

## SACAROSA ISOMERASA PALL NX-5 TERMOESTABLE, UNA ALTERNATIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE ISOMALTULOSA

Amado Javier Sardiña-Peña<sup>1</sup>, Lourdes Ballinas-Casarrubias<sup>1</sup>, Tania Siqueiros-Cendón<sup>1</sup>, Edward Espinoza-Sánchez<sup>1</sup>, Norma Flores-Holguín<sup>2</sup>, Liber Mesa-Ramos<sup>1</sup>, Blanca Iglesias-Figueroa<sup>1</sup> y Quintín Rascón-Cruz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito Universitarios s/n Nuevo Campus Universitario, C. P. 31125

<sup>2</sup> Laboratorio Virtual NANOCOSMOS, Departamento de Medio Ambiente y Energía, Centro de Investigación en Materiales Avanzados, Chihuahua, México. C. P. 31136

p324974@uach.mx

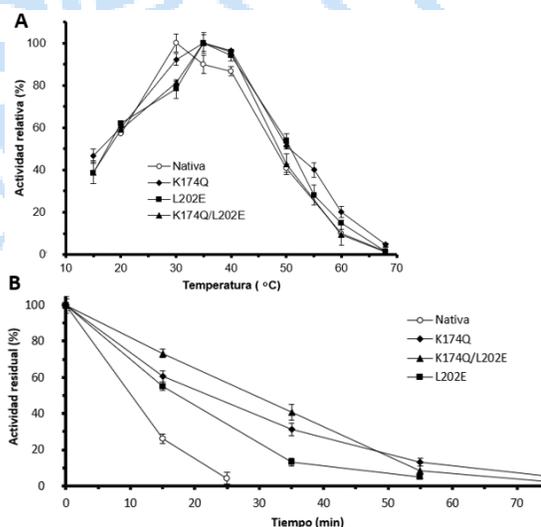
*Palabras clave:* isomaltulosa, ingeniería de proteínas, sacarosa isomerasa, termoestabilidad.

**Introducción.** Las dietas ricas en azúcares están estrechamente relacionadas con la aparición de resistencia a la insulina (diabetes tipo II) [1]. Una alternativa a la sacarosa es la isomaltulosa. Esta molécula tiene el mismo valor calórico total que la sacarosa, pero se digiere lentamente. Así, la isomaltulosa tiene una respuesta glucémica baja y garantiza un suministro prolongado de glucosa [2]. Las sacarosa isomerasas son las enzimas utilizadas en la producción de isomaltulosa; sin embargo, su baja estabilidad térmica constituye un limitante [3]. La mutagénesis dirigida basada en el factor B es una poderosa estrategia para mejorar la termoestabilidad de una enzima.

**OBJETIVO:** Obtener sacarosa isomerasa Pall NX-5 mediante el incremento de su estabilidad térmica a 40°C, mediante ingeniería de proteínas.

**Metodología.** Se partió del análisis del perfil de factor B de la estructura 4hox.1 [4]. Mediante el software B-Fitter se identificaron los residuos con los mayores valores B. Estos residuos fueron sujetos a sustituciones mediante ROSETTA DESING. Se seleccionaron los mutantes con potenciales interacciones termoestabilizantes. Las variantes de la Pall NX-5 se expresaron (en forma glicosida) en *P. pastoris* y luego se purificaron. La temperatura óptima se determinó entre 15 y 70°C en tampón de ácido cítrico/fosfato de sodio 50 mM (pH 6). Para evaluar la estabilidad de la enzima esta fue incubada a 40°C. Los contenidos de azúcares en la mezcla de reacción se determinados mediante HPLC.

**Resultados.** Se identificaron 19 residuos con alto valor B como objetivos para mutagénesis dirigida al sitio. Los mutantes K174Q, L202E y K174Q/L202E, mostraron un aumento en su temperatura óptima de 5°C (Fig. 1A), mientras que sus vidas medias aumentaron 2.21, 1.73 y 2.89 veces (Fig. 1B), respectivamente. Los mutantes mostraron un aumento de actividad de hasta el 25,3%. Los valores de Km para los mutantes disminuyeron hasta un 9.4%; además, la eficiencia catalítica aumentó hasta en un 16% (Tabla I).



**Fig. 1.** A. Influencia de la temperatura sobre la actividad de las variantes de la Pall NX-5. B. Progresión de la actividad isomerasa residual de las variantes de la Pall NX-5 incubadas a 40°C.

**Tabla 1.** Evaluación de los parámetros cinéticos de las variantes de la sacarosa isomerasa recombinante Pall NX-5.

Variante	Actividad específica (U/mg)	Km (mM)	k <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /Km (s <sup>-1</sup> ·mM <sup>-1</sup> )
Pall NX-5 nativa	483.8 ± 6.9	255.1 ± 9.6	564.5 ± 1.0	2.21 ± 0.13
Pall NX-5 K174Q	529.9 ± 8.4	241.9 ± 6.8	618.2 ± 0.9	2.55 ± 0.15
Pall NX-5 L202E	509.1 ± 9.9	234.9 ± 5.1	594.0 ± 0.8	2.52 ± 0.08
Pall NX-5 K174Q/L202E	509.3 ± 8.7	231.2 ± 7.8	594.3 ± 1.1	2.57 ± 0.21
Pall NX-5 silvestre (B. Ren et al., 2011)	423	222	NR	NR
Pall NX-5 recombinante (S. Li et al., 2011)	NR	257	NR	NR

**Conclusiones.** Con la estrategia integral seguida, se obtuvieron mutantes más adecuados para aplicaciones industriales que sus contrapartes: nativos y de tipo salvaje de *E. rhapontici* NX-5, sin comprometer la actividad catalítica de la molécula.

**Agradecimiento.** Al CONACyT y la FCQ, UACH.

### Bibliografía.

- Wyllie-Rosett, J., Segal-Isaacson, C., y Segal-Isaacson, A. (2004). *Obesity research* 12(S11). 124S-129S.
- Sokolowska E, Sadowska A, Sawicka D, Kotulska-Bąblińska I, Car H (2022). *Crit Rev Food Sci Nutr* 62(21).5679–5704.
- Liu, L., Bilal, M., Luo, H., Zhao, Y., y Duan, X. (2021). *Catalysis Letters*, 151, 1868-1881.23
- Xu, Z., Li, S., Li, J., Li, Y., Feng, X., Wang, R., y Zhou, J. (2013). *PLoS one*, 8(9), e74788.