucosa que solo pudieron ser detectadas mediante análisis GOD-POD (Figura 4.14 y 4.15). La producción de panosa por el método desarrollado en este trabajo resultó ser muy ventajosa no solo por su posible aplicación industrial sino porque también tenía una mayor pureza de este azúcar. Por esta razón se escaló el proceso de producción de panosa a nivel de pequeño fermentador, en modo *fed-batch*. Sin embargo, los resultados obtenidos en el fermentador no fueron tan buenos como los obtenidos en matraz ya que la glucosa no se eliminó totalmente del cultivo (Figura 4.16). Además, la alimentación con el sustrato realizada fue claramente insuficiente para poder mantener la generación del producto deseado. Los protocolos tienen que ser sin lugar a dudas optimizados, pero abren la posibilidad del uso de este método en fermentador discontinuo como método de producción de panosa y además permitiría el poder reutilizar la masa celular generada. La eliminación total de la glucosa podría también realizarse adaptando el método a *two-pot*, mediante un segundo proceso en el fermentador en el que podría usarse directamente *P. pastoris* (sin transformar), o incluso *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces carlsbergensis* para intentar eliminar la glucosa del medio, y en el caso de la última levadura además la maltosa restante (Pan and Lee, 2005; Rengarajan and Palanivel, 2020). El uso de microorganismos para la eliminación de azúcares no deseados resulta más

económico que el uso de membranas que además tienen la dificultad de no discriminar disacáridos con enlaces distintos al  $\alpha$ 1-4 de los que contienen otro tipo de uniones (Córdova, Astudillo y Illanes, 2018).

## 5.2 Estudio estructural del bolsillo catalítico de GAM1 y análisis de la actividad transglucosilasa

Uno de los modelos de GAM1 generados en este trabajo se realizó con Swiss-Model por homología con la  $\alpha$ -glucosidasa de *B. vulgaris* (PDB:3W37), una de las enzimas con estructura resuelta más emparentadas con la aquí analizada. Además, es conocido que la  $\alpha$ -glucosidasa



**Figura 5.2 Alineamiento modelo estructural de GAM1.** Alineamiento del modelo GAM1 (cian) con la  $\alpha$ -glucosidasa de *B. vulgaris* (PDB:3w37; verde) acomplejada con acarbosa (púrpura). Se muestran los puentes de hidrógeno en línea discontinúa amarilla. Se nombran los residuos de GAM1 y entre paréntesis los de la  $\alpha$ -glucosidasa de *B. vulgaris*. Las imágenes son dos ángulos de visión del bolsillo catalítico.

de *S. occidentalis*, la maltasa–glucoamilasa (MGAM) y la sacarosa-isomaltasa (SI) intestinales humanas proceden de un gen ancestral común (Naim *et al.*, 1991). Tras el análisis visual del centro catalítico de GAM1, se decidió la mutación de los residuos N674 y el Y700. Además, se identificaron los putativos residuos catalíticos D472 y D640 que fueron inactivados por mutación a Ala.

La mutación en el residuo N674 por Phe o Tyr incrementó la síntesis de IMOs a tiempos menores de reacción, pero solo en el caso de la primera mutación se redujo la cantidad de panosa producida (Figura 4.20). Con ambas mutaciones se observó un descenso significativo de la eficiencia catalítica de la enzima por maltosa, y en la misma proporción (Tabla 4.2), debido probablemente a la eliminación del grupo carboxamida, ya que las sustituciones son muy distintas entre sí. La sustitución por Phe, con cadena lateral más voluminosa,

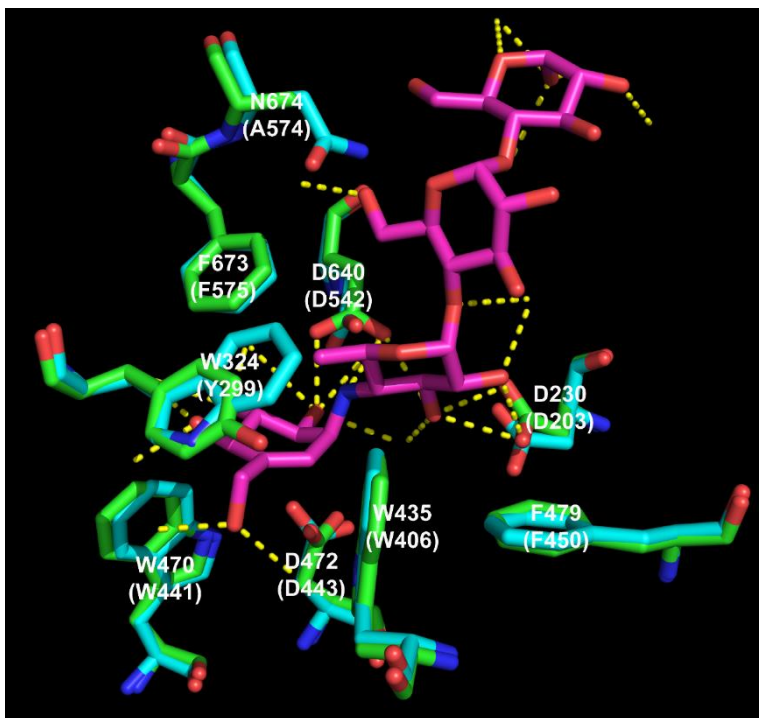
probablemente afecte a la orientación del residuo vecino F673 que está muy conservado en esta familia de enzimas, y afecta en mayor medida al subsitio +1 haciendo que la eficiencia catalítica sobre maltosa disminuya (Figura 5.2). Además, esta cadena lateral posiblemente dificulte la entrada de maltosa para formar el enlace  $\alpha$ 1-6 por lo que se sintetiza en menor medida y se favorece la formación de maltotriosa (Figura 4.20). La mutación N674F de GAM1 fue también estudiada ya que en la  $\alpha$ -glucosidasa de *A. niger*, la mutación N694F (una posición equivalente a la N674 de GAM1, había generado ya una reducción, aunque menor a la de GAM1, de la eficiencia catalítica de la enzima, aunque con similares resultados en cuanto a la producción de IMOs (Ma *et al.*, 2017).

El residuo W324 está muy conservado e interacciona con el subsitio -1 y +1, jugando un papel importante en la especificidad de la enzima GAM1. La sustitución de este residuo por Phe llevó a la pérdida de la capacidad de transferencia, sobre todo la formación de enlaces  $\alpha$ 1-6, y al aumento drástico de la capacidad de hidrólisis (Figura 4.21). La sustitución de residuo W324 por Tyr altera la interacción por medio del enlace de hidrógeno OH/ $\pi$  con W435 y conduce a la síntesis de un nuevo trisacárido, la centosa (Song *et al.*, 2013). La reducción de la cadena lateral en el caso de la sustitución W324F hace que se reduzca la interacción mencionada y posiblemente dificulte la unión en el subsitio +1 de maltosa para formar panosa pero que no impida la formación de maltotriosa. Además, al no formarse isomaltosa indica que la unión de glucosa se ve muy desfavorecida al aumentar el espacio en el subsitio +1 impidiendo que forme interacciones (Figura 5.2).

El residuo Y700 parece estar más alejado del subsitio +1, lo que posiblemente resulta en una interacción menor con el sustrato por lo que las mutaciones producidas tienen un efecto menor sobre la modificación de la actividad transferasa (Figura 5.2 y 4.20). Este residuo, según el modelo, interacciona con el residuo W324 y podría formar un enlace H/ $\pi$  con la cadena lateral del N674. Por lo tanto, las sustituciones en este residuo tienen efecto sobre la especificidad al cambiar la orientación de estos residuos colindantes. La mutación Y700A modifica en pequeña medida a la eficiencia catalítica, sin embargo, la síntesis de panosa resulta acelerada debido a que crea más espacio y posiblemente reorienta los residuos cercanos, algo esperable al estar este residuo también presente en la  $\alpha$ -glucosidasa de *B. vulgaris*, una enzima que reconoce sustratos de mayor longitud (Figura 5.2) (Tagami *et al.*, 2013). De manera análoga, a la variante Y700G le ocurren los mismos cambios en su actividad hidrolítica y transferente debido a su similitud con la Ala, aunque la capacidad de síntesis de maltotriosa es mayor y la de panosa algo menor (Figura 4.20). Las sustituciones Y700T y S son parecidas entre sí debido a la cadena lateral de los dos aminoácidos, y por tanto la eficiencia catalítica (para la actividad hidrolítica) de la enzima mutada disminuye de manera muy similar (Tabla 4.2). Además, a pesar del cambio detectado en la actividad hidrolítica con la sustitución Y700T

(Y700S no se valoró) la actividad transferasa fue similar que al realizar la sustitución Y700A, lo que a priori significaría que esta mutación no afecta a la especificidad ni cambia la conformación del centro catalítico de la enzima (Figura 4.20). Sin embargo, la mutación Y700H, que incluye una cadena lateral más voluminosa y rígida sí que afectaría a los residuos de su alrededor F673, N674 y W324 fijándolos más en sus posiciones y estrechando en cierta manera el bolsillo catalítico de la enzima, lo que posiblemente ocasione una mayor especificidad para formar maltotriosa, azúcar que llega a triplicar los valores obtenidos con la GAM1 wt (Figura 5.2 y 4.20).

El modelo de GAM1 por homología con NtSI analizado con la herramienta Evolutionary Trace clasifica los residuos más o menos conservados según el grado de variabilidad de estos con



**Figura 5.3 Alineamiento modelo estructural de GAM1.** Alineamiento del modelo GAM1 por homología con NtSI (azul cian) con la NtMGAM humana (PDB:2qmj; verde) acomplejada con acarbosa (púrpura). Se muestran los puentes de hidrógeno con líneas discontinúas amarillas. Se nombran los residuos de GAM1 y entre paréntesis los de NtMGAM humana.

las proteínas más emparentadas y lejanas (Figura 4.23). El bolsillo catalítico de GAM1 presenta varios residuos conservados implicados directamente en la interacción con el sustrato y que por tanto serían responsables de su especificidad. Los residuos mutados en este trabajo están situados alrededor de los subsitios -1 y +1, principalmente. Los residuos con cadena lateral hidrofóbica y anillo aromático W324, W435 y F479 (Figura 5.3) además de interacciones hidrofóbicas por la orientación de los 3 residuos podrían formar enlaces de CH/ $\pi$  entre sí lo que les hace tener una gran importancia en la especificidad

(Song *et al.*, 2013). Además estos residuos están presentes en muchas proteínas de unión a carbohidratos e interaccionan con ellos mediante interacciones CH/ $\pi$  en una geometría de apilamiento, por tanto son residuos importantes en la especificidad de sustrato (Spiwok, 2017). La mutación W435K rompe la disposición de estos residuos y, al mostrar esta sustitución una cadena lateral polar con grupo amino, muy posiblemente rompa la geometría de apilamiento y además forme puentes de hidrogeno que restringen el modo de unión del sustrato

disminuyendo la eficacia de la hidrólisis enzimática (Tabla 4.4). Además, dificulta por el mismo motivo la transferencia a glucosa y maltosa, restringiendo la síntesis de IMOs únicamente a la maltotriosa (Figura 4.28A). Con la sustitución de este residuo por Tyr también se produce una disminución en la síntesis de enlaces  $\alpha$ 1-6, aunque la proteína podría conservar las interacciones hidrofóbicas con los residuos vecinos, y el grupo OH también podría formar puentes de hidrógeno con el sustrato (Figura 5.3). Sin embargo, al tener una cadena lateral algo menos voluminosa parece unir en el subsitio +1 a la glucosa con una orientación propicia para la formación del enlace  $\alpha$ 1-2 de la kojibiosa (Figura 4.27). El residuo F479 al ser mutado a Trp posiblemente empuje al residuo W435 y por lo tanto impida las interacciones con W324 (Figura 5.3), lo que resultaría en la disminución de la eficiencia catalítica de hidrólisis sobre maltosa y sobre isomaltosa, y por tanto la síntesis de IMOs se vería reducida (Figura 4.26). De hecho, en las reacciones realizadas con esta variante enzimática no hubo variación de productos a partir de las 2 horas de reacción, no quedando claro si es por inestabilidad de la enzima o por la interacción con los azúcares de la mezcla de reacción. Sin embargo, la variante F479V amplía el espacio en el subsitio +1 del bolsillo catalítico, y éste muy posiblemente es rellenado por el residuo W435 que se desplaza hacia la Val (Figura 5.3). Como resultado hay un incremento de la eficiencia catalítica sobre maltosa, pero no sobre la isomaltosa, por lo que se observa un incremento en la producción de maltotriosa (Figura 4.27; Tabla 4.4).

El residuo W470 se sitúa en el fondo del bolsillo catalítico cerca del residuo catalítico D472 (Figura 5.3), su sustitución por Phe genera una ampliación de espacio que probablemente permite que el intermediario glucosil-enzima tenga una mayor movilidad, y esto aumenta la cantidad de IMOs formados con enlace  $\alpha$ 1-6, isomaltosa e Isomaltotriosa, además de la formación de trehalosa que no es sintetizada por GAM1 wt (Figura 4.25 y 4.26). Además, el descenso de la eficiencia de la actividad hidrolítica sobre isomaltosa hace que estos IMOs sean más persistentes en la mezcla de reacción (Tabla 4.4). Por el contrario, la mutación W470Y apenas presenta diferencia de actividad transferasa con la enzima *wildtype*, salvo por la menor síntesis de panosa que se produce (Figura 4.25). Probablemente esto se debe a que el grupo OH de la Tyr impide en igual medida la libertad de movimiento que la Phe (Figura 5.3). La mutación D230N restringe en gran medida la unión del sustrato al haberse incluido una cadena lateral más larga, y que además puede formar puentes de hidrógeno, lo que explica la poca actividad sobre isomaltosa y la baja eficiencia catalítica sobre maltosa que provoca en la enzima (Tabla 4.4). Al igual que en el resto de mutaciones que restringen la movilidad del sustrato, la variante sobre todo sintetiza maltotriosa, aunque también es capaz de producir en menores cantidades IMOs debido a que se sitúa más externo al subsitio +1 (Figura 5.3 y 4.28B). Por último, la sustitución del residuo F673 por Tyr empuja a la cadena

lateral del residuo W324 mediante su grupo OH, lo que desplazaría la posición y orientación de la glucosa que además posiblemente forme con este un puente de hidrógeno (Figura 5.3). Esto se traduce en una menor formación de enlaces  $\alpha$ 1-6 y por tanto de isomaltosa e isomaltotriosa. Sin embargo, no se encuentra explicación al hecho de que la formación de maltotriosa aumente drásticamente a pesar de presentar una eficiencia catalítica sobre maltosa del doble de la GAM1 wt, un aumento que ocurre también con la mutación F479V, pero en menor proporción (Tabla 4.4).

### 5.3 Inmovilización de GAM1 sobre *chitosan beads*.

La inmovilización de GAM1 es un paso deseable para posibilitar la utilización industrial de esta enzima en la producción de IMOs. El uso de enzimas libres, purificadas, a nivel industrial supone un coste muy alto. Las enzimas inmovilizadas tienen mayor estabilidad operacional, facilidad de separación del producto, pueden reutilizarse y el biocatalizador generado suele presentar mejoras de estabilidad frente a pH y temperatura. Además, la multitud de soportes descritos permite desarrollar distintos tipos de biorreactores utilizando una sola enzima (Homaei *et al.*, 2013; Homaei, 2015). Hay un creciente interés en el uso de materiales de soporte sostenibles, respetuosos con el medio ambiente y reciclables. El quitosano, derivado de acetilado de quitina, que a su vez es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza, es un material económico, biodegradable, no tóxico y con múltiples grupos funcionales susceptibles de activación por distintos activadores, lo que le hace un material idóneo para su utilización en soportes para la inmovilización (Verma *et al.*, 2020).

Para la inmovilización de GAM1 se usó quitosano, en forma de bolas (*chitosan beads*), preactivadas con glutaraldehído (GA) o con genipina (GP) a pH 7. Estas condiciones hacen que la unión covalente soporte-enzima se forme principalmente entre GA y el N-terminal de la enzima al usar este *linker* (Barbosa *et al.*, 2014).

Para la inmovilización de GAM1 se usaron inicialmente distintas cantidades de actividad  $\alpha$ -glucosidasa y *chitosan beads* preactivadas con GA, en todos los casos se obtuvieron unos rendimientos de inmovilización a priori muy altos, prácticamente no se valoró actividad enzimática en los medios de lavado del soporte por lo que probablemente casi toda la enzima se había unido al soporte (Figura 4.29). Sin embargo, la actividad observada del biocatalizador inmovilizado no fue muy alta, dando como resultado bajos porcentajes de eficiencia y actividad recuperada a medida que se aumenta la cantidad de enzima (Figura 4.29). Resultados similares se obtuvieron en la inmovilización de  $\alpha$ -glucosidasa de *Aspergillus carbonarius* donde a medida que aumentaba la concentración de enzima iba disminuyendo la actividad recuperada, desde un 50 hasta menos del 20% (Sheu, Huang y Duan, 1997). También en el caso de la inmovilización de la  $\alpha$ -glucosidasa de *Geobacillus stearothermophilus* disminuía la

actividad recuperada a medida que se aumentaba la actividad inicial de enzima (Chen *et al.*, 2018).

Una vez establecidas las unidades de actividad hidrolítica óptimas para la inmovilización se analizaron las distintas condiciones y activadores, GP y GA. La GP tiene un rendimiento menor de inmovilización que el GA. Sin embargo, la eficiencia de inmovilización fue 6 veces y la actividad recuperada unas 3 veces superior en las mejores condiciones (Figura 4.30). La inmovilización de una  $\beta$ -glucosidasa comercial sobre *chitosan beads* mostró una actividad superior cuando se utilizó la GP como *linker* respecto al GA (Phadungcharoen *et al.*, 2019). Esto puede deberse a que la GP es capaz de reaccionar de manera más óptima con los grupos amino de la enzima que el GA por lo que probablemente se crea una mayor cantidad de puntos de unión covalente con el soporte (Tacias-Pascacio *et al.*, 2019). La actividad recuperada de la inmovilización con GP podría mejorarse también cambiando los parámetros de pH y temperatura de preactivación utilizados, lo que podría modificar la manera en la que la proteína se une al *linker* (a través de 2 moléculas de GP unidas entre sí) con el quitosano y la enzima (Flores *et al.*, 2019).

El alto rendimiento de inmovilización aparente obtenido en el caso del uso del GA podría explicarse, al menos parcialmente, por la inmovilización de la enzima mediante otro mecanismo, el de la adsorción. Mediante este mecanismo la peroxidasa de rábano fue eficazmente inmovilizada sobre membranas de quitosano (Jin *et al.*, 2011). Aunque no podemos descartar que, al igual que la GP, el GA forme uniones covalentes múltiples que aumenten la capacidad de carga de la enzima al soporte, pero que su conformación esté restringida por uniones covalentes aleatorias (Bilal *et al.*, 2019).

El rango de valores de pH al que la GAM1 inmovilizada es activa se amplía con respecto al de la enzima libre, aunque la mejora es mayor en cuanto a la estabilidad, donde la inmovilización con GA es superior a la de GP (Figura 4.31 y 4.32). La actividad de la enzima a distintas temperaturas mejora excepcionalmente con la inmovilización al usar ambos *linkers*, reteniendo el biocatalizador inmovilizado una actividad del 80-90% a 60°C (Figura 4.33). Además, los biocatalizadores inmovilizados con GA y GP desplazaron la temperatura a la que muestran la máxima actividad a 55°C. Sin embargo, la estabilidad de la enzima a esta temperatura solo se conserva en el inmovilizado con GA, ya que con GP el biocatalizador se inactiva (Figura 4.34). Curiosamente, al usar GP en la inmovilización la enzima llega a casi duplicar su actividad tras la incubación a 37-45°C (Figura 4.34). En este contexto, la inmovilización de la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* sobre *Sephabeads* activadas con GA ampliaron el rango de pH y temperatura de la actividad de la enzima (Ahmed *et al.*, 2007). La inmovilización de  $\alpha$ -glucosidasa sobre micropartículas de polimetacrilato recubiertas de

quitosano activadas mediante GA también lograron incrementar la temperatura de la actividad óptima de la enzima en 10°C (Sha *et al.*, 2014). También la  $\alpha$ -glucosidasa de *A. niger* incrementó su temperatura optima en 10°C y fue activa en un mayor rango de pH al ser inmovilizada sobre papel de celulosa modificado con quitosano y activado con 10% GA (Liu, Chen y Shi, 2019), mientras que la inmovilización de la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* sobre *chitosan beads* con GP aumentó su termoestabilidad a 50°C (Flores *et al.*, 2019). De una forma similar, la inmovilización de la lacasa de *Trametes pubescens*, también confirió a la enzima una mayor actividad tras activación de las *chitosan beads* con 0,1% de GP y aumentó tanto la temperatura óptima, en unos 10°C, como el rango de pH de la actividad enzimática (Ma *et al.*, 2018).

La estabilidad operacional adquirida de la actividad hidrolítica de GAM1 se mantuvo durante los 20 ciclos de reutilización realizados, pero en el caso de la utilización de GP como linker incluso aumenta durante los últimos ciclos (Figura 4.35). Hay que destacar que la integridad del soporte tratado con GP pierde su estructura durante estos últimos ciclos, lo que puede exponer enzimas que están poco accesibles y dar lugar con ello al incremento de actividad. La pérdida de la integridad del soporte puede deberse a que el quitosano es soluble a valores de pH ácidos y posiblemente el tratamiento con GP no consigue estabilizarlo. La síntesis de IMOs por parte de los biocatalizadores en la reacción de transglucosilación es parecida en ambas condiciones y similar a la obtenida por la enzima libre. Sin embargo, el biocatalizador inmovilizado con GP tiene muy poca estabilidad operacional perdiendo actividad tras el primer ciclo, aunque se estabiliza tras el ciclo 6 (Figura 4.36). En este sentido, la xilanasa de *Trametes pubescens* inmovilizada con GP perdió hasta un 80% de actividad tras 6 ciclos de reacción (Gracida *et al.*, 2019), pérdidas de actividad que han sido atribuidas a la inactivación de la enzima a pesar de que las inmovilizaciones se desarrollaron para incrementar su estabilidad. En el caso de la inmovilización de GAM1 parte de la disminución de actividad se debe a la pérdida en cada ciclo de parte del soporte inmovilizado con GP, a pesar de haber aumentado el pH a 7 para mejorar su estabilidad.

Por el momento, a pesar de las ventajas generales que aporta el uso de GP en las inmovilizaciones enzimáticas, en el caso particular de GAM1 y usando como soporte quitosano, el GA ha otorgado una estabilidad mayor al sistema en todas las condiciones ensayadas a pesar de tener una eficiencia y actividad recuperada menor que la que confiere la GP. Aun así, queda aún por investigar si cambiando las condiciones de preactivación del soporte, utilizando temperaturas y pH más altos conseguirían obtener un biocatalizador más estable.



# CONCLUSIONES

## 6 CONCLUSIONES

1. La enzima GAM1 de *Scwhanniomyces occidentalis* ha sido expresada con éxito en *Pichia pastoris*, organismo que ha reconocido su secuencia señal de exportación. En este sistema se han producido unos 20 mg L<sup>-1</sup> de GAM1. La enzima ha sido purificada a partir del medio extracelular de la levadura utilizando filtración tangencial.
2. Se ha caracterizado la actividad hidrolasa y transferasa de la enzima producida en *P. pastoris*. La enzima hidroliza maltosa e isomaltosa pero se obtienen valores de eficiencia catalítica ( $k_{\text{cat}} K_M^{-1}$ ) al menos 70 veces mayor en el primer caso. Por transglucosilación de maltosa GAM1 produce principalmente los isomaltooligosacáridos panosa, isomaltosa e isomaltotriosa, y en menores cantidades kojibosa e isomaltotetraosa. Además, produce maltotriosa. Se ha modulado la producción de IMOs mediante la adición de glucosa, que favorece la formación de azúcares con enlaces  $\alpha(1-6)$  pero no con  $\alpha(1-4)$ .
3. Se ha evaluado la capacidad de GAM1 para glucosilar 12 potenciales aceptores hidroxilados, incluyendo 7 azúcares y 4 compuestos que incluyen anillos aromáticos. La enzima glucosiló sacarosa y xilosa generando el trisacárido teanderosa y glucosil-xilosa, respectivamente. La glucosilación de xilosa se produjo a través de dos tipos de enlaces,  $\alpha(1-4)$  y  $\alpha(1-1)$ . GAM1 glucosiló también piceido, un derivado monoglucosilado del resveratrol, generando mono- y diglucósido de piceido en la que las unidades de glucosas se unen con enlaces  $\alpha(1-6)$ .
4. Se analizó la producción de IMOS directamente en cultivos de *P. pastoris* que expresaban GAM1 y suplementados con maltosa, reacción one-pot. En matraz solo se detectó la producción de panosa y la maltosa utilizada como sustrato. Al escalar la reacción a nivel de fermentador se produjeron 0,5 g L<sup>-1</sup> de enzima, pero aparentemente no se logró mejorar la producción de panosa ni eliminar completamente la glucosa formada a partir de maltosa en las reacciones.
5. Se han realizado distintos modelos estructurales por homología de GAM1. En ellos se han usado las estructuras ya resueltas de dos  $\alpha$ -glucosidasas intestinales humanas y la  $\alpha$ -glucosidasa de *Beta vulgaris*, proteínas de la familia GH31 con las que la enzima de *S. occidentalis* muestra una gran similitud de secuencia. Se han identificado los residuos catalíticos D472 y D640 que actúan como nucleófilo y catalizador ácido/base, respectivamente. Se obtuvieron los mutantes inactivos que incluían las sustituciones D472A y D640A para verificar la funcionalidad de estos residuos.

6. Se ha demostrado por mutación puntual que los residuos hidrofóbicos W324, W435 y F479, posiciones altamente conservadas y que tienen una fuerte interacción entre sí, están implicados tanto en la actividad hidrolasa como en la transferasa de la enzima por su localización a lo largo del subsitio -1 y +1.
7. Se ha demostrado que la sustitución W470F, un residuo situado en el subsitio -1, modifica en gran medida la especificidad de la síntesis de IMOs de la enzima, ya que se duplica la producción de isomaltosa, isomaltotriosa y kojibiosa, y además se sintetiza trehalosa, un disacárido con enlace  $\alpha(1-1)$  no producido por la variante wild type de GAM1.
8. La enzima GAM1 fue inmovilizada en chitosan beads utilizando glutaraldehido (GA) o genipina (GP) como linkers con eficiencias de inmovilización inferiores al 5%. La actividad de la enzima recuperada tras la inmovilización fue superior al utilizar GP, pero la estabilidad a distintos valores de pH, temperatura y operacional, fue superior con GA, manteniéndose la actividad hidrolítica del biocatalizador inmovilizado durante 20 ciclos de reutilización y la actividad de transglicosilación durante 10.

## Bibliografía

Abarca, D. *et al.* (1991) «Isolation of a new gene (SWA2) encoding an  $\alpha$ -amylase from *Schwanniomyces occidentalis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*», *FEBS Letters*, 279(1), pp. 41-44. doi: 10.1016/0014-5793(91)80245-X.

De Abreu, M. *et al.* (2013) «Synthesis of 6-kestose using an efficient  $\beta$ -fructofuranosidase engineered by directed evolution», *Advanced Synthesis and Catalysis*, 355(9), pp. 1698-1702. doi: 10.1002/adsc.201200769.

Ahmed, K. S. O. H. *et al.* (2007) «Preparation and studies on immobilized  $\alpha$ -glucosidase from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*», *Journal of the Serbian Chemical Society*. Serbian Chemical Society, 72(12), pp. 1255-1263. doi: 10.2298/JSC0712255A.

Álvaro-Benito, M. *et al.* (2010) «New insights into the fructosyltransferase activity of *Schwanniomyces occidentalis*  $\beta$ -fructofuranosidase, emerging from nonconventional codon usage and directed mutation», *Applied and Environmental Microbiology*. 2010/09/17. American Society for Microbiology (ASM), 76(22), pp. 7491-7499. doi: 10.1128/AEM.01614-10.

Álvaro-Benito, M. *et al.* (2012) «Structural and kinetic insights reveal that the amino acid pair Gln-228/Asn-254 modulates the transfructosylating specificity of *Schwanniomyces occidentalis*  $\beta$ -fructofuranosidase, an enzyme that produces prebiotics.», *The Journal of biological chemistry*, 287(23), pp. 19674-86. doi: 10.1074/jbc.M112.355503.

Álvaro-Benito, M. *et al.* (2013) «Assessment of *Schwanniomyces occidentalis* as a host for protein production using the wide-range Xplor®2 expression platform», *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer, 97(10), pp. 4443-4456. doi: 10.1007/s00253-012-4527-9.

Ardèvol, A. y Rovira, C. (2015) «Reaction Mechanisms in Carbohydrate-Active Enzymes: Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Insights from ab Initio Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Dynamic Simulations», *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, pp. 7528-7547. doi: 10.1021/jacs.5b01156.

Barbosa, O. *et al.* (2014) «Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization», *RSC Advances*. The Royal Society of Chemistry, 4(4), pp. 1583-1600. doi: 10.1039/c3ra45991h.

Barreteau, H., Delattre, C. y Michaud, P. (2006) «Production of Oligosaccharides as Promising New Food Additive Generation», 44(3), pp. 323-333.

Bartosikova, L. y Necas, J. (2018) «Epigallocatechin gallate: A review», *Veterinarni Medicina*.

Czech Academy of Agricultural Sciences, pp. 443-467. doi: 10.17221/31/2018-VETMED.

Basu, A., Mutturi, S. y Prapulla, S. G. (2016) «Production of isomaltooligosaccharides (IMO) using simultaneous saccharification and transglucosylation from starch and sustainable sources», *Process Biochemistry*. Elsevier, 51(10), pp. 1464-1471. doi: 10.1016/j.procbio.2016.06.008.

Bharti, S. K. *et al.* (2015) «Mechanism-based antidiabetic activity of Fructo- and isomaltooligosaccharides: Validation by in vivo, in silico and in vitro interaction potential», *Process Biochemistry*, 50(2), pp. 317-327. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.014>.

Bilal, M. *et al.* (2019) «Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design», *Critical Reviews in Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd, pp. 202-219. doi: 10.1080/07388551.2018.1531822.

Biró, E. *et al.* (2008) «Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization.», *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(6), pp. 1240-1246. doi: 10.1016/j.jprot.2007.11.005.

Brewer, C. F. *et al.* (1986) «Catalytic versatility of trehalase: Synthesis of  $\alpha$ -d-glucopyranosyl  $\alpha$ -d-xylopyranoside from  $\beta$ -d-glucosyl fluoride and  $\alpha$ -d-xylose», *Carbohydrate Research*. Elsevier, 146(1), pp. 39-42. doi: 10.1016/0008-6215(86)85022-4.

Britton, H. T. S. y Robinson, R. A. (1931) «Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal», *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. The Royal Society of Chemistry, (0), pp. 1456-1462. doi: 10.1039/jr9310001456.

Cantarel, B. I. *et al.* (2009) «The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics», *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1), pp. 233-238. doi: 10.1093/nar/gkn663.

Cao, H. *et al.* (2014) «Trp358 is a key residue for the multiple catalytic activities of multifunctional amylase OPMA-N from *Bacillus* sp. ZW2531-1», *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer, 98(5), pp. 2101-2111. doi: 10.1007/s00253-013-5085-5.

Casa-Villegas, M., Marín-Navarro, J. y Polaina, J. (2017) «Synthesis of Isomaltooligosaccharides by *Saccharomyces cerevisiae* Cells Expressing *Aspergillus niger*  $\alpha$ -Glucosidase», *ACS Omega*, 2(11), pp. 8062-8068. doi: 10.1021/acsomega.7b01189.

Casa-Villegas, M., Marín-Navarro, J. y Polaina, J. (2018) «Amylases and related glycoside hydrolases with transglycosylation activity used for the production of isomaltooligosaccharides», *Amylase*, 2(1), pp. 17-29. doi: 10.1515/amylase-2018-0003.

- Cencic, A. y Chingwaru, W. (2010) «The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health», *Nutrients*. Molecular Diversity Preservation International, 2(6), pp. 611-625. doi: 10.3390/nu2060611.
- Chen, H. *et al.* (2019) «Insight into the glycosylation and hydrolysis kinetics of alpha-glucosidase in the synthesis of glycosides», *Applied Microbiology and Biotechnology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(23-24), pp. 9423-9432. doi: 10.1007/s00253-019-10205-6.
- Chen, P. *et al.* (2018) «Starch biotransformation into isomaltooligosaccharides using thermostable alpha-glucosidase from *Geobacillus stearothermophilus*», *PeerJ*. PeerJ Inc., 2018(6), p. e5086. doi: 10.7717/peerj.5086.
- Chockchaisawasdee, S. y Poosaran, N. (2013) «Production of isomaltooligosaccharides from banana flour», *Journal of the Science of Food and Agriculture*. John Wiley & Sons, Ltd, 93(1), pp. 180-186. doi: 10.1002/jsfa.5747.
- Córdova, A., Astudillo, C. y Illanes, A. (2018) *Membrane technology for the purification of enzymatically produced oligosaccharides*, *Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology*. doi: 10.1016/B978-0-12-815056-6.00004-8.
- Costa, C. *et al.* (2017) «Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases», *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier Ltd, pp. 286-299. doi: 10.1016/j.fct.2017.10.023.
- Crittenden, R. G. y Playne, M. J. (1996) «Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides», *Trends in Food Science and Technology*, 7(11), pp. 353-361. doi: 10.1016/S0924-2244(96)10038-8.
- Davies, G. y Henrissat, B. (1995) «Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases», *Structure*. Cell Press, 3(9), pp. 853-859. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00220-9.
- Davies, G. J., Wilson, K. S. y Henrissat, B. (1997) «Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases [1]», *Biochemical Journal*. Portland Press Ltd, pp. 557-559. doi: 10.1042/bj3210557.
- Dohmen, R. J. *et al.* (1990) «Cloning of the *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase gene (GAM1) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*», *Gene*, 95(1), pp. 111-121. doi: 10.1016/0378-1119(90)90421-M.
- Dohmen, R. J. y Hollenberg, C. P. (1996) «*Schwanniomyces occidentalis*», en *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 117-137. doi: 10.1007/978-3-642-79856-6\_4.

- Ernst, H. A. *et al.* (2006) «Structure of the *Sulfolobus solfataricus*  $\alpha$ -Glucosidase: Implications for Domain Conservation and Substrate Recognition in GH31», *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 358(4), pp. 1106-1124. doi: 10.1016/j.jmb.2006.02.056.
- Fernandez-Arrojo, L. *et al.* (2015) «Micro-scale procedure for enzyme immobilization screening and operational stability assays», *Biotechnology Letters*. Springer Netherlands, 37(8), pp. 1593-1600. doi: 10.1007/s10529-015-1835-z.
- Flores, E. E. E. *et al.* (2019) «Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization», *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 84, pp. 73-80. doi: 10.1016/j.procbio.2019.06.001.
- Fujimoto, Z. *et al.* (2017) «Isomaltooligosaccharide-binding structure of *Paenibacillus* sp. 598K cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase», *Bioscience Reports*. Portland Press Ltd, 37(2), p. 20170253. doi: 10.1042/BSR20170253.
- Gabriško, M. (2020) «The in silico characterization of neutral alpha-glucosidase C (GANC) and its evolution from GANAB», *Gene*. Elsevier B.V., 726, p. 144192. doi: 10.1016/j.gene.2019.144192.
- Garcia-Gonzalez, M. *et al.* (2020) «Molecular characterization and heterologous expression of two  $\alpha$ -glucosidases from *Metschnikowia* spp, both producers of honey sugars», *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, 19(1), pp. 1-14. doi: 10.1186/s12934-020-01397-y.
- Gasteiger, E. *et al.* (2005) «The Proteomics Protocols Handbook», *The Proteomics Protocols Handbook*, pp. 571-608. doi: 10.1385/1592598900.
- Gericke, B. *et al.* (2017) «Structure-function analysis of human sucrase-isomaltase identifies key residues required for catalytic activity», *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 292(26), pp. 11070-11078. doi: 10.1074/jbc.M117.791939.
- Gibson, G. R. *et al.* (2017) «Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics», *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, pp. 491-502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.
- Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (1995) «Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.», *The Journal of nutrition*, 125(6), pp. 1401-1412. doi: 10.1079/NRR200479.
- Goffin, D. *et al.* (2011) «Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the European and American market? The status of knowledge on these

prebiotics.», *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(5), pp. 394-409. doi: 10.1080/10408391003628955.

Gonzalez-Alfonso, J. L. *et al.* (2018) «Efficient  $\alpha$ -Glucosylation of Epigallocatechin Gallate Catalyzed by Cyclodextrin Glucanotransferase from *Thermoanaerobacter Species*», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(28), pp. 7402-7408. doi: 10.1021/acs.jafc.8b02143.

Gracida, J. *et al.* (2019) «Improved Thermal and Reusability Properties of Xylanase by Genipin Cross-Linking to Magnetic Chitosan Particles», *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Humana Press Inc., 188(2), pp. 395-409. doi: 10.1007/s12010-018-2928-7.

Grubic, T. J. *et al.* (2019) «Comparison of ingesting a food bar containing whey protein and isomalto-oligosaccharides to carbohydrate on performance and recovery from an acute bout of resistance-exercise and sprint conditioning: An open label, randomized, counterbalanced, crossover pilot study», *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. BioMed Central Ltd., 16(1), p. 34. doi: 10.1186/s12970-019-0301-z.

Gutiérrez-Alonso, P. *et al.* (2016) «Molecular characterization and heterologous expression of a *Xanthophyllomyces dendrorhous*  $\alpha$ -glucosidase with potential for prebiotics production», *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), pp. 3125-3135. doi: 10.1007/s00253-015-7171-3.

Henrissat, B. (1991) «A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities», *Biochemical Journal*. Portland Press, 280(2), pp. 309-316. doi: 10.1042/bj2800309.

Hollenberg, C. P. y Strasser, A. W. M. (1990) «Improvement of baker's and brewer's yeast by gene technology», *Food Biotechnology*. Taylor & Francis Group, 4(1), pp. 527-534. doi: 10.1080/08905439009549765.

Homaei, A. (2015) «Enzyme immobilization and its application in the food industry», en *Advances in Food Biotechnology*. Wiley, pp. 145-164. doi: 10.1002/9781118864463.ch09.

Homaei, A. A. *et al.* (2013) «Enzyme immobilization: An update», *Journal of Chemical Biology*. Springer Verlag, pp. 185-205. doi: 10.1007/s12154-013-0102-9.

Hu, Y., Winter, V. y Gänzle, M. (2020) «In vitro digestibility of commercial and experimental isomalto-oligosaccharides», *Food Research International*. Elsevier, 134(April), p. 109250. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109250.

Hulseweh, B. *et al.* (1997) «Characterization of The Active Site of *Schwanniomyces Occidentalis* Glucoamylase by In Vitro Mutagenesis», *European Journal of Biochemistry*. Blackwell Publishing Ltd, 244(1), pp. 128-133. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00128.x.



- Inohara-Ochiai, M. *et al.* (2000) «An active-site mutation causes enhanced reactivity and altered regiospecificity of transglucosylation catalyzed by the *Bacillus* sp. SAM 1606  $\alpha$ -glucosidase», *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(5), pp. 431-437. doi: 10.1016/S1389-1723(00)89092-1.
- Jin, X. *et al.* (2011) «The effect of the chitosan membrane properties on the enzyme adsorption and performance for the construction of horseradish peroxidase biosensors», *Carbohydrate Polymers*. Elsevier, 85(4), pp. 786-791. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.03.048.
- Kaneko, T. *et al.* (1994) «Effects of Isomaltooligosaccharides with Different Degrees of Polymerization on Human Fecal Bifidobacteria», *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 58(12), pp. 2288-2290. doi: 10.1271/bbb.58.2288.
- Kato, N. *et al.* (2002) «Novel  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglucosylation activity», *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), pp. 1250-1256. doi: 10.1128/AEM.68.3.1250-1256.2002.
- Kawano, A. *et al.* (2019) «A Novel  $\alpha$ -Glucosidase of the Glycoside Hydrolase Family 31 from *Aspergillus sojae*», *Journal of Applied Glycoscience*. The Japanese Society of Applied Glycoscience, 66(2), pp. 73-81. doi: 10.5458/jag.jag.JAG-2018\_0012.
- Kawano, A. *et al.* (2020) «Analysis of Transglucosylation Products of *Aspergillus niger*  $\alpha$ -Glucosidase that Catalyzes the Formation of  $\alpha$ -1,2- and  $\alpha$ -1,3-Linked Oligosaccharides», *Journal of Applied Glycoscience*. The Japanese Society of Applied Glycoscience, 67(2), pp. 41-49. doi: 10.5458/jag.jag.jag-2019\_0015.
- Ketabi, A., Dieleman, L. A. y Gänzle, M. G. (2011) «Influence of isomalto-oligosaccharides on intestinal microbiota in rats», *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 110(5), pp. 1297-1306. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04984.x.
- Kitai, T. y Tang, W. H. W. (2017) «The Role and Impact of Gut Microbiota in Cardiovascular Disease», *Revista Espanola de Cardiologia*. Ediciones Doyma, S.L., 70(10), pp. 799-800. doi: 10.1016/j.recesp.2017.04.003.
- Koshland, D. E. (1953) «Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions», *Biological Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, 28(4), pp. 416-436. doi: 10.1111/j.1469-185X.1953.tb01386.x.
- Kumar, S. y Mutturi, S. (2020) «Expression of a novel  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus neoniger* in *Pichia pastoris* and its efficient recovery for synthesis of isomaltooligosaccharides», *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier Inc., 141, p. 109653. doi:

10.1016/j.enzmictec.2020.109653.

Laemmli, U. K. y Favre, M. (1973) «Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events», *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 80(4), pp. 575-599. doi: 10.1016/0022-2836(73)90198-8.

Lee, B. H. *et al.* (2014) «Mucosal C-terminal maltase-glucoamylase hydrolyzes large size starch digestion products that may contribute to rapid postprandial glucose generation», *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(5), pp. 1111-1121. doi: 10.1002/mnfr.201300599.

Lee, B. H. *et al.* (2016) «Contribution of the Individual Small Intestinal  $\alpha$ -Glucosidases to Digestion of Unusual  $\alpha$ -Linked Glycemic Disaccharides», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society, 64(33), pp. 6487-6494. doi: 10.1021/acs.jafc.6b01816.

Lee, C. C., Wang, H. F. y Lin, S. D. (2008) «Effect of isomaltooligosaccharide syrup on quality characteristics of sponge cake», *Cereal Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, 85(4), pp. 515-521. doi: 10.1094/CCHEM-85-4-0515.

Lee, H. S. *et al.* (2002) «Cooperative action of  $\alpha$ -glucanotransferase and maltogenic amylase for an improved process of isomaltooligosaccharide (IMO) production», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society , 50(10), pp. 2812-2817. doi: 10.1021/jf011529y.

Lee, H. Y. *et al.* (2003) «Preparation and characterization of maltosyl-sucrose isomers produced by transglycosylation of maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus*», *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Elsevier, 26(3-6), pp. 293-305. doi: 10.1016/j.molcatb.2003.08.003.

Legeay, S. *et al.* (2015) «Epigallocatechin gallate: A review of its beneficial properties to prevent metabolic syndrome», *Nutrients*. MDPI AG, pp. 5443-5468. doi: 10.3390/nu7075230.

Li, N. *et al.* (2019) « High-yield synthesis of glucooligosaccharides (GIOS) as potential prebiotics from glucose via non-enzymatic glycosylation », *Green Chemistry*. Royal Society of Chemistry, 21(10), pp. 2686-2698. doi: 10.1039/c9gc00663j.

Li, Z. *et al.* (2017) «Transglucosylation of ascorbic acid to ascorbic acid 2-glucoside by a truncated version of  $\alpha$ -glucosidase from *Aspergillus niger*», *Journal of Food Biochemistry*. Blackwell Publishing Ltd, 41(6), p. e12432. doi: 10.1111/jfbc.12432.

Likotrafiti, E. *et al.* (2014) «An invitro study of the effect of probiotics, prebiotics and synbiotics on the elderly faecal microbiota», *Anaerobe*, 27, pp. 50-55. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.03.009.

Lim, C. H. *et al.* (2021) «Comprehensive study on transglycosylation of CGTase from various sources», *Heliyon*. Elsevier Ltd, p. e06305. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06305.

Liu, D. M., Chen, J. y Shi, Y. P. (2019) « $\alpha$ -Glucosidase immobilization on chitosan-modified cellulose filter paper: Preparation, property and application», *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 122, pp. 298-305. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.177.

Liu, H. y Naismith, J. H. (2008) «An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol», *BMC Biotechnology*, 8(1), p. 91. doi: 10.1186/1472-6750-8-91.

Lombard, V. *et al.* (2014) «The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013», *Nucleic Acids Research*, 42(D1), pp. 490-495. doi: 10.1093/nar/gkt1178.

Lovering, A. L. *et al.* (2005) «Mechanistic and structural analysis of a family 31 alpha-glycosidase and its glycosyl-enzyme intermediate.», *The Journal of biological chemistry*, 280(3), pp. 2105-15. doi: 10.1074/jbc.M410468200.

Lua, R. C. y Lichtarge, O. (2010) «PyETV: A PyMOL evolutionary trace viewer to analyze functional site predictions in protein complexes», *Bioinformatics*. Oxford Academic, 26(23), pp. 2981-2982. doi: 10.1093/bioinformatics/btq566.

Luz Sanz, M. *et al.* (2005) «In Vitro Investigation into the Potential Prebiotic Activity of Honey Oligosaccharides», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society, 53(8), pp. 2914-2921. doi: 10.1021/jf0500684.

Ma, H. F. *et al.* (2018) «Chitosan crosslinked with genipin as supporting matrix for biodegradation of synthetic dyes: Laccase immobilization and characterization», *Chemical Engineering Research and Design*. Institution of Chemical Engineers, 132, pp. 664-676. doi: 10.1016/j.cherd.2018.02.008.

Ma, M. *et al.* (2017) «Effects of mutation of Asn694 in *Aspergillus niger*  $\alpha$ -glucosidase on hydrolysis and transglucosylation», *Applied Microbiology and Biotechnology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 101(16), pp. 6399-6408. doi: 10.1007/s00253-017-8402-6.

Mangas-Sánchez, J. y Adlercreutz, P. (2015) «Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglycosylation: A comparative study of glucosidases», *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Elsevier B.V., 122, pp. 51-55. doi: 10.1016/j.molcatb.2015.08.014.

Marín, D., Linde, D. y Fernández Lobato, M. (2006) «Purification and biochemical characterization of an  $\alpha$ -glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*», *Yeast*. John Wiley & Sons, Ltd, 23(2), pp. 117-125. doi: 10.1002/yea.1345.

- McCarter, J. D. y Withers, S. G. (1996) «Unequivocal identification of Asp-214 as the catalytic nucleophile of *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -glucosidase using 5-fluoro glycosyl fluorides», *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), pp. 6889-6894. doi: 10.1074/jbc.271.12.6889.
- Meyer, T. S. M. *et al.* (2015) «Biotechnological Production of Oligosaccharides — Applications in the Food Industry», *Food Production and Industry*. doi: 10.5772/60934.
- Migas, P. y Krauze-Baranowska, M. (2015) «The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics», *Phytochemistry Letters*. Elsevier Ltd, pp. 35-40. doi: 10.1016/j.phytol.2015.05.015.
- Mohd Yusof, Y. A. (2016) «Gingerol and its role in chronic diseases», en *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 177-207. doi: 10.1007/978-3-319-41342-6\_8.
- Morel Du Boil, P. G. (1996) «Theandrose - A characteristic of cane sugar crystals», *Proc S Afr Sug Technol Assoc*, (70), pp. 140-144.
- Naim, H. Y. *et al.* (1991) «Striking structural and functional similarities suggest that intestinal sucrase-isomaltase, human lysosomal  $\alpha$ -glucosidase and *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase are derived from a common ancestral gene», *FEBS Letters*. FEBS Lett, 294(1-2), pp. 109-112. doi: 10.1016/0014-5793(91)81353-A.
- Nakakuki, T. (2003) «Development of functional oligosaccharides in Japan», *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. Gakushin Publishing Company, pp. 57-64. doi: 10.4052/tigg.15.57.
- Nakakuki, T. (2005) «Present Status and Future Prospects of Functional Oligosaccharide Development in Japan», *Journal of Applied Glycoscience*. The Japanese Society of Applied Glycoscience, 52(3), pp. 267-271. doi: 10.5458/jag.52.267.
- Nimpiboon, P. *et al.* (2011) «Synthesis of a novel prebiotic trisaccharide by a type i  $\alpha$ -glucosidase from *B. licheniformis* strain TH4-2», *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 46(2), pp. 448-457. doi: 10.1016/j.procbio.2010.09.018.
- Nishizawa, M. *et al.* (1994) «Synthesis and Glycosylation Shift of 1,1'-Disaccharides», *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. The Pharmaceutical Society of Japan, 42(4), pp. 982-984. doi: 10.1248/cpb.42.982.
- Niu, D. *et al.* (2017) «Highly efficient enzymatic preparation of isomalto-oligosaccharides from starch using an enzyme cocktail», *Electronic Journal of Biotechnology*. Elsevier, 26, pp. 46-51. doi: 10.1016/J.EJBT.2016.12.002.

- Ojima, T. *et al.* (2012) « $\alpha$ -Glucosylated 6-gingerol: Chemoenzymatic synthesis using  $\alpha$ -glucosidase from *Halomonas* sp. H11, and its physical properties», *Carbohydrate Research*. Elsevier, 354, pp. 59-64. doi: 10.1016/j.carres.2012.03.012.
- Okuyama, M. *et al.* (2006) «Structural elements to convert *Escherichia coli*  $\alpha$ -xylosidase (Yicl) into  $\alpha$ -glucosidase», *FEBS Letters*. No longer published by Elsevier, 580(11), pp. 2707-2711. doi: 10.1016/j.febslet.2006.04.025.
- Pan, Y. C. y Lee, W. C. (2005) «Production of high-purity isomalto-oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells», *Biotechnology and Bioengineering*. John Wiley & Sons, Ltd, 89(7), pp. 797-804. doi: 10.1002/bit.20402.
- Phadungcharoen, N. *et al.* (2019) «Facile and green fabrication of biocatalytic chitosan beads by one-step genipin-mediated  $\beta$ -glucosidase immobilization for production of bioactive genistein», *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. Elsevier B.V., 14, p. 100187. doi: 10.1016/j.scp.2019.100187.
- Piedrabuena, D. *et al.* (2016) «Exploring the transferase activity of Ffase from *Schwanniomyces occidentalis*, a  $\beta$ -fructofuranosidase showing high fructosyl-acceptor promiscuity», *Applied Microbiology and Biotechnology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(20), pp. 8769-8778. doi: 10.1007/s00253-016-7628-z.
- Piontek, M. *et al.* (1998) «Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis*», *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer, 50(3), pp. 331-338. doi: 10.1007/s002530051300.
- Putman, E. W., Litt, C. F. y Hassid, W. Z. (1955) «The Structure of D-Glucosyl-D-xylose Synthesized by Maltose Phosphorylase», *Journal of the American Chemical Society*, 77(16), pp. 4351-4353. doi: 10.1021/ja01621a050.
- Rastall, R. A. (2010) «Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture», *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), pp. 305-339. doi: 10.1146/annurev.food.080708.100746.
- Ren, L. *et al.* (2011) «Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase», *Protein and Cell*. Higher Education Press, 2(10), pp. 827-836. doi: 10.1007/s13238-011-1105-3.
- Rengarajan, S. y Palanivel, R. (2020) «High purity prebiotic isomalto-oligosaccharides production by cell associated transglucosidase of isolated strain *Debaryomyces hansenii* SCY204 and selective fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* SY1065», *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 98, pp. 93-105. doi: 10.1016/j.procbio.2020.07.024.

- Rinninella, E. *et al.* (2019) «What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases», *Microorganisms*. MDPI AG, 7(1), p. 14. doi: 10.3390/microorganisms7010014.
- Rizvi, K. B. P. and S. I. (2012) «Recent Advances in Health Promoting Effect of Dietary Polyphenols», *Current Nutrition & Food Science*, pp. 254-264. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/157340112803832228>.
- Robert, X. y Gouet, P. (2014) «Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server», *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 42(W1), pp. 320-324. doi: 10.1093/nar/gku316.
- Rodrigo-Frutos, D. *et al.* (2019) «Yeast cultures expressing the Ffase from *Schwanniomyces occidentalis*, a simple system to produce the potential prebiotic sugar 6-kestose», *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), pp. 279-289. doi: 10.1007/s00253-018-9446-y.
- Rolim, P. M. (2015) «Development of prebiotic food products and health benefits», *Food Science and Technology*. Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, SBCTA, 35(1), pp. 3-10. doi: 10.1590/1678-457X.6546.
- Ruiz-Aceituno, L. *et al.* (2017) «Enzymatic Synthesis and Structural Characterization of Theanderose through Transfructosylation Reaction Catalyzed by Levansucrase from *Bacillus subtilis* CECT 39», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(48), pp. 10505-10513. doi: 10.1021/acs.jafc.7b03092.
- Ruiz-Matute, A. I. *et al.* (2010) «Gas chromatographic-mass spectrometric characterisation of tri- and tetrasaccharides in honey», *Food Chemistry*. Elsevier, 120(2), pp. 637-642. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.10.050.
- Saburi, W. *et al.* (2015) «Biochemical properties and substrate recognition mechanism of GH31  $\alpha$ -glucosidase from *Bacillus* sp. AHU 2001 with broad substrate specificity», *Biochimie*. Elsevier Ltd, 108, pp. 140-148. doi: 10.1016/j.biochi.2014.11.010.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) «Molecular cloning: a laboratory manual.», *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (Ed. 2).
- Sato, F. *et al.* (2005) «Glucoamylase Originating from *Schwanniomyces occidentalis* Is a Typical  $\alpha$ -Glucosidase», *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(10), pp. 1905-1913. doi: 10.1271/bbb.69.1905.
- Schrödinger, L. & DeLano, W. (2020) «PyMol». Disponible en: <http://www.pymol.org/pymol>.
- Sears, I. B. *et al.* (1998) «A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene

expression in *Pichia pastoris*», *Yeast*, 14(8), pp. 783-790. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(19980615)14:8<783::AID-YEA272>3.0.CO;2-Y.

Seo, S. H. *et al.* (2011) «Characterization of the catalytic and kinetic properties of a thermostable *Thermoplasma acidophilum*  $\alpha$ -glucosidase and its transglucosylation reaction with arbutin», *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Elsevier, 72(3-4), pp. 305-312. doi: 10.1016/j.molcatb.2011.07.006.

Serra, A. *et al.* (2010) «Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in in vitro and in vivo models», *British Journal of Nutrition*. Cambridge University Press, 103(7), pp. 944-952. doi: 10.1017/S0007114509992741.

Sha, B. Y. *et al.* (2014) «Alpha-Glucosidase Immobilization Based on PMMA/Chitosan Core-Shell Microparticles», en *Advanced Materials Research*. Trans Tech Publications Ltd, pp. 507-511. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.887-888.507.

Sheu, D. C., Huang, C. I. y Duan, K. J. (1997) «Production of isomaltooligosaccharides by  $\alpha$ -glucosidase immobilized in chitosan beads by polyethyleneimine-glutaraldehyde treated mycelia of *Aspergillus carbonarius*», *Biotechnology Techniques*. Springer Netherlands, 11(5), pp. 287-291. doi: 10.1023/a:1018407009503.

Shimokawa, H. *et al.* (1995) «Effects of Oligosaccharide Containing Theandrose on Intestinal Microflora in Healthy Humans.», *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*. Japanese Society of Nutrition and Food Science, 48(1), pp. 57-60. doi: 10.4327/jsnfs.48.57.

Sim, L. *et al.* (2008) «Human Intestinal Maltase–Glucoamylase: Crystal Structure of the N-Terminal Catalytic Subunit and Basis of Inhibition and Substrate Specificity», *Journal of Molecular Biology*. Academic Press, 375(3), pp. 782-792. doi: 10.1016/J.JMB.2007.10.069.

Sim, L. *et al.* (2010) «Structural basis for substrate selectivity in human maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase N-terminal domains», *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 285(23), pp. 17763-17770. doi: 10.1074/jbc.M109.078980.

Song, K.-M. *et al.* (2013) «Aromatic residue on  $\beta \rightarrow \alpha$  loop 1 in the catalytic domain is important to the transglycosylation specificity of glycoside hydrolase family 31  $\alpha$ -glucosidase.», *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(8), pp. 1759-65. doi: 10.1271/bbb.130325.

Sorndech, W. *et al.* (2018) «Isomalto-oligosaccharides: Recent insights in production technology and their use for food and medical applications», *LWT*. Academic Press, 95(April), pp. 135-142. doi: 10.1016/j.lwt.2018.04.098.

Spiwok, V. (2017) «CH/ $\pi$  interactions in carbohydrate recognition», *Molecules*. MDPI AG, p. 1038. doi: 10.3390/molecules22071038.

- Su, D. *et al.* (2013) «Comparision of Piceid and Resveratrol in Antioxidation and Antiproliferation Activities In Vitro», *PLoS ONE*. Public Library of Science, 8(1), p. e54505. doi: 10.1371/journal.pone.0054505.
- Subhan, F. B. *et al.* (2020) «Ingestion of isomalto-oligosaccharides stimulates insulin and incretin hormone secretion in healthy adults», *Journal of Functional Foods*, 65, p. 103730. doi: 10.1016/j.jff.2019.103730.
- Tacias-Pascacio, V. G. *et al.* (2019) «Genipin as an emergent tool in the design of biocatalysts: Mechanism of reaction and applications», *Catalysts*. MDPI AG, p. 1035. doi: 10.3390/catal9121035.
- Tagami, T. *et al.* (2013) «Molecular basis for the recognition of long-chain substrates by plant  $\alpha$ -glucosidases», *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 288(26), pp. 19296-19303. doi: 10.1074/jbc.M113.465211.
- Thitaram, S. N. *et al.* (2005) «Isomaltooligosaccharide increases cecal *Bifidobacterium* population in young broiler chickens», *Poultry Science*. Poultry Science Association, 84(7), pp. 998-1003. doi: 10.1093/ps/84.7.998.
- Tungland, B. C. y Meyer, D. (2002) «Nondigestible oligo-and polysaccharides (dietary fiber): Their physiology and role in human health and food», *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Blackwell Publishing Inc., 1(3), pp. 90-109. doi: 10.1111/j.1541-4337.2002.tb00009.x.
- Verma, M. L. *et al.* (2020) «Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications», *Environmental Chemistry Letters*. Springer, pp. 315-323. doi: 10.1007/s10311-019-00942-5.
- Wang, B. *et al.* (2017) «The Human Microbiota in Health and Disease», *Engineering*. Elsevier Ltd, pp. 71-82. doi: 10.1016/J.ENG.2017.01.008.
- Wang, H.-F. *et al.* (2001) «Use of isomalto-oligosaccharide in the treatment of lipid profiles and constipation in hemodialysis patients», *Journal of Renal Nutrition*. Elsevier BV, 11(2), pp. 73-79. doi: 10.1016/s1051-2276(01)92591-9.
- Wang, S. *et al.* (2017) «A new GH13  $\alpha$ -glucosidase from alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* 703 with both exo- $\alpha$ -l, 4-glucosidase and oligo-l, 6-glucosidase activities toward amylopectin», *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 101, pp. 973-982. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.129.
- Wang, W. *et al.* (2017) «Isomalto-oligosaccharides ameliorate visceral hyperalgesia with repair damage of ileal epithelial ultrastructure in rats», *PLoS ONE*. Public Library of Science, 12(4),



p. e0175276. doi: 10.1371/journal.pone.0175276.

Wang, Y. H. *et al.* (2009) «Expression and characterization of an  $\alpha$ -glucosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 with potential for industrial application», *Biologia*, 64(6), pp. 1053-1057. doi: 10.2478/s11756-009-0197-1.

Waterhouse, A. *et al.* (2018) «SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes», *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 46(W1), pp. W296-W303. doi: 10.1093/nar/gky427.

Wilkins, A. *et al.* (2012) «Evolutionary Trace for Prediction and Redesign of Protein Functional Sites», *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 819, pp. 29-42. doi: 10.1007/978-1-61779-465-0\_3.

Withers, S. y Williams, S. (2013) *Glycoside Hydrolases*, *CAZypedia*. Disponible en: [http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_hydrolases](http://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases) (Accedido: 13 de diciembre de 2017).

Wu, K. Y. *et al.* (2010) «Expression, Purification and Characterization of Recombinant  $\alpha$ -Glucosidase in *Pichia pastoris*», *Folia Microbiologica*, 55(6), pp. 582-587. doi: 10.1007/s12223-010-0093-7.

Wu, Q. *et al.* (2017) «Fermentation properties of isomaltooligosaccharides are affected by human fecal enterotypes», *Anaerobe*. Academic Press, 48, pp. 206-214. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.08.016.

Xiao, K. *et al.* (2015) «Polydatin Use in Vascular Dementia», en *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*. Elsevier Inc., pp. 1059-1067. doi: 10.1016/B978-0-12-407824-6.00099-9.

Yáñez, E. *et al.* (1998) «Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of N-glycosylation on activity, stability and secretion», *Biochemical Journal*, 329(1), pp. 65-71. doi: 10.1042/bj3290065.

Yen, C. H. *et al.* (2011) «Long-term supplementation of isomalto-oligosaccharides improved colonic microflora profile, bowel function, and blood cholesterol levels in constipated elderly people-A placebo-controlled, diet-controlled trial», *Nutrition*, 27(4), pp. 445-450. doi: 10.1016/j.nut.2010.05.012.

Yoo, S. (1997) «The Production of Glucooligosaccharides by *Leuconostoc Mesenteroides* ATCC 13146 and *Lipomyces Starkeyi* ATCC 74054.», *LSU Historical Dissertations and Theses*. Disponible en: [https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool\\_disstheses/6611](https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_disstheses/6611) (Accedido: 13 de mayo de 2021).

Yoon, S. H., Mukerjea, R. y Robyt, J. F. (2003) «Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation», *Carbohydrate Research*. Elsevier BV, 338(10), pp. 1127-1132. doi: 10.1016/S0008-6215(03)00097-1.

Zhang, L. *et al.* (2021) «Effects of Dietary Isomaltooligosaccharide Levels on the Gut Microbiota, Immune Function of Sows, and the Diarrhea Rate of Their Offspring», *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.588986.

## Anexo I: Figuras y Tablas

1 M I F L K L I K S I V I G L G L V S A I  
1 ATGATTTTTCTGAAGCTGATTAAGTATAGTAATTGGTTTGGGATTAGTTAGTGCTATC  
21 Q A A P A S S I G S S A S A S S S S E S  
61 CAAGCAGCCCCTGCCTCTTCGATTGGATCTAGTGCTCAGCATCTAGTTCAAGTGAGAGT  
41 S Q A T I P N D V T L G V K Q I P N I F  
121 TCTCAGGCTACAATCCCAATGATGTAACATTAGGTGTTAAACAAATTCCTAATATCTTT  
61 N D S A V D A N A A A K G Y D L V N V T  
181 AATGACTCTGCTGTCGATGCTAATGCAGCTGCTAAAGGGTATGACTTGGTAAATGTTACT  
81 N T P R G L T G I L K L K E A T N I Y G  
241 AATACTCCAAGAGGATTAACCGGTATCTTAAAATTTAAAGAAGCTACCAATATTTATGGT  
101 Y D F D Y L N L T V E Y Q A D T R L N V  
301 TATGATTTTGATTATTTAACTTAACTGTTGAATACCAAGCTGATACCAGATTAACGTT  
121 H I E P T D L S D V F V L P E H L V V K  
361 CATATTGAACCAACTGATTTATCTGATGATTTGTTTTACCAGAGCATTTAGTTGTTAAA  
141 P L V E G D A Q S Y N F D N S D L V F E  
421 CCACTGGTGAAGGTGATGCACAATCTTATAACTTCGACAATTCGATTTGGTTTTCGAA  
161 Y S N T D F S F E V I R S S T K E V L F  
481 TACTCTAATACTGACTTCTCCTTTGAAGTTATTAGATCATCTACTAAAGAAGTTTTATTT  
181 S T K G N P L V F S N Q F I Q F N S S L  
541 TCTACTAAAGGTAATCCATTGGTTTTTTCAAATCAATTCATTCAATTCAATTCGTCATTG  
201 P K N H V I T G L G E S I H G L V N E P  
601 CCAAAGAACCATGTTATTACTGGTCTTGGTGAATCTATTCACGGTTTAGTTAACGAACCA  
221 G S V K T L F A N D V G D P I D G N I Y  
661 GGTAGCGTTAAAACATTATTTGCTAATGATGTTGGTGAATCGATGGTAATATTTAT  
241 G V H P V Y L D Q R Y D T E T T H A V Y  
721 GGTGTCCATCCAGTTTATCTTGATCAAAGATATGACACTGAAACTACCCATGCTGTTTAT  
261 W R T S A I Q E V L I G E E S I T W R A  
781 TGGAGAACTTCTGCTATTCAAGAAGTATTAATCGGTGAGGAATCTATTACTTGGAGAGCT  
281 L S G V I D L Y F F S G P T P K D A I Q  
841 CTTTCAGGTGTTATTGATTTATACTTCTTTAGTGGTCTACACCAAAAGATGCCATTCAA  
301 Q Y V K E I G L P A F Q P Y W S L G Y H  
901 CAGTATGTCAAAGAGATTGGTTTACCAGCTTTCCAACCACTGGTCTAGGTTACCAT  
321 Q C R W G Y D T I E K L S E V V E N F K  
961 CAATGTAGATGGGGTTACGATACTATCGAAAAATTATCTGAAGTTGTTGAAAACCTCAAG  
341 K F N I P L E T I W S D I D Y M D S Y K  
1021 AAATTTAATATTCCATTAGAAACTATCTGGTCAGACATTGATTACATGGACTCTTATAAA  
361 D F T Y D P H R F P L D E Y R K F L D E  
1081 GATTTCACTTATGATCCACACAGATTCCCCTAGATGAATATCGTAAATTCCTTGATGAG  
381 L H K N N Q H Y V P I L D A A I Y V P N  
1141 TTGCACAAAAATAATCAACACTATGTTCTATTTTGGATGCTGCTATTTACGTTCCAAAC  
401 P N N A T D N E Y Q P F H Y G N E T D V  
1201 CCAAACAATGCTACGGATAACGAATACCAACCTTTCCAACCACTGGTAATGAAACCGATGTC  
421 F L K N P D G S L Y I G A V W P G Y T V  
1261 TTCTTAAAGAATCCAGATGGTTCATTATATATTGGTGCTGTTTGGCCAGGTTACACTGTT  
441 F P D F L A E N I Q E Y W N K V I K D W  
1321 TTCCCAGATTTCTTAGCAGAAAACATTCAAGAATACTGGAATAAAGTCATTAAGATTGG  
461 Y E L T P F D G I W A D M N E V S S F C  
1381 TATGAATTAACCTCTTTTGGTATTTGGGCTGATATGAATGAAGTCTCATCATTCTGT  
481 V G S C G T G K Y F E N P A Y P P F T V  
1441 GTTGGTCTTGTGGTACTGGTAAATACTTCGAAAACCCAGCATATCCTCCATTTACTGTT  
501 G S K A T S Y P V G F D V S N A S E W K  
1501 GGAAGTAAAGCTACCTCTTATCCAGTTGGTTTTCGATGTTTCTAACGCATCTGAATGGAAA  
521 S I Q S S I S A T A K T S S T S S V S S  
1561 TCTATTCAAAGCTCAATTTCTGCTACTGCTAAGACTTCTTCAACTTCTCCGATCGTCG  
541 S S S T I D S M N T L A P G K G N I N Y  
1621 TCTTCATCCACAATCGATTCTATGAACACTTTAGCTCCAGGTAAGGTAATATTAATTAT

561 P P Y A I Y N M Q G D S D L A T H A V S  
 1681 CCACCATATGCTATTTACAACATGCAAGGTGACTCCGATCTTGCTACTCATGCAGTATCT  
 581 P N A T H A D G T V E Y D I H N L Y G Y  
 1741 CCAAATGCTACACATGCTGATGGTACAGTTGAATATGATATTCACAATCTTTATGGTTAC  
 601 L Q E N A T Y H A L L E V F P N K R P F  
 1801 TTGCAAGAAAATGCTACTTATCATGCATTATTGGAAGTTTTTCCTAACAAGAGACCATTCC  
 621 M I S R S T F P G A G K W T G H W G G D  
 1861 ATGATTTCCAGATCAACCTTTCCAGGCGCTGGTAAATGGACCGCCATTGGGGTGGTGAC  
 641 N T A D W A Y A Y F S I P Q A F S M G I  
 1921 AACACTGCTGATTGGGCTTATGCTTACTTCTCTATCCCTCAAGCATTCTCAATGGGTATT  
 661 A G L P F F G A D V C G F N G N S D S E  
 1981 GCTGGCCTTCCATTCTTTGGTGCCGATGTTTGTGGTTTCAATGGTAATTCTGATTCTGAA  
 681 L C S R W M Q L G S F F P F Y R N H N Y  
 2041 TTATGTTCAAGATGGATGCAATTAGGTTCTTTCTTCCATTCTACAGAAACCACAACAT  
 701 L G A I D Q E P Y V W E S V A E A T R T  
 2101 TTAGGTGCTATTGATCAGGAACCATATGTCTGGGAATCAGTTGCTGAAGCTACTAGAACT  
 721 S M A I R Y L L L P Y Y Y T L L H E S H  
 2161 TCTATGGCCATTAGATACTTATTATTACCATATTACTACACTTTATTACATGAATCTCAT  
 741 T T G L P I L R A F S W Q F P N D R S L  
 2221 ACTACTGGTTTACCAATCTTAAGAGCTTTCTCGTGGAATCCCTAACGATCGTTCCTTA  
 761 S G V D N Q F F V G D G L V V T P V L E  
 2281 AGTGGTGTGCGATAACCAATTTTTGTGCGGTGATGGTTTAGTTGTTACTCCTGTCTTAGAA  
 781 P G V D K V K G V F P G A G K E E V Y Y  
 2341 CCTGGTGTGATAAGGTTAAAGGTGTTTTCCAGGAGCTGGTAAAGAGGAAGTTTACTAC  
 801 D W Y T Q R E V H F K D G K N E T L D A  
 2401 GACTGGTACACCCAAAGAGAAGTTCACTTTAAAGACGGTAAGAATGAACTTTAGATGCA  
 821 P L G H I P L H I R G G N V L P T Q E P  
 2461 CCATTAGGTCATATTCCATTACACATTAGAGGTGGTAACGTCTTGCCAACCTCAAGAGCCA  
 841 G Y T V A E S R Q N P F G L I V A L D N  
 2521 GGTTATACTGTTGCTGAGTCAAGACAAAATCCATTTGGTTTAAATTGTCGCTTTAGATAAC  
 861 D G K A Q G S L Y L D D G E S L V V D S  
 2581 GATGGCAAAGCTCAAGGTAGCTTATACCTTGATGATGGTGAATCATTAGTAGTACTCT  
 881 S L L V S F S V S D N T L S A S P S G D  
 2641 TCATTGTTGGTTAGTTTCTGTTTCTGATAACACATTATCAGCATCTCCATCTGGTGAC  
 901 Y K A D Q P L A N V T I L G V G H K P K  
 2701 TATAAAGCTGATCAACCTTTAGCTAATGTTACCATCTTAGGGGTTGGCCATAAACCAAAA  
 921 S V K F E N A N V D F T Y K K S T V F V  
 2761 TCAGTTAAATTTGAAAACGCTAATGTTGATTTACCTACAAGAAATCAACCGTTTTCGTT  
 941 T G L D K Y T K D G A F S K D F T I T W  
 2821 ACTGGCTTAGATAAATACCAAGGATGGTGCATTTTCTAAGGATTTACCATTACTTGG  
 961 \*  
 2881 TAA

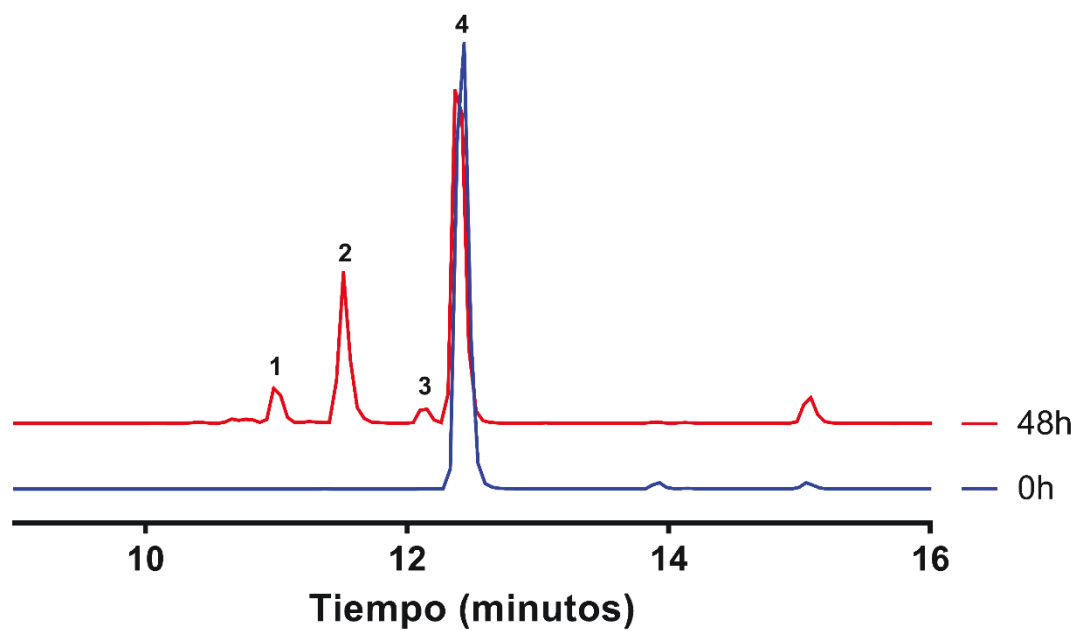
**Figura S1 Secuencia del marco de lectura abierto de GAM1.** Se muestra la secuencia nucleotídica (en negro) y la aminoacídica (en azul). Los residuos catalíticos se marcan en rojo, el D472 nucleófilo y el D640 catalizador ácido/base. En amarillo se resalta el péptido señal de exportación.

Tabla S1. Cebadores utilizados en las PCR mutagénicas

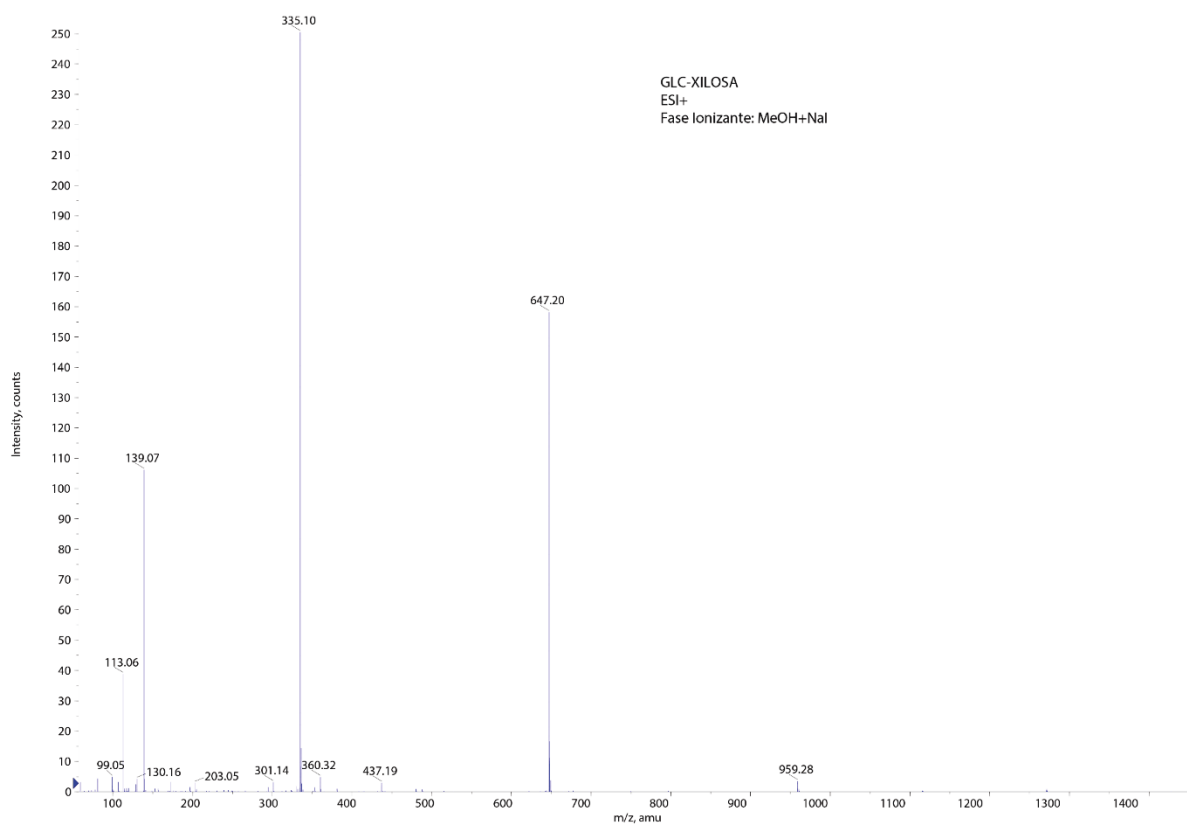
| Nombre   | Tipo    | Secuencia  | Tm(°C) | Bases |
|----------|---------|--|--------|-------|
| D472A.Fw | Forward | <u>GGGCTGCTATGAATGAAGTCTCATCATT</u> C                      | 71.5   | 29    |
| D472A.Rv | Reverse | CATT <u>CATAGCAGCCAAATACCATCAA</u> AG                      | 71.9   | 30    |
| D640A.Fw | Forward | <u>GGTGGTGTAAACACTGCTGATTGGGCTTATG</u>                     | 76.7   | 31    |
| D640A.Rv | Reverse | CAGTGT <u>AGCACCCACCCCAATGGCCG</u>                         | 78.9   | 26    |
| N674A.Fw | Forward | <u>GTTTCGCTGGTAATCTGATTCTGAATTATG</u>                      | 69.0   | 31    |
| N674A.Rv | Reverse | <u>GAATTACCAGCGAAACACAAACATCG</u>                          | 71.9   | 27    |
| N674F.Fw | Forward | <u>GTTTCTTTGGTAATCTGATTCTGAATTATG</u>                      | 65.2   | 31    |
| N674F.Rv | Reverse | <u>GAATTACCAAGAAACACAAACATCG</u>                           | 67.6   | 27    |
| N674T.Fw | Forward | <u>GTTTCAGTGGTAATCTGATTCTGAATTATG</u>                      | 66.0   | 31    |
| N674T.Rv | Reverse | <u>GAATTACCAGTGAACACAAACATCG</u>                           | 68.6   | 27    |
| Y700H.Fw | Forward | <u>CACAACCAATTAGTGCTATTGATCAGGAACCATATGCTCTGGGAATCAG</u>   | 82.0   | 49    |
| Y700H.Rv | Reverse | <u>TAGCACCTAAATGGTTGTGTTCTGTAGAATGGGAAGAAAGAACCTAATTGC</u> | 80.9   | 53    |
| Y700S.Fw | Forward | <u>CACAACCTTTAGTGCTATTGATCAGGAACCATATGCTCTGGGAATCAG</u>    | 80.9   | 49    |
| Y700S.Rv | Reverse | <u>TAGCACCTAAAGAGTTGTGTTCTGTAGAATGGGAAGAAAGAACCTAATTGC</u> | 79.9   | 53    |
| Y700T.Fw | Forward | <u>CACAACACTTAGTGCTATTGATCAGGAACCATATGCTCTGGGAATCAG</u>    | 81.4   | 49    |
| Y700T.Rv | Reverse | <u>TAGCACCTAAAGTGTGTTCTGTAGAATGGGAAGAAAGAACCTAATTGC</u>    | 80.3   | 53    |
| Y700G.Fw | Forward | <u>CACAACGGTTAGTGCTATTGATCAGGAACCATATGCTCTGGGAATCAG</u>    | 82.9   | 49    |
| Y700G.Rv | Reverse | <u>TAGCACCTAACCGTTGTGTTCTGTAGAATGGGAAGAAAGAACCTAATTGC</u>  | 81.7   | 53    |
| Y700A.Fw | Forward | <u>CACAACGCTTTAGTGCTATTGATCAGGAACCATATGCTCTGGGAATCAG</u>   | 82.9   | 49    |
| Y700A.Rv | Reverse | <u>TAGCACCTAACCGTTGTGTTCTGTAGAATGGGAAGAAAGAACCTAATTGC</u>  | 81.8   | 53    |
| W470F.Fw | Forward | <u>GGTATTTTGGCTGATATGAATGAAGTCTCATCATTCTGTG</u>            | 74.7   | 40    |
| W470F.Rv | Reverse | <u>CATATCAGCAAAATACCATCAAAGGAGTTAATTCATACC</u>             | 72.9   | 41    |
| W470S.Fw | Forward | <u>GGTATTTCTGGCTGATATGAATGAAGTCTCATCATTCTGTG</u>           | 75     | 40    |
| W470S.Rv | Reverse | <u>CATATCAGCAGAAATACCATCAAAGGAGTTAATTCATACC</u>            | 73.2   | 41    |
| W470Y.Fw | Forward | <u>GGTATTTACGCTGATATGAATGAAGTCTCATCATTCTGTG</u>            | 74.6   | 40    |
| W470Y.Rv | Reverse | <u>CATATCAGCGTAAATACCATCAAAGGAGTTAATTCATACC</u>            | 72.9   | 41    |
| D230E.Fw | Forward | <u>GCTAATGAAGTTGGTGATCCAATCGATGGTAATAT</u>                 | 72.9   | 35    |
| D230E.Rv | Reverse | <u>CCAACCTCATTAGCAAATAATGTTTTAACGCTACCT</u>                | 71.1   | 36    |
| D230N.Fw | Forward | <u>GCTAATAACGTTGGTGATCCAATCGATGGTAATAT</u>                 | 72.5   | 35    |
| D230N.Rv | Reverse | <u>CCAACGTTATTAGCAAATAATGTTTTAACGCTACCT</u>                | 70.9   | 36    |
| D230K.Fw | Forward | <u>GCTAATAAGGTTGGTGATCCAATCGATGGTAATAT</u>                 | 71.9   | 35    |
| D230K.Rv | Reverse | <u>CCAACCTTATTAGCAAATAATGTTTTAACGCTACCT</u>                | 70.3   | 36    |
| W435K.Fw | Forward | <u>CTGTTAAGCCAGGTTACACTGTTTCCAGATTTC</u>                   | 74.2   | 35    |
| W435K.Rv | Reverse | <u>CCTGGCTAACAGCACCAATATAATGAACCATCT</u>                   | 73.2   | 36    |
| W435Y.Fw | Forward | <u>CTGTTTACCCAGGTTACACTGTTTCCAGATTTC</u>                   | 74.1   | 35    |
| W435Y.Rv | Reverse | <u>CCTGGGTAACAGCACCAATATAATGAACCATCT</u>                   | 73.1   | 36    |
| F479V.Fw | Forward | <u>CTCATCAGTTTGTGTTGTTCTGTGGTACTGGTAAATAC</u>              | 74.6   | 40    |
| F479V.Rv | Reverse | <u>CAACACAACCTGATGAGACTTCATTATATCAGCCCAAAT</u>             | 77.4   | 40    |
| F479W.Fw | Forward | <u>CTCATCATGGTGTGTTGTTCTGTGGTACTGGTAAATAC</u>              | 76.4   | 40    |
| F479W.Rv | Reverse | <u>CAACACAACATGATGAGACTTCATTATATCAGCCCAAAT</u>             | 79.2   | 40    |
| F479Y.Fw | Forward | <u>CTCATCATACTGTGTTGTTCTGTGGTACTGGTAAATAC</u>              | 73.4   | 40    |
| F479Y.Rv | Reverse | <u>CAACACAGTATGATGAGACTTCATTATATCAGCCCAAAT</u>             | 76.2   | 40    |
| F673Y.Fw | Forward | <u>GTTTGTGGTTACAAATGTTAATTCTGATTCTGAATTATGTTCAAG</u>       | 74.5   | 44    |
| F673Y.Rv | Reverse | <u>CCATTGTAAACCAAAATATGGCCACCAAGAATG</u>                   | 78.7   | 34    |

\*las partes solapantes de los pares de cebadores están subrayadas. Se marca en rojo y negrita las secuencias correspondientes al codón mutado.

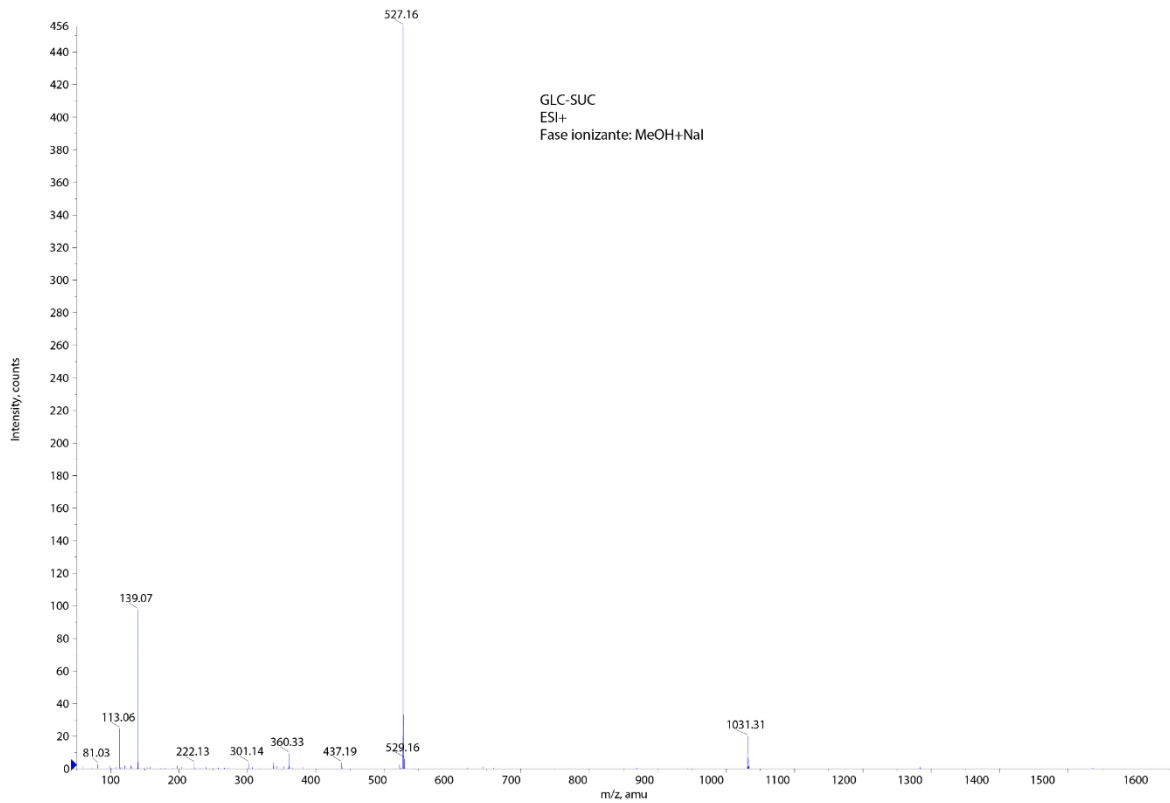




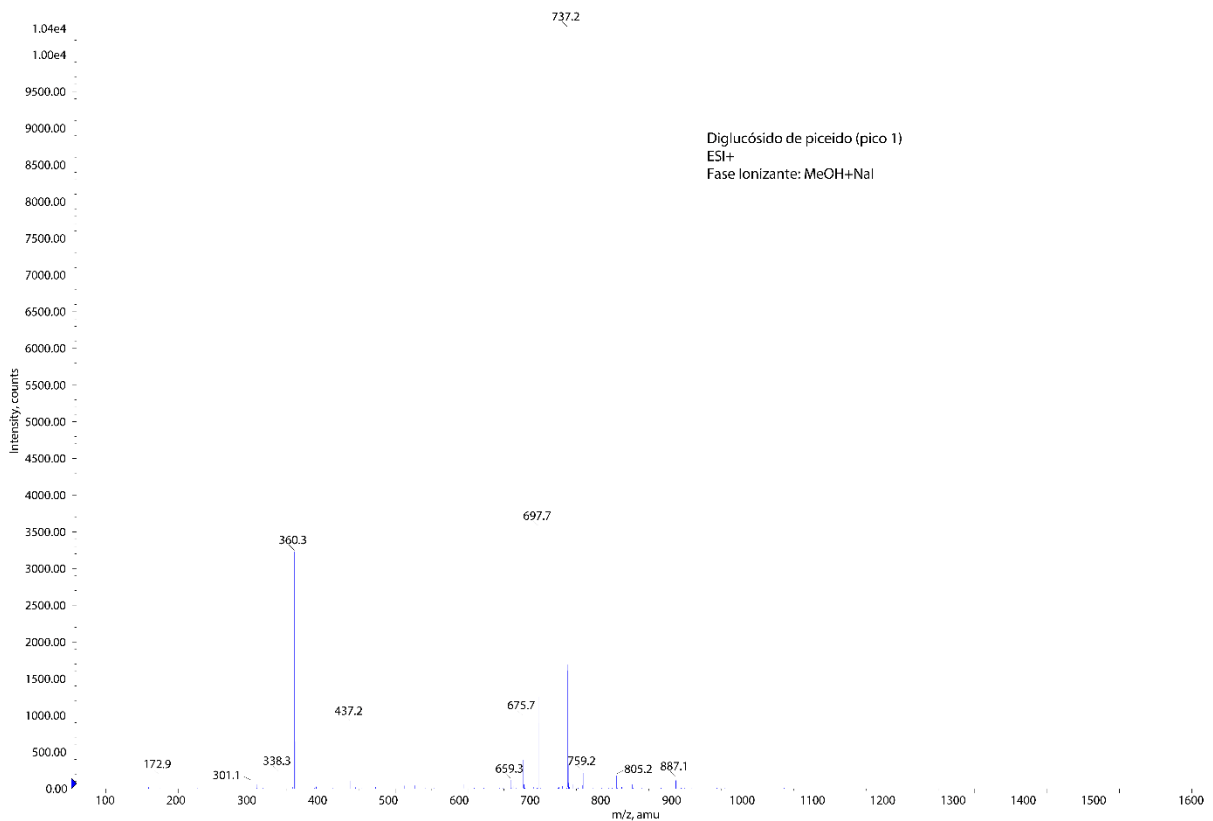
**Figura S4. Cromatograma del análisis HPLC-PDA de la transglucosilación de piceido.** Reacción de 300 g L<sup>-1</sup> de maltosa y 20 mM de piceido con 50 U mL<sup>-1</sup> de GAM1 a las 46 horas. Picos: 1. Dicglucósido de piceido, 2. Monoglucósido de piceido, 3. Resveratrol glucosilado y 4. Piceido.



**Figura S5. Análisis por MS-ESI del producto mayoritario de la transglucosilación de xilosa.** Análisis del azúcar mayoritario purificado con columna semipreparativa mediante HPLC.

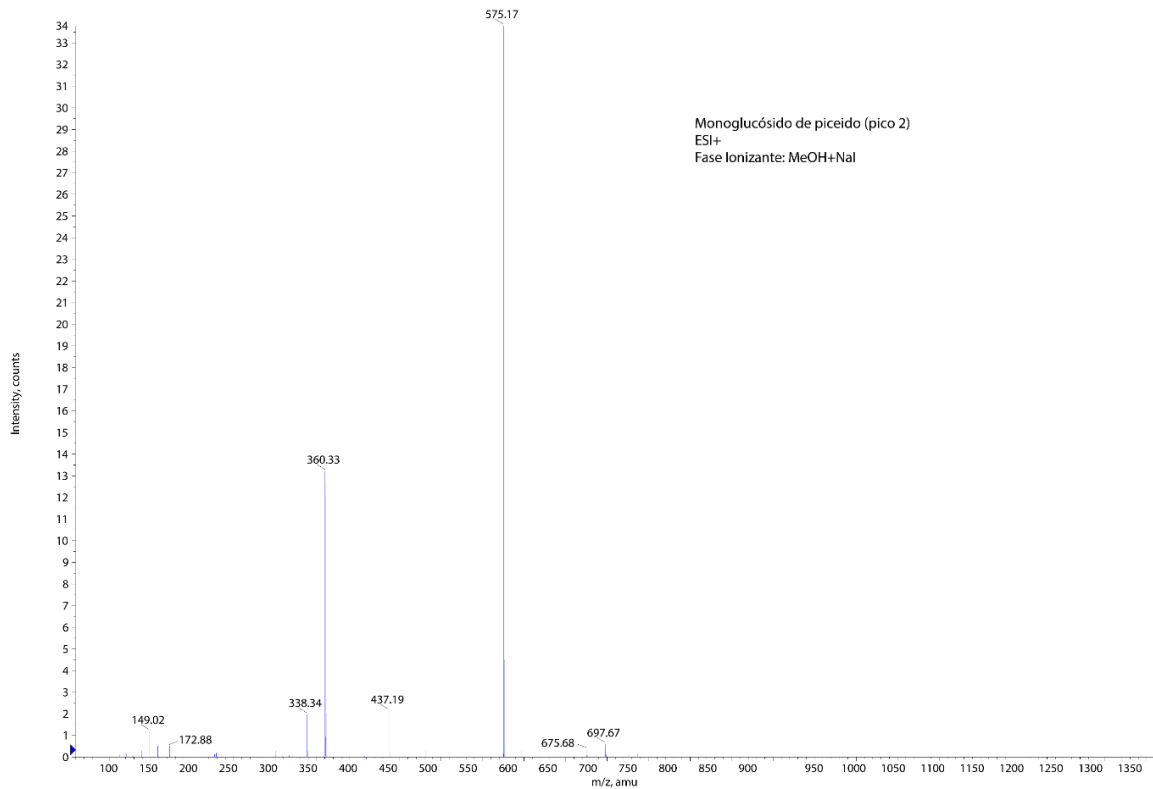


**Figura S6** Análisis por MS-ESI del producto mayoritario de la transglucosilación de sacarosa. El azúcar mayoritario producido fue purificado con una columna semipreparativa mediante HPLC.

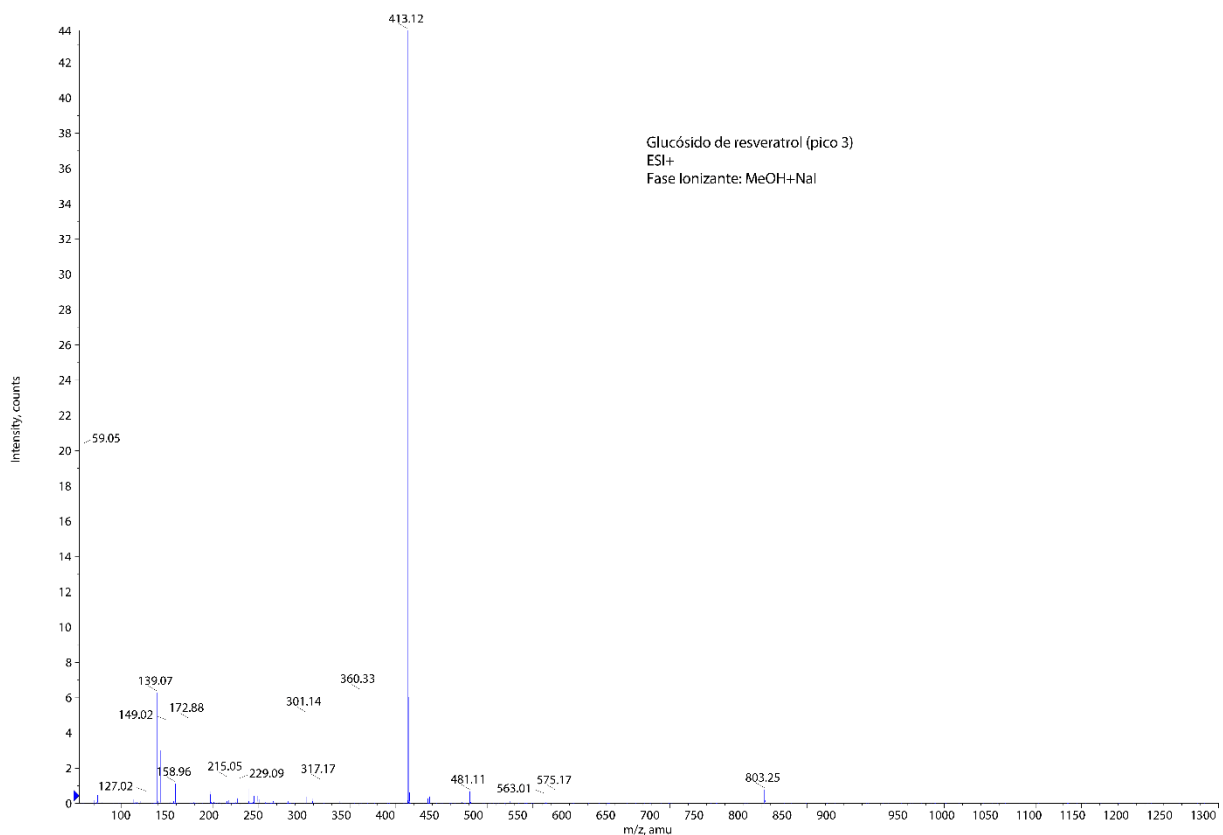


**Figura S7** Análisis por MS-ESI del producto diglucosilado de la transglucosilación de piceido. Producto purificado por columna semipreparativa mediante HPLC del diglucósido de piceido.

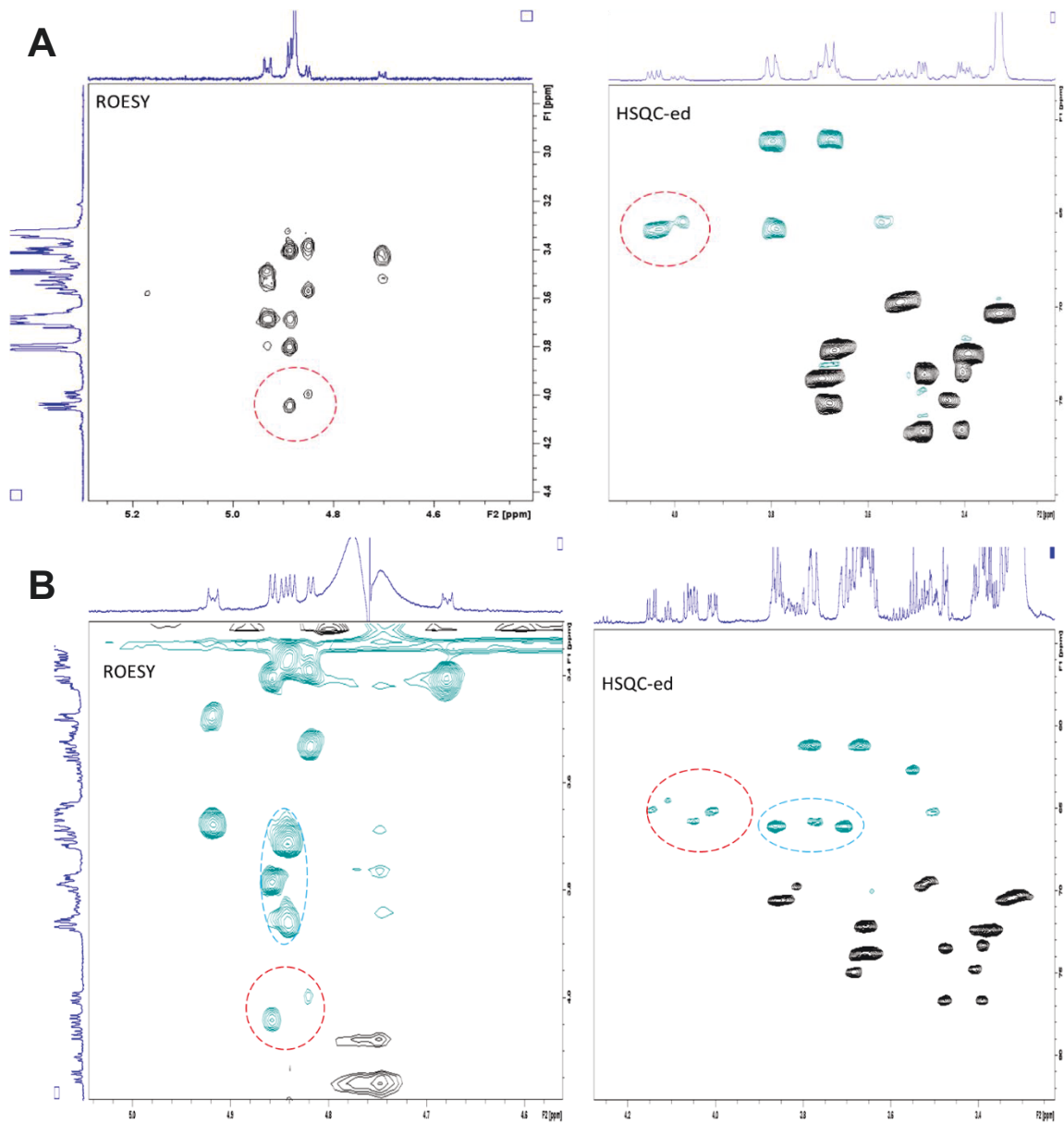




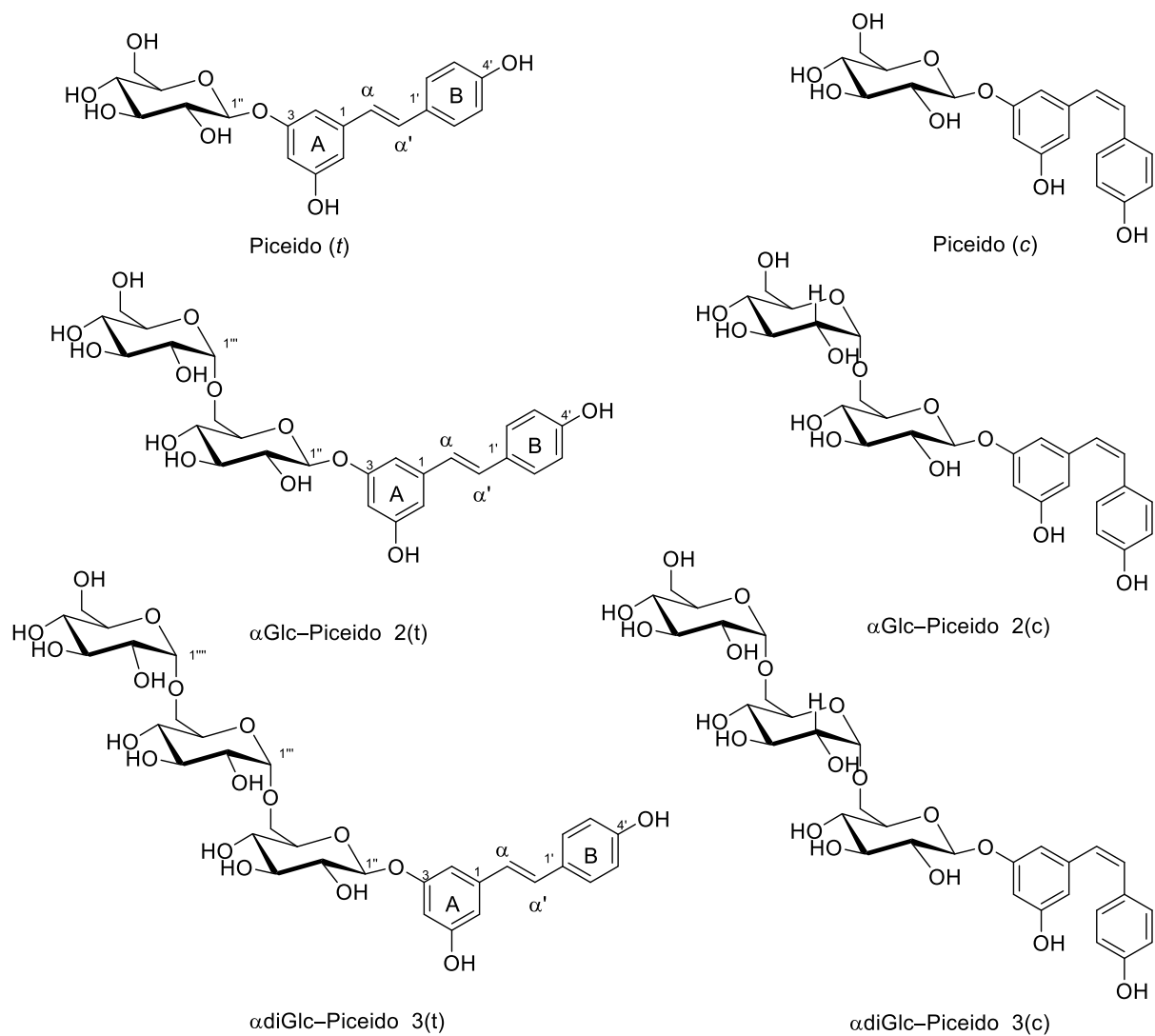
**Figura S8** Análisis por MS-ESI del producto monoglucosilado de la transglucosilación de piceido. Producto purificado por columna semipreparativa mediante HPLC del pico 2 del cromatograma de la Figura S4.



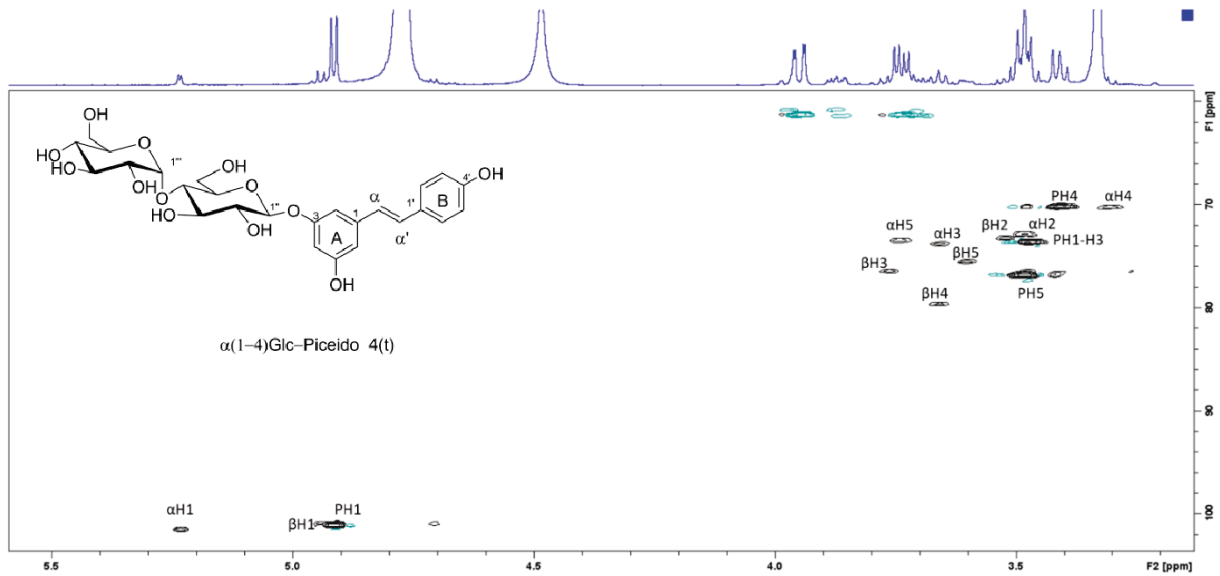
**Figura S9** Análisis por MS-ESI del producto de la transglucosilación de resveratrol. Producto purificado por columna semipreparativa mediante HPLC del pico 3 del cromatograma de la Figura S4.



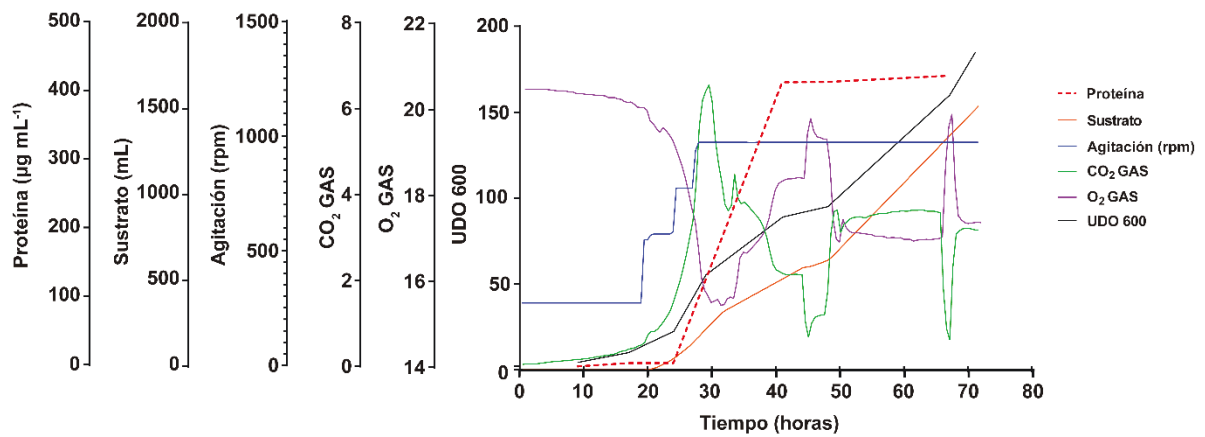
**Figura S10** Espectro ROESY y HSQC del monoglucósido y diglucósido de piceido. Espectros del monoglucósido **A** y diglucósido **B**, de piceido. Los espectros ROESY indican que el enlace es α1-6 glicosídico y los HSQC indican que los grupos metilenos aparecen a desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C de 65 ppm, como corresponde a grupos CH<sub>2</sub>-O- glicosilados.



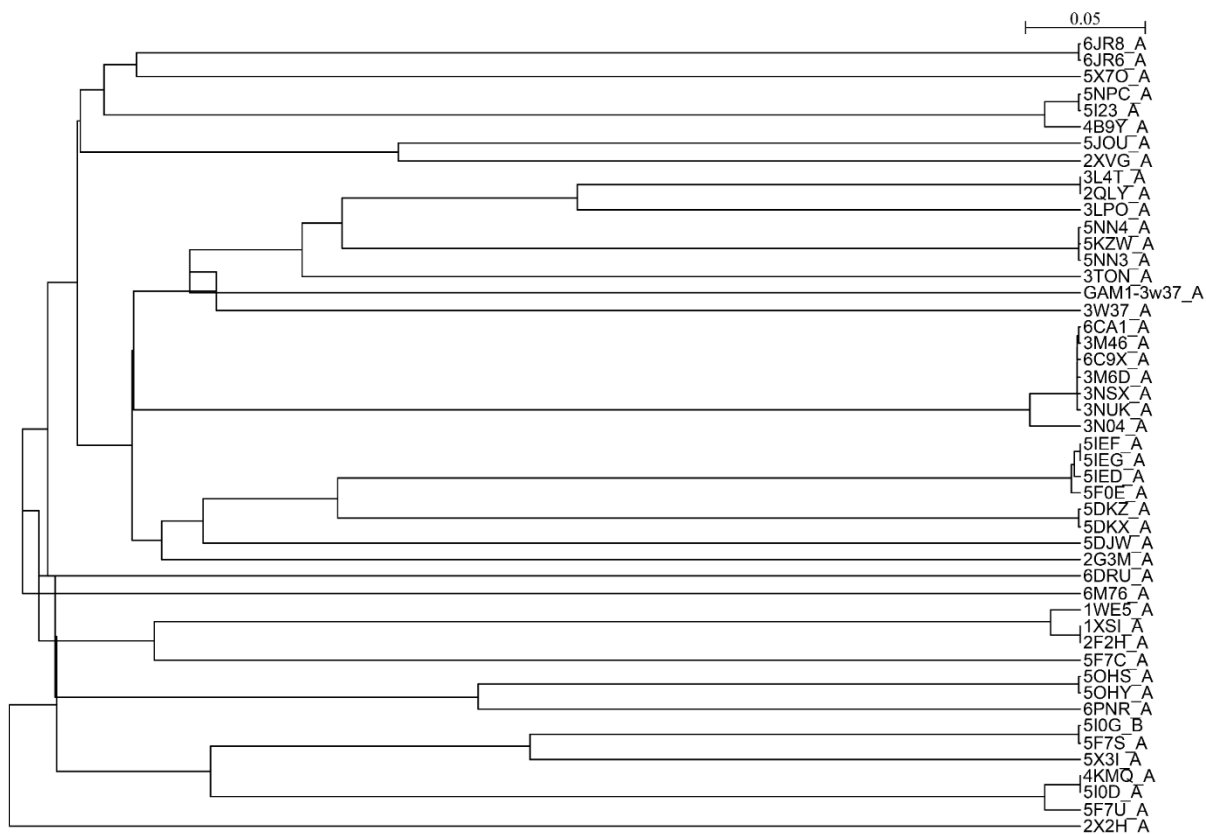
**Figura S11** Estructura de los productos de reacción de transglicosilación. Glc: glucosa, (c) y (t): configuración cis y trans.



**Figura S12** Espectro HSQC del producto glucosilado de resveratrol y su estructura. Se identifican las señales de 2 residuos de glucosa unidos al glucósido por medio de enlace  $\alpha 1-4$ .



**Figura S13.** Seguimiento del cultivo realizado en fermentador *fed-batch* de *P. pastoris* transformada con **GAM1-pIB2**. Fermentador alimentado con maltosa como sustrato a una concentración de 40 % (p/v).  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  GAS son las presiones parciales de estos gases.



**Figura S14. Árbol filogenético de GAM1.** El árbol se generó mediante la herramienta ESPript 2.0 del modelo de GAM1 frente a modelos de la base de datos PDB (indicados en el árbol).

**Tabla S3. Residuos alternativos analizados con *Evolutionary Trace*.**

| Residuos | Residuos alternativos ET |
|----------|--------------------------|
| F673     | LYS                      |
| W470     | SL                       |
| W435     | K                        |
| W479     | FMVTY                    |
| D230     | GEANK                    |



Figura S15. Árbol filogenético de GAM1 generado mediante la herramienta ET server.

## Anexo II: Publicaciones

### Publicaciones no relacionadas con la tesis:

Gimeno-Pérez, M., Merdzo, Z., Castillo-Rosa, E., Hijas, C. M. D., & Fernández-Lobato, M. (2021). The  $\beta$ -Fructofuranosidase from *Rhodotorula dairenensis*: Molecular Cloning, Heterologous Expression, and Evaluation of Its Transferase Activity. *Catalysts*, 11(4), 476. Open Access (07/04/2021); <https://doi.org/10.3390/catal11040476>

Cervantes, F. V., Neifar, S., Merdzo, Z., Viña-Gonzalez, J., Fernandez-Arrojo, L., Ballesteros, A. O., ... & Plou, F. J. (2020). A Three-Step Process for the Bioconversion of Whey Permeate into a Glucose D-Free Tagatose Syrup. *Catalysts*, 10(6), 647. Open Access; <https://doi.org/10.3390/catal10060647>

Ramírez-Escudero, M., Gimeno-Pérez, M., González, B., Linde, D., Merdzo, Z., Fernández-Lobato, M\*, & Sanz-Aparicio, J\*. (2016). Structural analysis of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous* reveals unique features and the crucial role of N-glycosylation in oligomerization and activity. *Journal of Biological Chemistry*, 291(13), 6843-6857. \* Both corresponding authors. <https://doi/10.1074/jbc.M115.708495>