

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

---



---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA**

**OBTENCIÓN DE SACAROSA ISOMERASA PALINX-5 APTA PARA USO  
INDUSTRIAL MEDIANTE TÉCNICAS DE INGENIERÍA DE PROTEÍNAS**

**POR:**

**M.C. AMADO JAVIER SARDIÑA PEÑA**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS**

**CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO**

**ENERO DE 2024**



Asunto: **Liberación Tesis**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
**CHIHUAHUA**

Chihuahua, Chih., 13 de octubre del 2023

**M.A.P. TERESA VIRIDIANA ESPINOZA MOLINA  
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
PRESENTE. -**

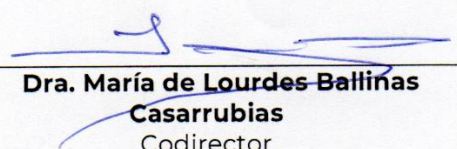
Los que suscriben, informamos a usted que se llevó a cabo la revisión de la tesis titulada: **“Obtención de sacarosa isomerasa Pall NX-5 apta para uso industrial mediante técnicas de ingeniería de proteínas”**. presentada por el estudiante **Amado Javier Sardiña Peña** con número de matrícula **324974**, alumno del programa de **Doctorado en Ciencias**.

Se le fueron indicadas al estudiante las correcciones que eran necesarias efectuar, y después de realizarse lo anterior y verificar que las mismas fueron atendidas, manifestamos que el documento en cuestión, cumple con los requisitos de calidad y originalidad señalados por el Comité de Tesis y por la Facultad de Ciencias Químicas, por lo que autorizamos que sea impresa para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

**ATENTAMENTE**

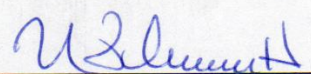
**“LUCHAR PARA LOGRAR, LOGRAR PARA DAR”**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Quintín Rascón Cruz**  
Director

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. María de Lourdes Balliñas  
Casarrubias**  
Codirector

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. Tania Samantha Siqueiros Cendón**  
Asesora

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Edward Alexander Espinoza  
Sánchez**  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Norma Rosario Flores Holguín**  
Asesora



**FACULTAD DE  
CIENCIAS QUÍMICAS  
SECRETARIA  
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

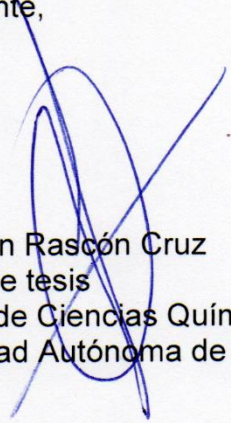
Cd. Chihuahua, Chih., a 09 Agosto del 2023

M.A.P. Teresa Viridiana Espinoza Molina  
Secretaria de Investigación y Posgrado  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Chihuahua  
PRESENTE.


Los que suscriben, Dra. María de Lourdes Ballinas Casarrubias y el Dr. Quintín Rascón Cruz, profesores investigadores adscritos a la Facultad de Ciencias Químicas, y Co-Director y Director de tesis respectivamente de tesis del programa **Doctorado en Ciencias** del estudiante **M.C. Amado Javier Sardiña Peña**, hacemos constar que su trabajo de tesis doctoral titulado **“OBTENCIÓN DE SACAROSA ISOMERASA PALI NX-5 APTA PARA USO INDUSTRIAL MEDIANTE TÉCNICAS DE INGENIERÍA DE PROTEÍNAS”** se encuentra concluido y el escrito de tesis liberado, por lo cual, está listo para proceder con los trámites necesarios para su proceso de obtención de grado.

Agradeciendo de antemano todas las atenciones brindadas, quedamos de usted.

Cordialmente,



Dr. Quintín Rascón Cruz  
Director de tesis  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Chihuahua



Dra. María de Lourdes Ballinas  
Casarrubias  
Co-Director de tesis  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Chihuahua



*"El conocimiento es la virtud y solo si se sabe se puede divisar el bien"*

*Sócrates*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mis padres, **María del Carmen** y **Amado**, les debo mi más profundo agradecimiento por su apoyo incondicional, sus sacrificios incansables en pro de mi bienestar y su constante deseo de ver en mí un ser humano mejor. Su amor y dedicación han sido el faro que ilumina mi camino.

A mi querida abuela **Cruz Delia**, quien siempre me consideró su niño consentido, y de quien estaré eternamente agradecido por todo su amor. En este momento, sé que se sentiría orgullosa de mí.

A **Yani**, quien ha sido una madre durante todos estos años, y en correspondencia, **Mimí** se ha convertido en una abuela adicional. Su cariño ha sido fundamental en mi vida.

A mis tíos, **Nancy** y **Adalberto**, y a mi primo **Dariem**, quienes han estado a mi lado en cada etapa de la vida, siempre extendiéndome la mano sin cuestionamientos. Su apoyo ha sido invaluable.

A mis amigos, **Liber Mesa**, **Maylín Rondón**, **Danger Tabio** y **Blanca Flor Iglesias**, agradezco sinceramente su amistad genuina y su constante respaldo. Han sido mi red de apoyo en los momentos más significativos.

A mi madrina **Odalís**; así como a **Fefa**, **Iraida**, **Arelis** y **Mariela**, agradezco sus buenos deseos y la fe que han depositado en mí. Su aliento ha sido muy importante.

Al **Dr. Quintín Rascón Cruz** y la **M.C. Tania Siqueiros Cendón**, les estoy agradecido por su confianza, comprensión y guía a lo largo de este viaje académico. Les agradezco especialmente por abrirme las puertas del Laboratorio de Biotecnología I y de su hogar, haciéndome sentir parte de su familia.

A la **Dra. Lourdes Ballinas Casarrubias**, mi reconocimiento por su constante sonrisa y apoyo inquebrantable en la realización de este proyecto.



Al **Dr. Edward Alexander Espinosa Sánchez**, agradezco su tiempo y su experticia siempre disponible. Su contribución ha sido imprescindible.

A la **Dra. Norma Rosario Flores Holguín**, gracias por su apoyo y por aceptar la invitación a participar en este proyecto. Su presencia ha enriquecido significativamente mi experiencia académica.

A los miembros del Laboratorio de Biotecnología I: **M.C. Arlett Loya, M.C. Brenda Julian, Q.B.P. Zuleika Wolf, Q.B.P. Celina Rivera, Dr. Nacho Siañez, Dr. Sigifredo Arévalos, M.C. Diada León y Q.B.P. Víctor Fierro**. Agradezco por los consejos, el apoyo constante y los ánimos en todo momento.

A la **M.A.P. Teresa Viridiana Espinoza Molina**, Secretaria de Investigación y Posgrado, y la **Dra. Yanira Ivonne Sánchez García**, Coordinadora de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Gracias por su valiosa orientación y amabilidad.

A todos los que, de una u otra manera, han contribuido a mi crecimiento académico y personal, mi más sincero agradecimiento.



La presente investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología I y el Laboratorio de Química Analítica III de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua bajo la dirección del Dr. Quintín Rascón Cruz y la codirección de la Dra. Lourdes Ballinas Casarrubias.

El Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) otorgó una beca con número de registro 762996 como apoyo económico para la realización de estudios de posgrado dentro del marco de la Convocatoria de Becas Nacionales 2020 Primer Periodo.

**ÍNDICE**

ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
I. RESUMEN.....	ix
II. ABSTRACT .....	x
III. INTRODUCCIÓN.....	1
IV. JUSTIFICACIÓN.....	6
V. MARCO TEÓRICO .....	7
5.1. Diabetes mellitus, un reto de salud para México y el mundo .....	7
5.2. Isomaltulosa, una alternativa saludable.....	11
5.3. Sacarosa isomerasa: el biocatalizador para producir isomaltulosa.....	13
5.3.1. Antecedente particular: sacarosa isomerasa sintética SI_OPT_V5 ..	22
5.3.2. Sacarosa isomerasa Pall NX-5, un punto de partida .....	25
5.4. Ingeniería de proteínas: una poderosa herramienta .....	27
5.4.1. Ingeniería de proteínas: evolución dirigida.....	28
5.4.2. Ingeniería de proteínas: diseño semirracional .....	30
5.4.3. Ingeniería de proteínas: diseño racional .....	30
5.4.4. Ingeniería de proteínas: caracterización de la termoestabilidad.....	32
5.4.5. Ingeniería de proteínas de sacarosa isomerasas.....	32
5.5. Expresión recombinante de sacarosa isomerasas .....	37
5.5.1. <i>Komagataella phaffii</i> como sistema de expresión .....	38
5.5.2. N-glicosilación de proteínas recombinantes.....	40
5.6. Simulación de procesos químicos, SuperPro Designer® .....	42
VI. HIPÓTESIS .....	44





---

VII. OBJETIVOS .....	44
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
8.1. Estrategia general de la investigación .....	45
8.2. Diseño y construcción de mutantes.....	45
8.3. Cepas, vector y materiales .....	46
8.4. Transformación genética de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ para la conservación y propagación de plásmidos .....	48
8.5. Aislamiento de ADN plasmídico (Miniprep) .....	49
8.6. Caracterización y preparación de ADN plasmídico para la transformación genética de <i>Komagataella phaffii</i> X33.....	49
8.7. Preparación de células electrocompetentes de <i>Komagataella phaffii</i> para su transformación genética .....	50
8.8. Transformación genética de <i>Komagataella phaffii</i> X33.....	51
8.9. Extracción de ADN genómico y amplificación de genes de interés .....	51
8.10. Expresión y purificación de las variantes de la Pall NX-5.....	52
8.11. Análisis de proteínas en un gel de acrilamida .....	53
8.12. Ensayo de actividad de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 . .....	54
8.13. Efectos del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática .....	55
8.14. Determinación de los parámetros cinéticos $V_{max}$ , $K_m$ y $k_{cat}$ .....	55
8.15. Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de isomaltulosa . .....	56
8.16. Análisis de los productos de reacción mediante HPLC .....	56
8.17. Diseño, simulación y análisis económico de un proceso de producción de isomaltulosa.....	56



---

8.17.1.	Sección de fermentación .....	57
8.17.2.	Sección de purificación.....	57
8.17.3.	Reacción enzimática .....	58
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	59
9.1.	Diseño de mutantes de sacarosa isomerasa Pall NX-5.....	59
9.1.1.	Identificación de residuos potenciales a ser sustituidos .....	59
9.1.2.	Potencial N-glicosilación de las variantes de la sacarosa isomerasa	69
9.1.3.	Mutagénesis dirigida al sitio y vectores de expresión.....	72
9.2.	Caracterización de las construcciones genéticas: pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E .....	74
9.3.	Transformación genética de <i>Komagataella phaffii</i> X33.....	75
9.4.	Análisis de la expresión de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 .....	76
9.5.	Cuantificación de azúcares en las mezclas de reacción mediante HPLC	79
9.6.	Influencia de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de las variantes de la sacarosa isomerasa recombinante Pall NX-5 .....	84
9.7.	Influencia del pH sobre la actividad de las variantes de la sacarosa isomerasa recombinante Pall NX-5.....	87
9.8.	Evaluación de los parámetros cinéticos de las variantes de la sacarosa isomerasa recombinante Pall NX-5.....	89
9.9.	Comparación de la producción de isomaltulosa entre las variantes de la Pall NX-5 .....	94
9.10.	Propuesta de un proceso de producción de isomaltulosa.....	97
9.10.1.	Propuesta de un mutante para aplicaciones industriales .....	97
9.10.2.	Diseño y evaluación del proceso con SuperPro Designer®.....	97



X. CONCLUSIONES.....	104
XI. PERSPECTIVAS .....	105
XII. REFERENCIAS .....	106

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Estimaciones y proyecciones de la prevalencia mundial de diabetes en el grupo de edad 20-79 años (Diabetes, 2019). .....	9
<b>Figura 2.</b> Estimación del número de personas aquejadas de diabetes a nivel mundial y por regiones, para los años 2019, 2030 y 2045 (Diabetes, 2019). .....	9
<b>Figura 3.</b> Comportamiento en el tiempo de la concentración de glucosa en la sangre (mM) (Merino, 2014).....	11
<b>Figura 4.</b> Hidrólisis e isomerización de la sacarosa por la acción de la enzima sacarosa isomerasa. ....	16
<b>Figura 5.</b> Estructuras de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 (Xu <i>et al.</i> , 2013) y la trehalosa-6-fosfato hidrolasa (Lin <i>et al.</i> , 2016). ....	18
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de la sacarosa isomerasa.....	21
<b>Figura 7.</b> La línea continua muestra el efecto del pH en la actividad enzimática de la sacarosa isomerasa recombinante contenida en el extracto de proteína celular de <i>K. phaffii</i> SMD. ....	23
<b>Figura 8.</b> La línea continua muestra el efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la sacarosa isomerasa recombinante contenida en el extracto de proteína celular de <i>K. phaffii</i> SMD.....	25
<b>Figura 9.</b> Actividad de las sacarosa isomerasas Pall NX-5 nativa (Ren <i>et al.</i> , 2011) y recombinante (Li <i>et al.</i> , 2011), frente a la temperatura y el pH. ....	26
<b>Figura 10.</b> Modelos tridimensionales de las sacarosa isomerasas AS9 Pall (A) y Pall (B) construidos a partir de los datos reportados por Duan <i>et al.</i> (2016) y Zhang <i>et al.</i> (2002), respectivamente.....	36
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de las vías de procesamiento de N-glicanos en levaduras (Varki <i>et al.</i> , 2015).....	41
<b>Figura 12.</b> Diagrama resumen de la metodología seguida para la cumplimentación de los objetivos del proyecto. ....	47
<b>Figura 13.</b> Estructura tridimensional de la sacarosa Pall NX-5. ....	62
<b>Figura 14 .</b> Disposición de los residuos e interacciones posibles en la proximidad del residuo Leu <sup>202</sup> (A) y el residuo Glu <sup>202</sup> (B). ....	63

<b>Figura 15.</b> Disposición de los residuos e interacciones posibles en la proximidad del residuo Lys <sup>174</sup> (A) y el residuo Gln <sup>174</sup> (B). .....	64
<b>Figura 16.</b> Disposición de los residuos e interacciones posibles en la proximidad del residuo Asp <sup>195</sup> (A) y el residuo Glu <sup>195</sup> (B). .....	65
<b>Figura 17.</b> Disposición de los residuos aminoacídicos en el sitio activo de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 y sus interacciones predichas con la molécula de D-glucosa (inhibidor competitivo de la sacarosa). .....	68
<b>Figura 18.</b> Sitios potenciales a ser N-glicosilados en las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 expresada en <i>K. phaffii</i> X33. ....	70
<b>Figura 19.</b> Construcciones genéticas pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E. ....	73
<b>Figura 20.</b> Caracterización de las construcciones genéticas: pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E. ....	74
<b>Figura 21.</b> Amplificación de las variantes del gen <i>pall</i> NX-5 en la levadura <i>K. phaffii</i> X33. ....	76
<b>Figura 22.</b> Identificación de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX5 producida en <i>K. phaffii</i> X33 mediante SDS-PAGE. ....	78
<b>Figura 23.</b> Cromatogramas combinados de los estándares de glucosa, sacarosa, isomaltulosa y trehalulosa. ....	81
<b>Figura 24.</b> Curvas de concentraciones conocidas de estándares contra las áreas de los picos. ....	82
<b>Figura 25.</b> Cromatogramas de mezclas producto de reacción. ....	83
<b>Figura 26.</b> Cromatograma de la réplica uno del control negativo (sacarosa 292 mM) disuelto en tampón de ácido cítrico/fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0). ....	84
<b>Figura 27.</b> Influencia de la temperatura sobre la actividad de las variantes no mutada y mutantes de la sacarosa isomerasa recombinante Pall NX-5 expresada en <i>K. phaffii</i> X33. ....	85
<b>Figura 28.</b> Progresión de la actividad isomerasa residual de las variantes de la Pall NX-5 incubadas a 40 °C. ....	86



<b>Figura 29.</b> Influencia del pH sobre la actividad de las variantes de la sacarosa isomerasa recombinante Pall NX-5.....	88
<b>Figura 30.</b> Comparación de la producción de isomaltulosa por la enzima no mutada y sus variantes frente a la concentración de sacarosa. ....	95
<b>Figura 31.</b> Diagrama de flujo del proceso de producción de isomaltulosa, “caso base”.....	99
<b>Figura 32.</b> Costos por etapas del proceso de producción de isomaltulosa. ....	100



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Características generales de purificados de enzimas productoras de isomaltulosa. ....	15
<b>Tabla II.</b> Información sobre las estructuras cristalinas de sacarosa isomerasas. .	17
<b>Tabla III.</b> Características de las sacarosa isomerasas mutantes con termoestabilidad mejorada. ....	34
<b>Tabla IV.</b> Mezcla de reacción de las digestiones enzimáticas con <i>EcoRI/SaI</i> y la linealización de las construcciones pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E con <i>SacI</i> . ....	50
<b>Tabla V.</b> Residuos aminoacídicos con factores B entre 2.5 y 3.5 veces el valor promedio para la sacarosa isomerasa Pall NX-5 y sus sustituciones recomendadas por ROSETTA DESING. ....	60
<b>Tabla VI.</b> Energías de interacción en el sitio catalítico de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 y la molécula D-glucosa. ....	67
<b>Tabla VII.</b> Evaluación y comparación de los parámetros cinéticos de las variantes de la Pall NX-5 con otras isoformas de sacarosa isomerasa.....	90
<b>Tabla VIII.</b> Análisis de identidad de secuencia de aminoácidos y distancias evolutivas entre isoformas de sacarosa isomerasas. ....	93

## I. RESUMEN

La sacarosa, principal edulcorante comercializado en México, al ser consumida genera picos en el índice glucémico que inciden negativamente en la salud poblacional. Dadas sus propiedades prometedoras, la isomaltulosa constituye una alternativa al uso de la sacarosa. Las sacarosa isomerasas son las enzimas utilizadas en la producción de isomaltulosa; sin embargo, su baja estabilidad térmica constituye un limitante. Para aumentar la estabilidad térmica de la sacarosa isomerasa de *Erwinia rhapontici* NX-5, se diseñó una estrategia integral que combina diferentes elementos termoestabilizadores. Se identificaron 19 residuos de aminoácidos de alto valor B (51.75-47.01) para mutagénesis dirigida. También se llevó a cabo una evaluación *in silico* de la influencia de las mutaciones sobre la interacción enzima-sustrato. Las variantes de sacarosa isomerasa se expresaron en *Komagataella phaffii* X33. Así, por primera vez, en esta investigación se reporta la expresión y caracterización de una sacarosa isomerasa glicosilada. Los mutantes diseñados, K174Q, L202E y K174Q/L202E, mostraron un aumento en su temperatura óptima de 5 °C, mientras que sus vidas medias aumentaron 2.21, 1.73 y 2.89 veces, respectivamente. Los mutantes mostraron un aumento en la actividad del 20.3% hasta el 25.3%. Asimismo, los valores de  $K_m$  para los mutantes K174Q, L202E y K174Q/L202E disminuyeron un 5.1, 7.9 y 9.4%, respectivamente; además, la eficiencia catalítica aumentó hasta un 16%. Con la estrategia integral seguida, se obtuvieron mutantes más adecuados para aplicaciones industriales que sus contrapartes: no mutada (esta investigación) y silvestre de *E. rhapontici* NX-5; esto, sin comprometer la actividad catalítica de la molécula.





## II. ABSTRACT

The consumption of sucrose, the primary sweetener marketed in Mexico, leads to spikes in the glycemic index, negatively impacting population health. Given its promising properties, isomaltulose represents an alternative to sucrose. Sucrose isomerases are the enzymes used in isomaltulose production; however, their low thermal stability poses a limitation. To enhance the thermal stability of sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5, we designed a comprehensive strategy, combining various thermo-stabilizing elements. In this regard, 19 amino acid residues with high B-factor values (51.75-47.01) were identified for directed mutagenesis. Additionally, an *in silico* evaluation of the mutations' influence on enzyme-substrate interaction was conducted. The variants of sucrose isomerase were expressed in *Komagataella phaffii* X33. Consequently, this research reports, for the first time, the expression and characterization of a glycosylated sucrose isomerase. The designed mutants, K174Q, L202E, and K174Q/L202E, exhibited an increase in their optimal temperature by 5 °C, along with a 2.21-fold, 1.73-fold, and 2.89-fold extension in their half-lives, respectively. The mutants displayed an enhancement in enzyme activity ranging from 20.3% to 25.3%. Furthermore, the  $K_m$  values for the K174Q, L202E, and K174Q/L202E mutants decreased by 5.1, 7.9, and 9.4%, respectively, indicating an up to 16% increase in catalytic efficiency. The integrated strategy employed resulted in mutants with improved thermal stability and enhanced enzymatic activity, making them more suitable for industrial applications compared to their non-mutated counterparts (this study) and the wild-type *E. rhapontici* NX-5 enzyme, all without compromising the catalytic activity of the molecule.



### III. INTRODUCCIÓN

La diabetes se ha convertido en la epidemia del siglo XXI y en un reto global de salud (Hernández-Ávila *et al.*, 2013). Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que a nivel mundial el número de personas con diabetes se ha incrementado de 108 millones en 1980 a 422 millones en 2014 (Mathers *et al.*, 2006), lo que representó el 4.7 y 8.5% de la población adulta (20-79 años) para dichos años, esperándose que para 2045 la cifra de personas afectadas sea de 700 millones (Diabetes, 2019).

Aunadas a las complicaciones de la diabetes están: la ceguera, la insuficiencia renal, el infarto del miocardio, los accidentes cerebrovasculares y la amputación de los miembros inferiores. Precisamente, la OMS estima que en 2015 fallecieron 1.6 millones de personas como consecuencia directa de la diabetes, mientras los niveles altos de glucemia fueron la causa de otros 2.2 millones de muertes en 2012. Aproximadamente la mitad de las muertes atribuibles a la hiperglucemia tienen lugar antes de los 70 años. Justamente, se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años (Diabetes, 2010). Según proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030 (Mathers *et al.*, 2006).

Como resultado del padecimiento crónico de la enfermedad no solamente existe pérdida de calidad de vida en los portadores, sino gastos económicos que se estima ascienden a 727 mil millones de dólares, representando el 12% de los gastos mundiales anuales en sanidad para adultos. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México, son (en ese orden) los países con mayor número de diabéticos (Huang *et al.*, 2017).

Particularmente, en México la prevalencia de diabetes se ha incrementado sustancialmente en las últimas décadas. En 1993 la cifra de diabéticos con diagnóstico conocido en población mayor de 20 años fue del 4.0%, mientras que

en 2000 y 2006 se describió una prevalencia del 5.8 y 7.3%, respectivamente (Córdova-Villalobos *et al.*, 2008), Para el año 2020 estas cifras alcanzaban aproximadamente el 10% de la población; estando Chihuahua entre las entidades federativas que agrupan los municipios con mayor número de diabéticos (INEGI, 2021). Estas cifras constituyen un enorme desafío para la sociedad y el sistema de salud, debido al costo económico y familiar que representa la enfermedad. Según estimaciones existentes, los costos de atención por paciente oscilan entre 700 hasta 3,200 dólares anuales (Rodríguez-Bolaños *et al.*, 2010), lo que equivale a un 5 y un 14% del presupuesto destinado a salud. Además, la edad promedio de las personas que murieron por diabetes en 2010 fue de 66.7 años, lo que sugiere una reducción de 10 años en la expectativa de vida (Hernández-Ávila *et al.*, 2013).

En México existen condiciones de alto riesgo para el desarrollo de diabetes, debido a los estilos de vida poco saludables que son frecuentemente adoptados por niños, adolescentes y adultos, propiciando un aumento importante en la obesidad y el sobrepeso. Precisamente, según estima la Federación Mexicana de Diabetes, 7 de cada 10 mexicanos tienen sobrepeso u obesidad, destacando este como uno de los factores de riesgo en el desarrollo de la diabetes. Se conoce que el consumo de dietas ricas en carbohidratos está estrechamente relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina (diabetes tipo II) (Chicco *et al.*, 2003; Pagliassotti *et al.*, 2002; Wylie-Rosett *et al.*, 2004); comportamiento que es más evidente para consumidores de productos que emplean a la sacarosa y la fructosa como aditivos. La sacarosa, principal edulcorante comercializado en México según cifras del Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar (2020), al ser consumida es rápidamente metabolizada, generando picos en el índice glucémico que inciden negativamente en la salud poblacional (Sissons *et al.*, 2007).

Una alternativa al uso de la sacarosa es uno de sus isómeros, la isomaltulosa. Esta molécula, aunque presenta el mismo valor calórico total que la sacarosa, es digerida lentamente, lo cual conduce a una baja respuesta glucémica y a un

suministro prolongado de glucosa, lo que indica su potencial como un nutriente parenteral aceptable tanto para diabéticos como no diabéticos (Kawai *et al.*, 1989). La isomaltulosa existe en cantidades extremadamente pequeñas en la naturaleza y es difícil de sintetizar químicamente (Kawaguti, 2007). La reorganización entre sacarosa e isomaltulosa por isomerización usando sacarosa isomerasa (EC 5.4.99.11), se ha enfocado como una reacción enzimática comercialmente atractiva para la producción de isomaltulosa (Lee *et al.*, 2011).

Sin embargo, la baja termoestabilidad de las sacarosa isomerasas es una limitante en su uso industrial, pues la producción enzimática de isomaltulosa generalmente se lleva a cabo a temperaturas del orden de los 30 °C (Mu *et al.*, 2014). Precisamente, a estas temperaturas las soluciones de sacarosa a bajas concentraciones son susceptibles a la proliferación de microorganismos. Además, ante una aplicación industrial, se debe tener en cuenta que en un ingenio azucarero la temperatura del jugo claro (solución de sacarosa de 14-18°Brix) asciende gradualmente, hasta llegar a un valor cercano al punto de ebullición (Hugot, 1963). También se debe notar que luego de la etapa de extracción del jugo de caña, este es alcalinizado mediante la adición de lechada de cal hasta alcanzar un pH cercano a 7.0 (Hugot, 1963). No obstante, para valores de pH neutros y ligeramente alcalinos la actividad de la mayoría de las sacarosa isomerasas no es elevada, salvo el caso de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 de *Erwinia rhapontici* NX-5 que retiene un 86%, 80% y 40% de su actividad máxima a pH 6.0, 7.0 y 8.0 respectivamente (Li *et al.*, 2011).

La ingeniería de proteínas es una herramienta poderosa para mejorar el desempeño de estas macromoléculas, por lo que la investigación biotecnológica para perfeccionar la termoestabilidad de las enzimas es una importante línea para obtener beneficios en aplicaciones industriales (Fágáin, 1995). Se han desarrollado numerosas estrategias para mejorar la termoestabilidad de las proteínas (Eijsink *et al.*, 2005; Pack *et al.*, 2004), las cuales siguen tres enfoques, estos son: el diseño racional, para el cual es necesario conocer la estructura de la

proteína blanco; el diseño irracional (evolución dirigida), que permite desarrollar bibliotecas de datos y finalmente, el enfoque semirracional, que combina elementos del diseño racional y la evolución dirigida (Duan *et al.*, 2016). En este sentido, los enfoques de diseño racional basados en una comprensión detallada de la estructura y función de una proteína, han identificado factores importantes que afectan la termoestabilidad de las enzimas (Böttcher *et al.*, 2010).

En los últimos años, con el desarrollo de la bioinformática se han desarrollado numerosos algoritmos y herramientas computacionales que permiten monitorear regiones flexibles en las moléculas proteicas, así como predecir la termoestabilización (Li *et al.*, 2018a; Liu *et al.*, 2019). Precisamente, el diseño racional asistido por computadora es una alternativa atractiva que permite acelerar el proceso de ingeniería enzimática (Bashirova *et al.*, 2019). Comúnmente, en la estabilización *in silico* de enzimas se siguen estrategias como: comparación con secuencias homólogas con mayor termoestabilidad, análisis del factor B (He *et al.*, 2019), simulaciones de dinámica molecular (MD) (Wang *et al.*, 2020b), análisis de redes de restricciones (CNA) (Krüger *et al.*, 2013), diseño de enlaces disulfuro (DSB) (Bashirova *et al.*, 2019), ingeniería de sitios de glicosilación (Han *et al.*, 2020), diseño de puentes salinos estabilizadores basados en la secuencia y estructura de las enzimas (Vicente *et al.*, 2020), y cálculos para minimizar la energía libre de Gibbs (Modarres *et al.*, 2016).

El factor B (o valor B), es un parámetro de desplazamiento atómico, determinado por estudios cristalográficos. Este parámetro representa los perfiles de densidad de electrones alrededor de sus posiciones de equilibrio, indicando su movimiento relativo debido a factores térmicos y al desorden posicional. De esta manera, los valores B proporcionan información sobre la flexibilidad de los aminoácidos y la estabilidad de las proteínas (Parthasarathy *et al.*, 2000). El factor B se ha utilizado para mejorar la termoestabilidad de la lipasa B de *Candida antarctica* (Xie *et al.*, 2014), la xilanasa XynCDBFV (Han *et al.*, 2019a), la xilanasa Xyn2 de *Trichoderma reesei* (He *et al.*, 2019) y la sacarosa isomerasa de *Serratia*

*plymuthica* AS9 (Duan *et al.*, 2016). Siendo destacable que el éxito en la termoestabilización de las enzimas antes mencionadas, no se debió únicamente al uso del perfil de factor B, sino a la potenciación de interacciones termoestabilizantes como los puentes de hidrógeno (You *et al.*, 2019), puentes disulfuro (Bashirova *et al.*, 2019), puentes salinos (Vicente *et al.*, 2020) y el mejoramiento del empaquetamiento de la molécula (Dotsenko *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020b; Zhang *et al.*, 2019a).

Una vía para llevar a cabo la producción de una proteína es a través de la transformación genética de sistemas de expresión procariontes y eucariotes. Diversas isoformas de sacarosa isomerasas han sido expresadas de manera recombinante, tal es el caso de las provenientes de: *Erwinia rhapsontici* DSM 4484 (Börnke *et al.*, 2001), *Enterobacter* sp. FMB-1 (Cha *et al.*, 2009), *Pantoea dispersa* UQ68J (Castillo-Aragón, 2017; Wu *et al.*, 2005) y *Erwinia rhapsontici* NX-5 (Li *et al.*, 2011).

Dada su fácil manipulación genética y a lo fuertemente regulado que se encuentra el gen alcohol oxidasa, la levadura metilotrófica *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) es en la actualidad uno de los sistemas de expresión de proteínas heterólogas más utilizado (Cregg *et al.*, 2000; Singsun *et al.*, 2016). Precisamente, Castillo-Aragón (2017) y Sardiña-Peña (2019) reportaron la expresión y funcionalidad de la isoforma de sacarosa isomerasa de *P. dispersa* UQ68J utilizando el sistema *Komagataella phaffii* SMD 1163. No obstante, la isoforma Pall NX-5 aún no ha sido expresada en un hospedero eucariótico.

Dada la baja actividad y termoestabilidad reportada para la sacarosa isomerasa Pall NX-5 a temperaturas superiores a 40 °C (Li *et al.*, 2011); en este estudio, se desarrolló una estrategia integradora enfocada en combinar diferentes principios que contribuyan a potenciar la termoestabilidad de dicha enzima. Así, la estructura primaria de la Pall NX-5 fue modificada mediante mutagénesis dirigida al sitio y posteriormente expresada en *Komagataella phaffii* X33.



#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

La baja estabilidad de las sacarosa isomerasas es un limitante en su uso industrial. Es por ello, que mediante técnicas de ingeniería de proteínas, ingeniería genética y procesamiento enzimático se pretende potenciar la estabilidad de la Pall NX-5 frente a la temperatura, esto con el fin de utilizarla en la industria alimentaria ya que la isomaltulosa tiene buenas propiedades organolépticas, no es cariogénica, tiene mayor estabilidad que la sacarosa y presenta una tasa glucémica baja. Esto último cobra notoria importancia, pues según cifras de la Organización Mundial de la Salud, la diabetes y la nefropatía diabética causaron dos millones de defunciones en 2019.

## V. MARCO TEÓRICO

### 5.1. Diabetes mellitus, un reto de salud para México y el mundo

La diabetes es una enfermedad crónica que se manifiesta cuando el páncreas no produce suficiente insulina (hormona que regula la glucemia) o cuando el organismo no puede usar eficazmente la insulina que produce (A.D.A., 2017); en correspondencia con esto, existen tres tipos de diabetes. En la diabetes tipo 1, los individuos afectados presentan una producción deficiente de insulina en el organismo como consecuencia de la destrucción de las células beta del páncreas; mientras que en la diabetes tipo 2, existe un uso ineficaz de la insulina (resistencia a la insulina). Por último, La diabetes gestacional es un trastorno temporal que ocurre durante el embarazo, e incrementa la probabilidad de desarrollar diabetes en algún momento de la vida (A.D.A., 2019).

La diabetes es un serio problema de salud que ha alcanzado niveles alarmantes. En el año 2000, el cálculo global de prevalencia de diabetes en adultos (20 a 79 años) fue de 151 millones, cifra cercana al cálculo de la OMS en ese momento (150 millones) (Guariguata *et al.*, 2011) Desde entonces, las estimaciones de personas aquejadas de la enfermedad se han incrementado sustancialmente (Figura 1), al punto que solo a dos décadas del comienzo del siglo XXI la prevalencia de diabetes es tres veces superior a la inicial. Hoy día se estima que para mediados de siglo el número de personas diabéticas será 4.6 veces superior a lo calculado en el 2000 y un 51% superior a lo calculado en 2019 (Figuras 1 y 2) (Diabetes, 2019).

La diabetes tipo 2 es una de las mayores emergencias mundiales de salud del siglo XXI y no respeta el estado socioeconómico ni las fronteras entre países. Anualmente, se incrementa el número de personas que viven con esta condición, que puede desencadenar complicaciones a lo largo de la vida (Huang *et al.*, 2017). Argumentándose, que la diabetes tipo 2 no sólo es una enfermedad, sino un síndrome heterogéneo que repercute en diversos padecimientos crónicos, tales



como: afecciones a los riñones, la retina y el sistema nervioso; y que además, se caracteriza por su elevada morbilidad y alto riesgo de muerte prematura (Dávila-Cervantes *et al.*, 2011; O.M.S., 2020). La diabetes tipo 2 es la más común y representa el 90% de los casos de diabetes en todo el mundo. Además, se estima que tres de cada cuatro personas con esta afección se encuentran en edad laboral activa (Ravaud *et al.*, 2005), lo que representa un riesgo de grandes proporciones para la economía mundial cuando se analizan las cifras mostradas en la Figura 2.

Tal como se muestra en la Figura 2, nuestra región (Norteamérica) no está exenta del contexto mundial de la diabetes, proyectándose un incremento del 33% en la prevalencia de la enfermedad entre adultos (Diabetes, 2019). La diabetes constituye un desafío de salud pública en México, ya que la presencia de esta enfermedad ha experimentado un preocupante aumento en las últimas décadas (Medina *et al.*, 2017). En este sentido, en la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas realizada por el Instituto Nacional de Salud Pública (1993), se observó un 4.8% de prevalencia de diabetes (diagnosticada), valor que se incrementa a un 9.2% en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Pública (2012) y un 9.4% en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del Observatorio Mexicano de Enfermedades no Transmisibles (2016).

Atendiendo al impacto de la diabetes en estadísticas de mortalidad en México, es destacable que en 2007 esta fue la primera causa de muerte, con un total de 70,512 defunciones, de las cuales el 47.2% ocurrieron entre hombres y el 99.7% en personas de 20 años o más (Dávila-Cervantes *et al.*, 2011). En ese mismo año, seis entidades federativas agruparon el 50% de las muertes por esta causa (Estado de México (13.8%), Ciudad de México (12.1%), Veracruz (7.5%), Jalisco (6.3%), Puebla (5.6%) y Guanajuato (5.4%)). En México se ha presentado un incremento en la tasa de mortalidad por diabetes; pues, solo nueve años después (2016), las defunciones por diabetes ascendieron a 105,574, lo que representa un incremento del 50% en estas estadísticas, ocupando la diabetes la segunda causa de muerte entre mexicanos (Federación Mexicana de Diabetes, 2018).

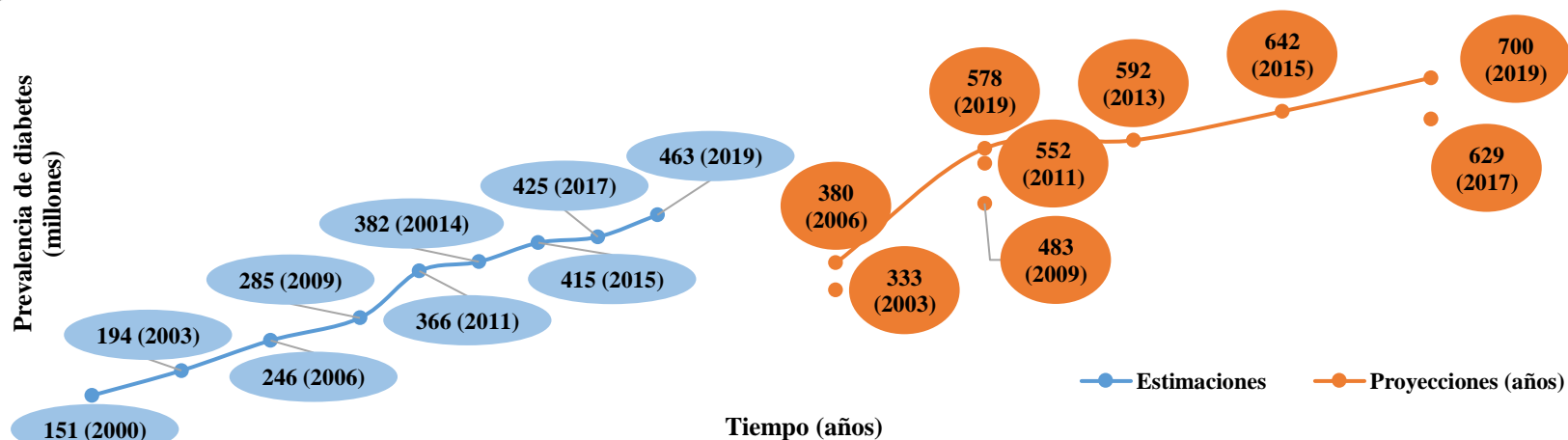


Figura 1. Estimaciones y proyecciones de la prevalencia mundial de diabetes en el grupo de edad 20-79 años (Diabetes, 2019).

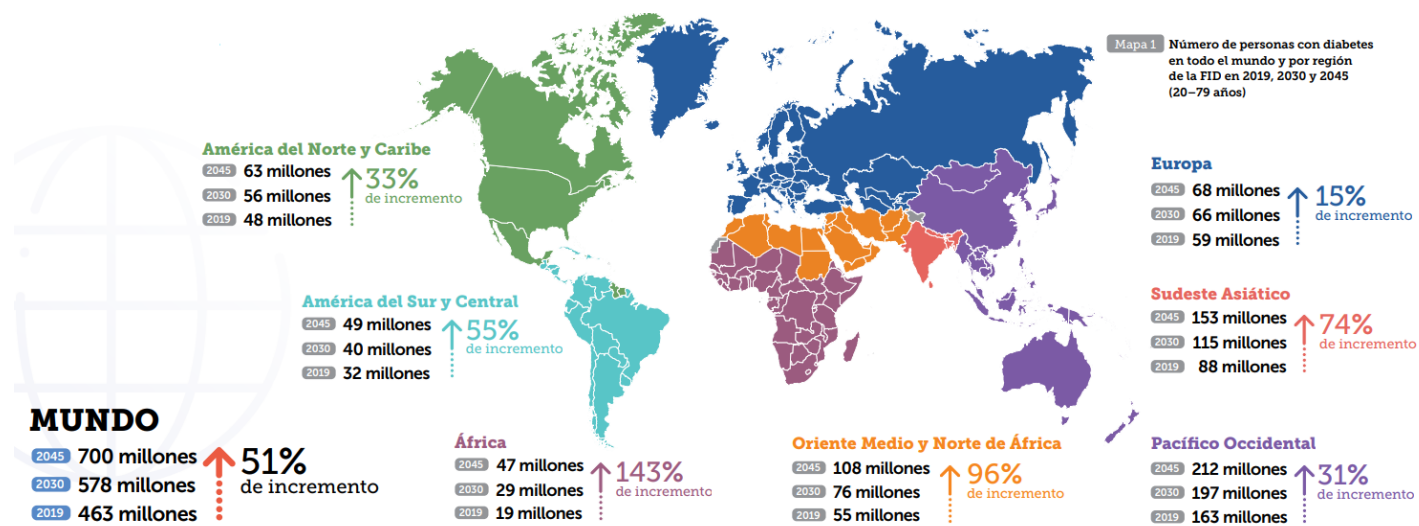


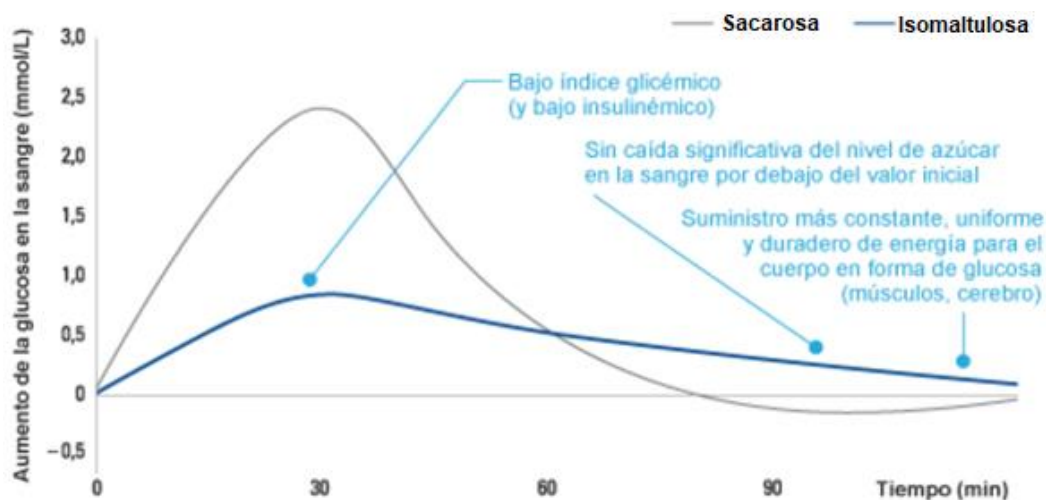
Figura 2. Estimación del número de personas aquejadas de diabetes a nivel mundial y por regiones, para los años 2019, 2030 y 2045 (Diabetes, 2019).

Aún no se comprenden completamente las causas que desencadenan la diabetes tipo 2, aunque hay una fuerte asociación con el sobrepeso, la obesidad, la edad avanzada, el origen étnico y los antecedentes familiares. Al igual que en la diabetes tipo 1, la diabetes tipo 2 resulta de una combinación de predisposición genética y factores ambientales desencadenantes. En el tratamiento de la diabetes tipo 2, se destaca la importancia de fomentar un estilo de vida que incluya una alimentación saludable, actividad física regular, abstenerse de fumar y mantener un peso corporal adecuado (Diabetes, 2019). En México la población ha sido influenciada por factores como su envejecimiento, el desarrollo económico y el incremento de la urbanización. Este escenario ha derivado en hábitos de vida más sedentarios y un aumento en la ingesta de alimentos poco saludables, lo cual está vinculado con el problema de la obesidad (Basu *et al.*, 2013). Precisamente, según cifras publicadas por la Dirección Nacional de Epidemiología (2019), en 2017 se observó una tasa de 405.12 casos de diabetes tipo 2 por cada 100,000 habitantes en México; mientras que en 2018, este indicador creció a 411.85.

En la actualidad, es ampliamente reconocido que la dieta desempeña un papel crucial en la salud de las personas, tanto debido a la función de los nutrientes en la prevención de enfermedades como por la influencia de algunos nutrientes en el desarrollo de enfermedades crónicas (Guariguata *et al.*, 2011). Atendiendo a esto, recientemente se han impulsado políticas intersectoriales relacionadas con la salud alimentaria, la actividad física y el tabaquismo; tal es el caso de la aplicación de impuestos que gravan entre otros productos y servicios, a los alimentos con alto contenido calórico; y es que, el apego a hábitos alimentarios adecuados aunados al desarrollo de actividad física, permiten disminuir el riesgo de desarrollar diabetes entre un 34% y un 43% (Diabetes, 2019).

Hasta un 85% de la población en México sobrepasa el consumo de azúcar (sacarosa) recomendado por la OMS (Jornada, 2019). Precisamente, la sacarosa al ser consumida es rápidamente metabolizada generando picos en el índice glucémico que inciden negativamente en la salud poblacional (Figura 3) (Sissons

*et al.*, 2007). Así, en el panorama mundial de las últimas décadas, se ha observado una pujante tendencia al uso de edulcorantes alternativos a la sacarosa, que respondan al creciente mercado, ávido de productos más saludables, que ha nacido de la toma de conciencia en la población.



**Figura 3.** Comportamiento en el tiempo de la concentración de glucosa en la sangre (mM) (Merino, 2014).

## 5.2. Isomaltulosa, una alternativa saludable

El disfrute de la dulzura de un alimento es una capacidad innata de los seres humanos, de manera que, los edulcorantes alternativos a la sacarosa son de gran interés para la industria alimentaria. Los científicos y tecnólogos de alimentos han estado investigando edulcorantes durante más de 100 años (O'Brien-Nabors, 2016). El número de edulcorantes aprobados ha aumentado sustancialmente en las últimas tres décadas. Así, los desarrolladores de productos alimentarios ahora tienen un espectro de edulcorantes entre los cuales elegir para satisfacer la creciente demanda de productos dulces con calorías reducidas (Fernández *et al.*, 2017).

Los edulcorantes alternativos brindan opciones de alimentos y bebidas para controlar la ingesta de calorías y carbohidratos, ayudar en el mantenimiento o reducción de peso, ayudar en el manejo de la diabetes y ayudar en el control de las caries dentales. En la medida que ha aumentado la obesidad en muchas

partes del mundo, la cantidad y disponibilidad de estos productos ha aumentado (O'Brien-Nabors, 2016). La demanda de edulcorantes alternativos crece en México, lo que se demuestran en los cambios en su mercado. De esta manera, la distribución actual del consumo de azúcar y otros edulcorantes, como el jarabe de maíz de alta fructosa y los edulcorantes bajos en calorías, ha experimentado cambios en comparación con la situación de hace tres décadas (Fernández *et al.*, 2017).

La isomaltulosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-1,6-D-fructofuranósido) es uno de los potenciales prospectos a sustituir la sacarosa como aditivo alimentario. Esta es un isómero estructural de la sacarosa con propiedades físicas y organolépticas muy similares, aunque tiene aproximadamente 50% del dulzor relativo de la sacarosa (Schiweck *et al.*, 1991). En comparación con la sacarosa, la isomaltulosa es menos lábil bajo condiciones extremas de pH, mostrando (solución al 10%) ser estable durante más de 30 min cuando es incubada a pH 1.0 y 95 °C, mientras que la sacarosa (solución al 10%) se hidroliza casi por completo en las mismas condiciones (Sentko A, 2011).

Estudios *in vivo* indican que la isomaltulosa es completamente hidrolizada y absorbida en el intestino delgado, es decir, existen enzimas intestinales que pueden hidrolizar completamente dicho carbohidrato. La velocidad de hidrólisis, sin embargo, es muy lenta en comparación con la sacarosa y la maltosa (Kawai *et al.*, 1985; Lina *et al.*, 2002; Mu *et al.*, 2014), como se puede observar en la Figura 3. Así, después de la administración oral de la isomaltulosa los niveles de insulina y de glucosa en sangre muestran un aumento más lento y tiempos de remanencia más prolongados y balanceados (Häberer *et al.*, 2009; Kawai *et al.*, 1985; Kawai *et al.*, 1989; König *et al.*, 2012).

Como resultado del comportamiento que se observa en la Figura 3, la ingesta de isomaltulosa se asocia con una oxidación potenciada de las grasas en comparación con los carbohidratos alimentarios comunes. Así, la isomaltulosa puede aumentar la cantidad de grasas usadas como fuente de energía y por lo

tanto es útil para prevenir el aumento del peso corporal (Achten *et al.*, 2007; König *et al.*, 2012; van Can *et al.*, 2012).

Estudios de toxicidad subcrónica han demostrado que la administración de isomaltulosa no produce efectos adversos (Jonker *et al.*, 2002); también se observó que la isomaltulosa no tuvo efectos embriotóxicos ni teratogénicos en ratas alimentadas durante el embarazo (Lina *et al.*, 1997); asimismo, la evaluación de genotoxicidad a través de la prueba de Ames indica que la isomaltulosa no tiene efectos mutagénicos (Mu *et al.*, 2014).

El conjunto de propiedades señaladas con anterioridad hacen a la isomaltulosa única dentro del espectro de edulcorantes alternativos comercializados en la actualidad (O'Brien-Nabors, 2016). Sin embargo; la isomaltulosa existe en cantidades extremadamente pequeñas en la naturaleza, encontrándose solo en un 1% en la miel (Siddiqui *et al.*, 1967) y en extractos de caña de azúcar (Eggleston *et al.*, 2003). Por otro lado, su síntesis a través de la química convencional es complicada (Kawaguti, 2007). Es por ello, que para la isomerización de la sacarosa a isomaltulosa se ha proyectado como una reacción enzimática comercialmente atractiva, la catalizada por la sacarosa isomerasa (EC 5.4.99.11) (Lee *et al.*, 2011).

### **5.3. Sacarosa isomerasa: el biocatalizador para producir isomaltulosa**

El estudio de las sacarosa isomerasas comenzó en la década de 1950 cuando se aisló y analizó la bacteria *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77 productora de la isoforma SmuA (Ravaud *et al.*, 2006). Hoy día varios microorganismos han sido reconocidos por su capacidad de producir sacarosa isomerasas. Como se muestra en la Tabla I, dentro de las enzimas microbianas productoras de isomaltulosa que se han purificado y caracterizado, están incluidas las isoformas de: *Erwinia* sp. (Kawaguti *et al.*, 2010a; Li *et al.*, 2011), *Serratia plymuthica* sp. (Véronèse *et al.*, 1998), *Protaminobacter rubrum* sp. (Ravaud *et al.*, 2006), *Pantoea dispersa* sp. (Wu *et al.*, 2004), *Klebsiella* sp. (Huang *et al.*, 1998) *Enterobacter* sp. (Cho *et al.*,

2007), *Agrobacterium radiobacter* sp. (Nagai-Miyata *et al.*, 1993), *Pseudomonas mesoacidophila* sp. (Miyata *et al.*, 1992) y *Raoultella terrigena* sp. (Liu *et al.*, 2021). Asimismo, los genes codificantes de las sacarosa isomerasas han sido designados como: *pall* (Aroonual *et al.*, 2007; Cha *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Véronèse *et al.*, 1998), *pal-2* (Liu *et al.*, 2021), *smuA* (Ravaud *et al.*, 2006), *sim* (Wu *et al.*, 2005) y *mutB* (Watzlawick *et al.*, 2009). El desarrollo exponencial en la ingeniería genética ha facilitado la expresión recombinante de las isoformas de la enzima (Aroonual *et al.*, 2007; Börnke *et al.*, 2001; Cha *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Ravaud *et al.*, 2006; Watzlawick *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2005), siendo *Escherichia coli* el hospedero más comúnmente empleado.

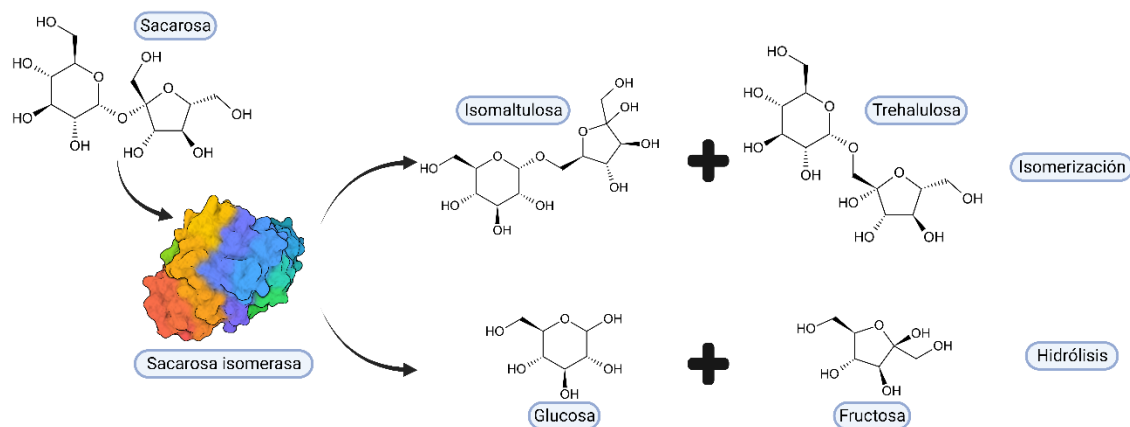
Tal como se muestra en la Figura 4, las sacarosa isomerasas poseen tanto actividad isomerasa como hidrolasa, aunque las cantidades producidas de D-glucosa y D-fructosa son pequeñas (Wu *et al.*, 2004). Así, la isomaltulosa y la trehalulosa son los productos principales de la acción catalítica de la enzima (Mu *et al.*, 2014). No obstante, la proporción de isomaltulosa producida y el comportamiento catalítico de la enzima varían considerablemente dependiendo de la isoforma analizada, el pH y la temperatura de reacción (Tabla I). Por ejemplo, la isoforma de *P. dispersa* UQ68J produce hasta un 91% de isomaltulosa y 3% de trehalulosa (30 – 35 °C) (Wu *et al.*, 2004), mientras las sacarosa isomerasas de *A. radiobacter* MX-232 (Nagai-Miyata *et al.*, 1993) y *P. mesoacidophila* MX-45 (Miyata *et al.*, 1992) producen hasta un 88% de trehalulosa. También existen diferencias significativas en las constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y las eficiencias catalíticas de varias sacarosa isomerasas (Tabla 2). Así,  $K_m$  se estima en el rango de 30.1 mM (Duan *et al.*, 2016) a 257 mM (Li *et al.*, 2011). Mientras las eficiencias catalíticas ( $k_{cat}/K_m$ ) han sido reportadas en el rango de 1301 mM<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> (Lee *et al.*, 2008) a 0.27 mM<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> (Zhang *et al.*, 2002).

**Tabla I.** Características generales de purificados de enzimas productoras de isomaltulosa.

Isoforma	T <sub>op</sub> (°C)	pH	Actividad específica (U/mg)	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (mM <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	Isomaltulosa (%)	Referencia
Silvestre Pall NX-5	30	6	423	222	NR	83	(Ren <i>et al.</i> , 2011)
Recombinante Pall NX-5	30	5	NR	257	NR	87	(Li <i>et al.</i> , 2011)
Silvestre Pall D12	40	6	19.8	138	NR	65.7	(Kawaguti <i>et al.</i> , 2010a)
Silvestre NCPPB 1578	30	NR	4.11 <sup>a</sup>	280	NR	85	(Cheetham, 1984)
Recombinante CBS 574.77	35	NR	NR	32.4	1301	88.5	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
Recombinante Pall NK33	35	6	2362	42.7	NR	76.8	(Aroonual <i>et al.</i> , 2007)
Recombinante UQ68J	35	5	562	39.9	17.9	91	(Wu <i>et al.</i> , 2005)
Recombinante UQ14S	35	6	351	76	6.2	66	(Wu <i>et al.</i> , 2005)
Recombinante Pall LX3	35	6	328	54.6	0.27	83	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
Silvestre ATCC15928	30	6.2	120	65	NR	72.6	(Véronèse <i>et al.</i> , 1998)
Recombinante AS9	30	6	957.5	30.1	33	76.3	(Duan <i>et al.</i> , 2016)
Recombinante Ejp617	40	6	118.87	69.28	NR	80.5	(Zhang <i>et al.</i> , 2021a)
Recombinante FMB-1	50	5-6	49	NR	NR	78	(Cha <i>et al.</i> , 2009)
Recombinante Pal-2	40	5.5	286.4	62.9	NR	81.7	(Liu <i>et al.</i> , 2021)

NR: no reportado.



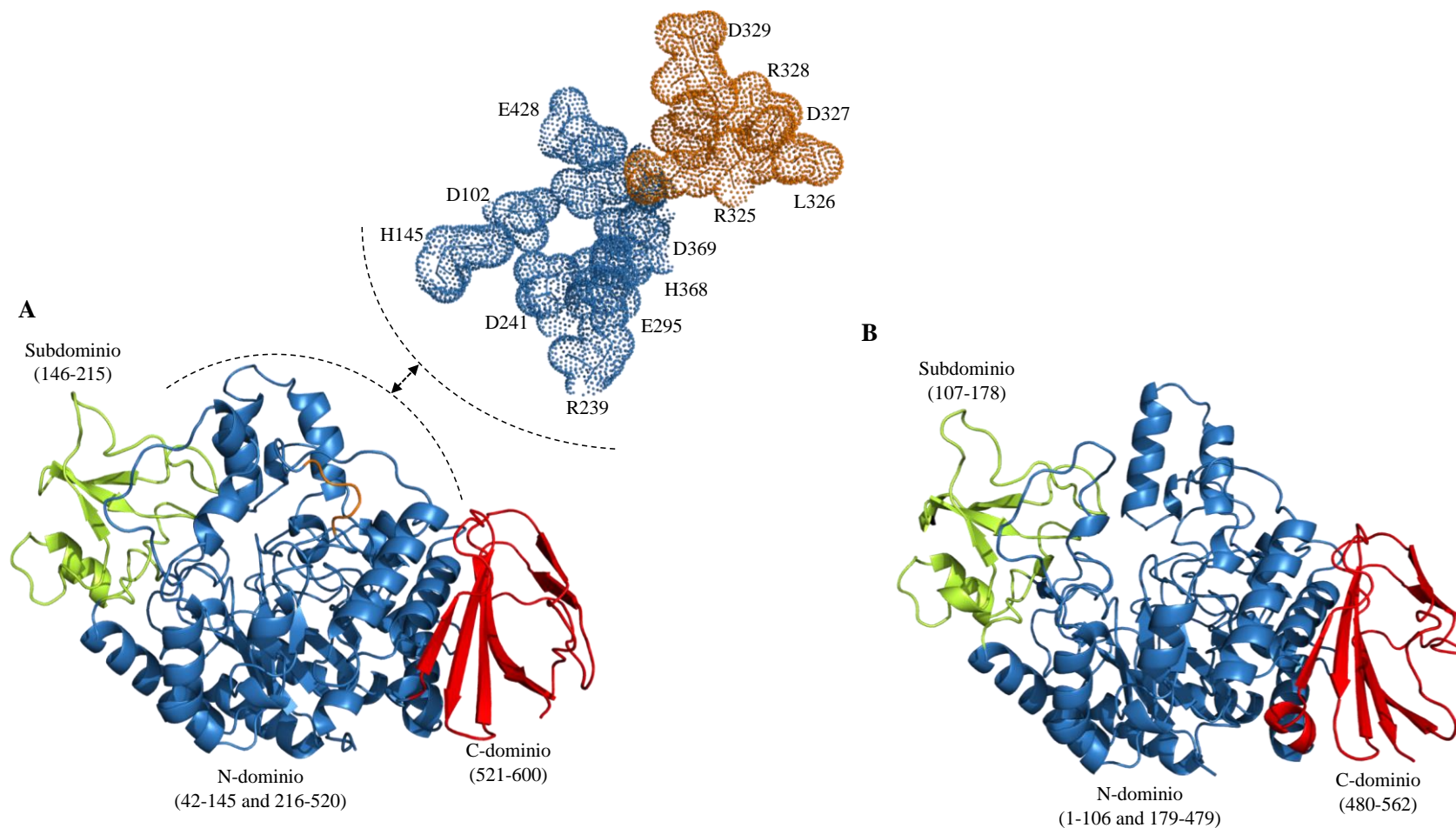


**Figura 4.** Hidrólisis e isomerización de la sacarosa por la acción de la enzima sacarosa isomerasa.

Hoy en día, en el Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>) han sido reportadas 28 estructuras cristalinas de sacarosa isomerasas, resueltas mediante difracción de rayos X (Tabla II). De estas estructuras, 20 corresponden a variantes de la isoforma de *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 (Lipski *et al.*, 2013; Ravaud *et al.*, 2007; Ravaud *et al.*, 2005), cinco corresponden a variantes de la isoforma de *Erwinia rhapontici* NX-5 (Xu *et al.*, 2013), dos corresponden a variantes de la isoforma de *P. rubrum* CBS574.77 (Ravaud *et al.*, 2009) y una a la isoforma de *Klebsiella* sp. LX3 (Zhang *et al.*, 2003). Estos datos cristalográficos han permitido elucidar que las sacarosa isomerasas son moléculas de una sola subunidad (Figura 5A), con un dominio central catalítico conformado por un barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> similar a las triosa fosfato isomerasas (Ravaud *et al.*, 2007). Además, la arquitectura del sitio activo de las sacarosa isomerasas las ubica dentro de la familia 13 de las hidrolasas glicosídicas (GH13) (Zhang *et al.*, 2003).

Tabla II. Información sobre las estructuras cristalinas de sacarosa isomerasas.

Microrganismo	Sacarosa isomerasa	Mutación	PDB ID	Molécula interactuante	Resolución (Å)	Referencia
<i>Pseudomonas mesoacidophila</i> MX-45 ( <i>Rhizobium</i> sp. MX-45)	MutB	No mutante	2PWH	nativa	2.0	(Ravaud <i>et al.</i> , 2007)
		No mutante	1ZJA	MutB-Tris	1.6	
		No mutante	2PWD	MutB-desoxinojirimicina	1.8	
		No mutante	2PWG	MutB-castanospermina	2.2	
		D200A	2PWF	MutB-glucosa	1.8	(Ravaud <i>et al.</i> , 2005)
		E254Q	2PWE	MutB-sacarosa	2.0	
		No mutante	1ZJB	MutB-Tris	1.8	
		A258V	4GO8	MutB-Tris	2.15	
		D415N	4GO9	MutB-Tris	2.2	
		D200A-D415N (enzima inactiva)	4HA1	MutB-isomaltulosa-glucosa-Ca <sup>2+</sup>	2.2	
		No mutante	4H8V	MutB- trehalulosa-Ca <sup>2+</sup>	1.95	
		D200A-D415N (enzima inactiva)	4H8U	MutB- trehalulosa- glicerol-Ca <sup>2+</sup>	2.0	(Lipski <i>et al.</i> , 2013)
		E254Q-D415N (enzima inactiva)	4H8H	MutB- SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -glicerol-Ca <sup>2+</sup>	2.0	
		D200A-D415N (enzima inactiva)	4H7V	MutB- glicerol-glucosa -Ca <sup>2+</sup>	1.8	
		R284C	4H2C	MutB-glicerol-Ca <sup>2+</sup>	1.7	
		R284C	4GIN	MutB-glicerol-Ca <sup>2+</sup>	1.9	
		F164L	4GIA	MutB-Tris-glicerol-Ca <sup>2+</sup>	2.01	
F164L	4GI9	MutB-Tris-glicerol-Ca <sup>2+</sup>	2.15	(Xu <i>et al.</i> , 2013)		
F164L	4GI8	MutB-Tris-glicerol-Ca <sup>2+</sup>	1.95			
F164L	4GI6	MutB-Tris-glicerol-glucosa-Ca <sup>2+</sup>	2.15			
No mutante	4HOW	(NX-5)-glicerol-Ca <sup>2+</sup> (nativa)	1.7			
No mutante	4HOX	(NX-5)-Tris-glicerol-Ca <sup>2+</sup>	2.0			
D241A	4HOZ	(NX-5)-glucosa-glicerol-Ca <sup>2+</sup>	2.0			
E295A	4HP5	(NX-5)-glucosa-glicerol-Ca <sup>2+</sup>	2.0	(Ravaud <i>et al.</i> , 2009)		
E295Q	4HPH	(NX-5)-sacarosa-glicerol-Ca <sup>2+</sup>	1.7			
<i>Protaminobacter rubrum</i> CBS574.77	SmuA	No mutante	3GBD	SmuA-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup> -etilenglicol	1.95	(Zhang <i>et al.</i> , 2003)
		No mutante	3GBE	SmuA-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup> -etilenglicol-desoxinojirimicina	1.7	
<i>Klebsiella</i> sp. LX3	Pall	No mutante	1M53	Sin información	2.2	



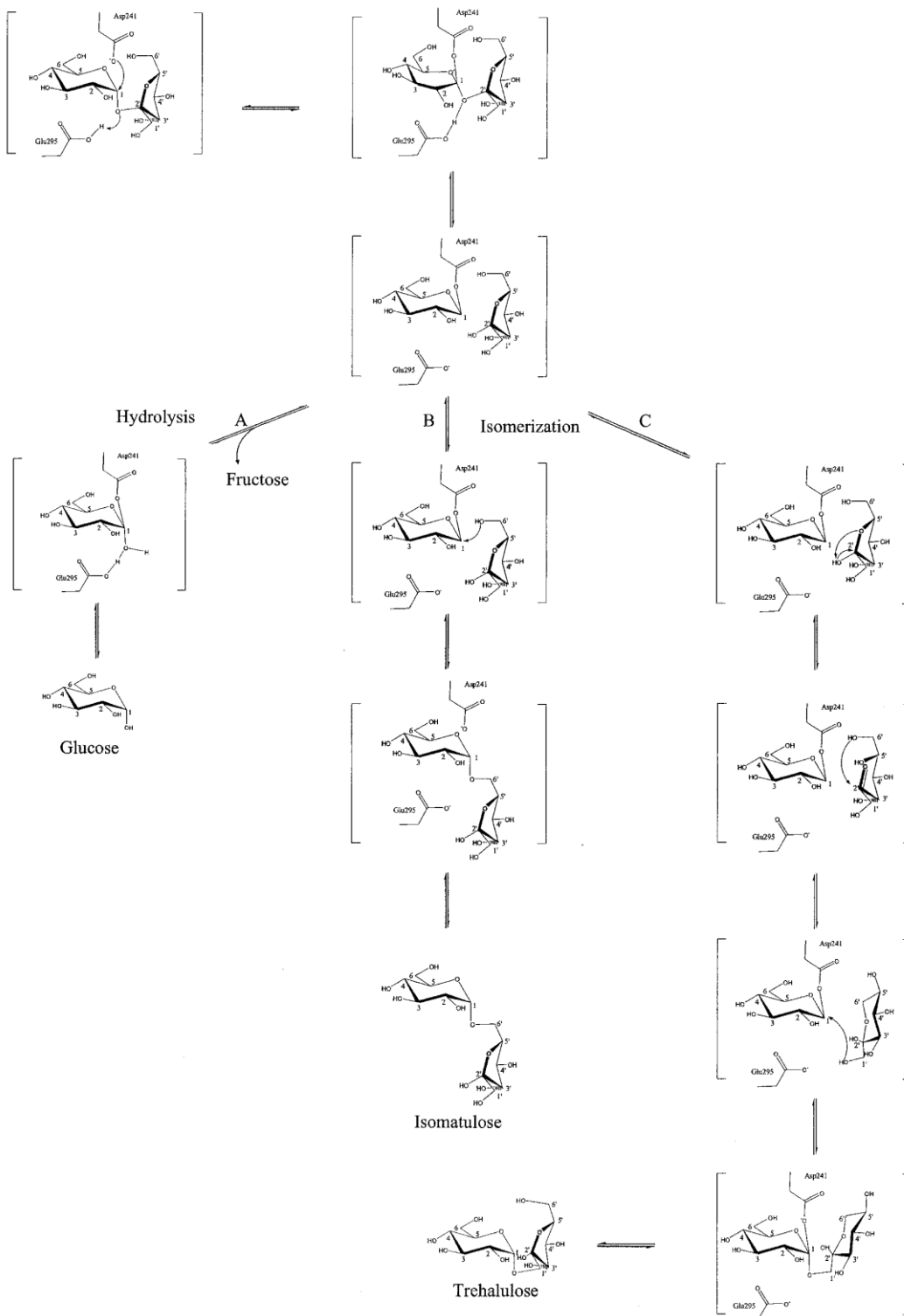
**Figura 5.** Estructuras de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 (Xu *et al.*, 2013) y la trehalosa-6-fosfato hidrolasa (Lin *et al.*, 2016). Las moléculas se muestran en la misma orientación. A y B, el barril catalítico N-terminal ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> se dibuja en azul, el subdominio en verde limón y el dominio C-terminal en rojo. A, la región de isomerización (residuos 325–329) en la Pall NX-5 se dibujan en naranja, los residuos que participan en la unión e hidrólisis e isomerización de la sacarosa se muestran ampliados.

La familia GH13, constituida a principios de la década de 1990 (Janeček *et al.*, 2020), representa la familia más grande de enzimas metabolizadoras de polisacáridos (Chen *et al.*, 2023; Han *et al.*, 2019b), agrupando tanto a enzimas con actividad hidrolasa (Plaza-Vinuesa *et al.*, 2019), transferasa (Franceus *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2022), como isomerasa (Samanta, 2022). Precisamente, las diferencias en la especificidad hacia el sustrato y/o las actividades enzimáticas de los miembros de la familia GH13, condujo a que esta se haya dividido en subfamilias. Hoy día, según la base de datos Carbohydrate-Active enZYmes (CAZy, <http://www.cazy.org/>) la familia GH13 está conformada por 46 subfamilias (Lombard *et al.*, 2014); no obstante, este número sigue incrementándose (Janeček *et al.*, 2015; Sarian *et al.*, 2017). Estas subfamilias muestran una relación más clara entre sus secuencias, especificidades enzimáticas y filogenia (Stam *et al.*, 2006), lo que facilitaría la predicción de la función catalítica de enzimas con un potencial industrial importante, a partir de genes o microorganismos noveles.

A pesar de la aparente heterogeneidad, las enzimas GH13 se caracterizan por estar conformadas por tres dominios designados como A, B y C (Janíčková *et al.*, 2020; Marengo *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2003) (Figura 5). Específicamente, para la sacarosa isomerasa Pall NX-5 el dominio A (N-terminal catalítico) se ubica entre los residuos 42-145 y 216-520 (Xu *et al.*, 2013). Asimismo, para la isoforma Pall el dominio N-terminal catalítico se ubica entre los residuos 3-146 y 216-521 (Zhang *et al.*, 2003). El dominio N-terminal es una estructura supersecundaria ( $\beta/\alpha$ ) de 8 barriles, que es el cuerpo principal de las sacarosa isomerasas (el centro catalítico de la enzima). El subdominio (dominio B) ubicado entre los residuos 146-215 (posiciones en las isoformas Pall NX-5 y Pall), es una estructura rica en bucles cortos, que no tiene función conocida ni en la Pall, ni en otros miembros de la familia 13. Finalmente, el dominio C-terminal ubicado entre los residuos 521-600 (posición en la isoforma Pall NX-5) consta de dos láminas  $\beta$  antiparalelas, este dominio interactúa con el dominio N-terminal a través de la formación de puentes salinos y enlaces de hidrógeno. Así, el dominio C está relacionado con la

estabilidad estructural de las sacarosa isomerasas (Xu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2003).

Entre las enzimas GH13 con las que las sacarosa isomerasas comparten mayor similitud estructural destacan: la 1,6- $\alpha$ -glucosidasa de *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Møller *et al.*, 2012), la trehalosa-6-fosfato hidrolasa de *Bacillus licheniformis* (Lin *et al.*, 2016), la  $\alpha$ -glucosil transferasa XgtA de *Xanthomonas campestris* WU-9701 (Watanabe *et al.*, 2020), la  $\alpha$ -glucosidasa BspAG13\_31A de *Bacillus* sp. AHU2216 (Auiewiriyankul *et al.*, 2018) e incluso la  $\alpha$ -amilasa de *Ruminococcus bromii* (Cockburn *et al.*, 2020) (Figura 5). Esta similitud estructural sugiere un mecanismo similar en la unión del sustrato y catálisis entre las enzimas GH13. Precisamente, las enzimas GH13 comparten el mismo mecanismo catalítico de doble desplazamiento que procede a través de la acumulación y subsiguiente descomposición de un intermediario glicosil-enzima (Janeček, 2002). Además, la maquinaria catalítica de la familia GH13 está formada por una tríada de residuos: un nucleófilo catalítico (ácido aspártico), un donador de protones (ácido glutámico) y un estabilizador del estado de transición (ácido aspártico) (Janeček *et al.*, 2014). Entre las sacarosa isomerasas destacan cinco residuos altamente conservados presentes en el dominio N-terminal catalítico. Así, Zhang *et al.* (2003) señala al Asp<sup>241</sup>, Glu<sup>295</sup> y Asp<sup>369</sup> (posición en la isoforma Pall) como la tríada catalítica potencial (Figura 5), mientras la His<sup>145</sup> e His<sup>368</sup> están altamente conservadas en  $\alpha$ -amilasas y glicosiltransferasas (Zhang *et al.*, 2002). Como se muestra en la Figura 6, en la isoforma Pall, el Glu<sup>295</sup> se desempeña como ácido general al protonar el oxígeno del enlace glicosídico y producir la hidrólisis del sustrato; luego, el O<sup>52</sup> del Asp<sup>241</sup> actúa como nucleófilo y ataca el C1 del D-glicosil, formando el intermediario  $\beta$ -glicosil-enzima, mientras que Asp<sup>369</sup> forma enlaces de hidrógeno con el O<sup>2</sup> y el O<sup>3</sup>. La His<sup>145</sup> forma un enlace de hidrógeno con el O<sup>6</sup> y la His<sup>368</sup> con el O<sup>2</sup>. La isomaltulosa se produce cuando el O<sup>6</sup> de la D-fructosa (producto de la hidrólisis) se une nucleofílicamente al C1 del grupo D-glicosilo (Zhang *et al.*, 2003).



**Figura 6.** Mecanismo de la sacarosa isomerasa. La ruta A muestra la hidrólisis de la sacarosa y las rutas B y C muestran la isomerización de la sacarosa para formar isomaltulosa y trehalulosa, respectivamente (Zhang *et al.*, 2003).

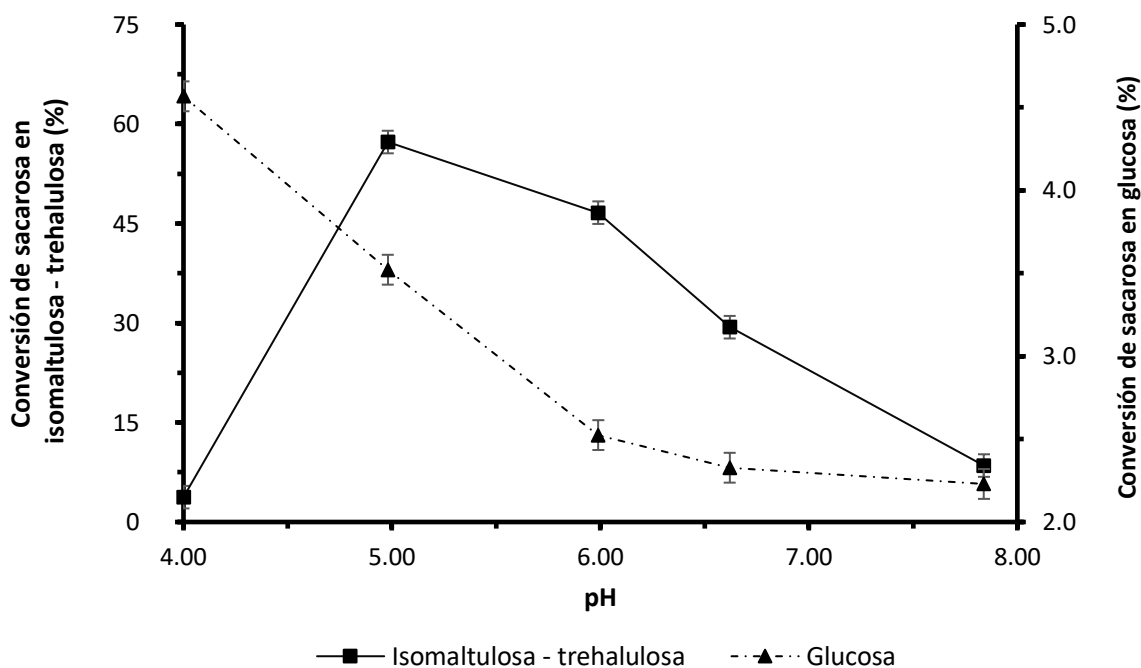
A diferencia de la familia de enzimas GH13, entre las sacarosa isomerasas el motivo RLDRD (RYDRA, en la isoforma MutB) se encuentra altamente conservado. La secuencia <sup>325</sup>RLDRD<sup>329</sup> (posición en la isoforma Pall) se encuentra adyacente a la hendidura del sitio activo (Figura 5A). Mediante análisis de mutagénesis dirigida a esta secuencia, se ha comprobado su imprescindible y determinante papel en la cinética enzimática y la especificidad hacia la formación de isomaltulosa (Lee *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2003). Basado en estudios de modelado, se sugiere que la secuencia RLDRD, especialmente las dos argininas, están involucradas en la unión a la fructosa (Lee *et al.*, 2008).

### 5.3.1. Antecedente particular: sacarosa isomerasa sintética SI\_OPT\_V5

Recientemente, Castillo-Aragón (2017) reportó la exitosa expresión de una sacarosa isomerasa recombinante en *K. phaffii* SMD, para lo que empleó el vector pD902:219942; el cual contiene un gen (*si\_opt\_v5*) cuya secuencia fue optimizada para dicho sistema de expresión. Además, la enzima fue caracterizada por Sardiña-Peña (2019), quien determinó que *si\_opt\_v5* (1802 pb) codifica para una secuencia de aminoácidos que guarda 100% de identidad con la sacarosa isomerasa de *P. dispersa* UQ68J (Sim), en 566 residuos de los 600 de la SI\_OPT\_V5 (Slopt) y los 598 de Sim. Dentro de las regiones homólogas están incluidos el sitio catalítico y la secuencia RLDRY.

Sardiña-Peña (2019) reportó que el valor óptimo para la actividad isomerasa de la Slopt fue alcanzado a pH 5.0 (Figura 7); comportamiento que coincidió con el de la mayoría de las sacarosa isomerasas reportadas, que presentan pH óptimos ligeramente ácidos (5.0-6.0), salvo la enzima de *E. rhapsodic* NCPPB1578 cuyo pH óptimo se encuentra a pH 7.0 (Cheetham, 1984). En el perfil que describió la actividad isomerasa de la Slopt se aprecia su elevada sensibilidad frente al cambio del pH fuera del intervalo óptimo (5.0-5.5). Este comportamiento ha sido abordado en la literatura; por ejemplo, la sacarosa isomerasa de *Klebsiella* sp. LX3 pierde actividad rápidamente a valores de pH superiores a pH 6.5 (Zhang *et al.*, 2002);

mientras la actividad de la sacarosa isomerasa de *Enterobacter* sp. FMB-1 decae significativamente fuera del rango de pH de 5.0 a 6.0 (Cha *et al.*, 2009). Sin embargo, la sacarosa isomerasa Pall NX-5 muestra actividad en un amplio rango de pH (Li *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2011). La labilidad de la actividad enzimática frente al pH está directamente asociada al mecanismo por el cual transcurre la catálisis de la sacarosa isomerasa (tipo ácido-base), de manera que el cambio del pH provoca la protonación o desprotonación de los residuos aminoácidos cargados en el sitio activo (Sardiña-Peña, 2019).



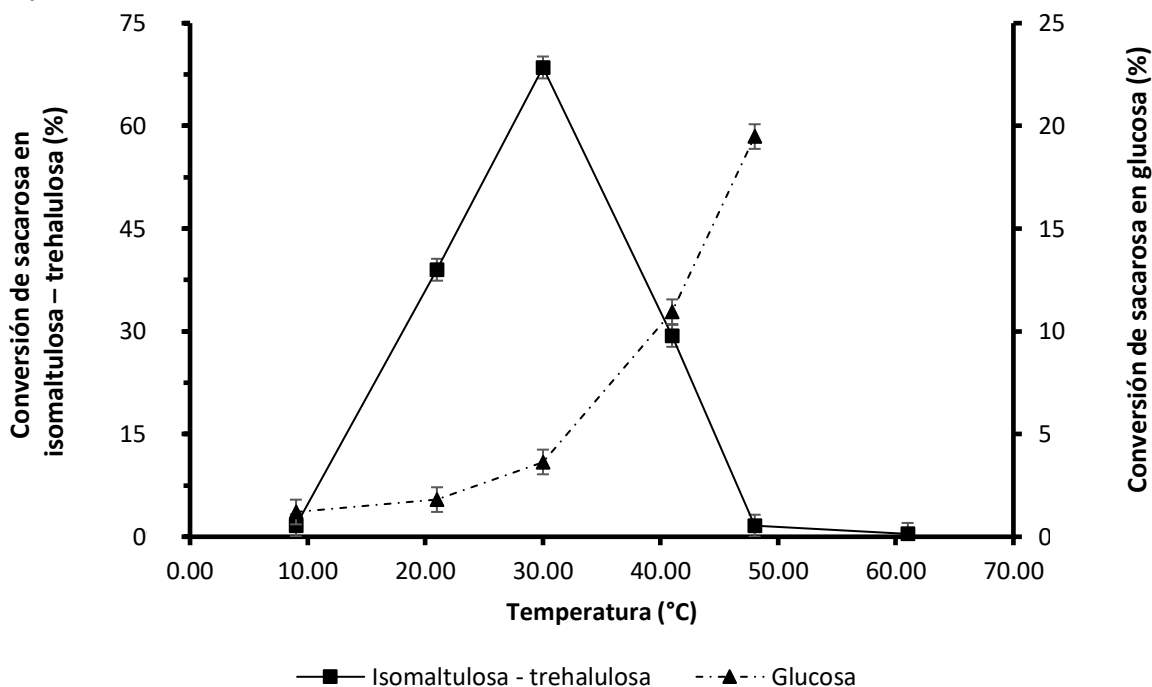
**Figura 7.** La línea continua muestra el efecto del pH en la actividad enzimática de la sacarosa isomerasa recombinante contenida en el extracto de proteína celular de *K. phaffii* SMD. La línea a puntos muestra el perfil de producción de glucosa a partir de la actividad hidrolasa de la sacarosa isomerasa para diferentes valores de pH (Sardiña-Peña, 2019).

También, Sardiña-Peña (2019) reportó que el decremento en el pH acentúa la actividad hidrolasa de la Slopt (Figura 7), incidiendo esto sobre la proporción de productos al finalizar la reacción enzimática. Así por ejemplo, la sacarosa isomerasa *K. planticola* produce trehalulosa a pH alto y monosacáridos a pH bajo, mientras la sacarosa isomerasa de *P. dispersa* UQ68J, contraparte nativa de la



Slopt, muestra actividad de hidrólisis a pH 3.0 (sin ninguna actividad de isomerización) (Wu *et al.*, 2005).

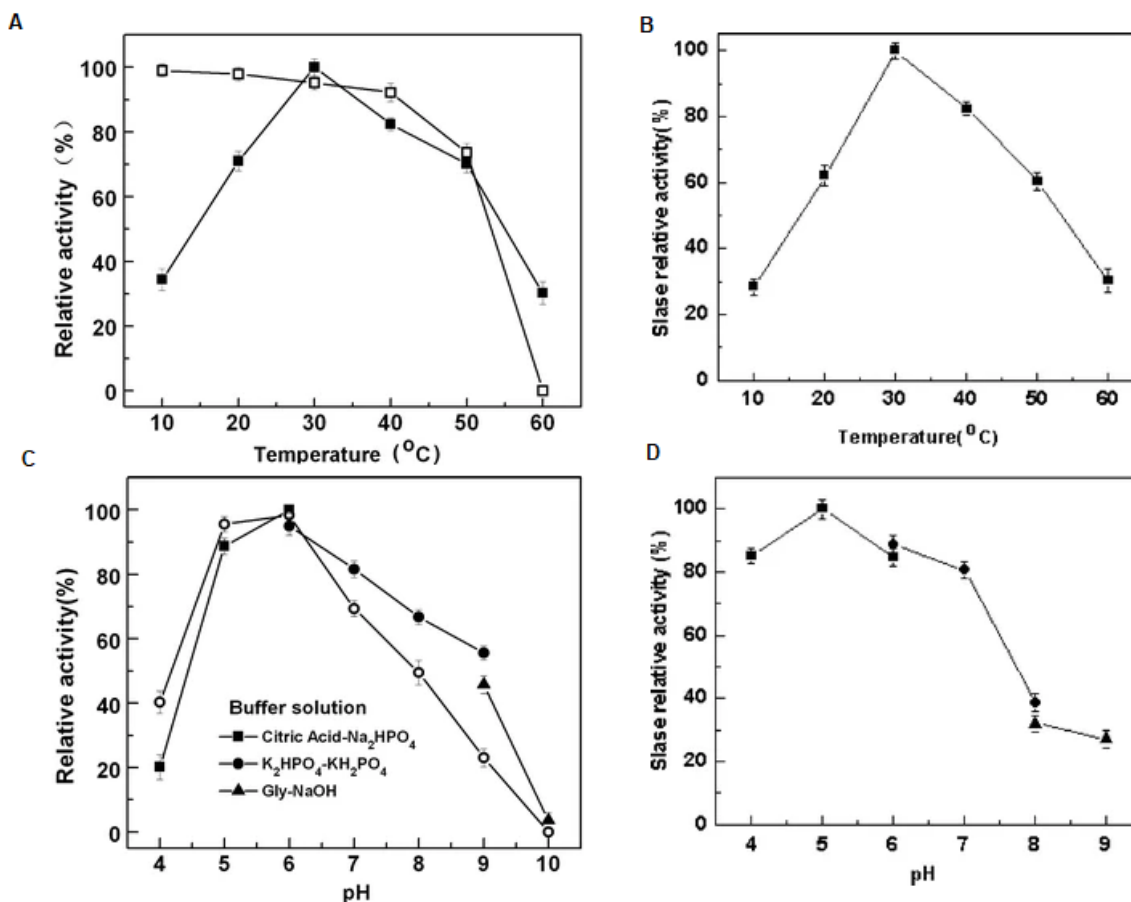
En relación al efecto de la temperatura sobre la actividad isomerasa de la Slopt (Figura 8), Sardiña-Peña (2019) reportó que la temperatura óptima fue de 30 °C. Esto coincidió con la mayoría de los reportes de sacarosa isomerasas que fijan un intervalo óptimo de temperaturas entre 30 °C y 40 °C (Aroonnuan *et al.*, 2007; Cha *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Ravaud *et al.*, 2006; Véronèse *et al.*, 1998; Watzlawick *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2005). Para temperaturas superiores a 50 °C la Slopt no retuvo actividad. Salvo la isoforma de *Enterobacter* sp. FMB-1 ( $T_{op}$  50 °C) (Cha *et al.*, 2009), la mayoría de las sacarosa isomerasas muestran su actividad máxima entre 20 y 40 °C (Guo *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021a) (Tabla I). Aun así, la isoforma de *Enterobacter* sp. FMB-1 pierde su actividad dramáticamente a temperaturas superiores a 50 °C (Cha *et al.*, 2009). Asimismo, la isoforma recombinante de *E. rhapontici* NX-5 no mostró actividad luego de ser incubada 30 min a 60 °C (Ren *et al.*, 2011), mientras la variante silvestre tiene un tiempo de vida media de 5 min a la misma temperatura (Li *et al.*, 2011). Por su parte la isoforma de *Erwinia* sp. Ejp617, después de 1 h de incubación a 50 °C, solo retenía el 1.7% de la actividad máxima (Zhang *et al.*, 2021a). De igual manera, la isoforma recombinante de *Pantoea dispersa* perdió hasta el 71% de su actividad luego de 1 h de incubación a 45 °C (Zheng *et al.*, 2019b). De esta manera, la alta termolabilidad de las sacarosa isomerasas constituye un problema en la producción industrial de isomaltulosa (Duan *et al.*, 2016). En comparación con las sacarosa isomerasas, muchas carbohidrato isomerasas, glicosiltransferasas y polisacárido hidrolasas que tienen un valor importante para la industria, como la: D-glucosa isomerasa (Brown *et al.*, 1993; Mu *et al.*, 2012), la L-arabinosa isomerasa (Cheng *et al.*, 2010) y la ciclodextrina glicosiltransferasa (Li *et al.*, 2007), muestran una temperatura óptima mucho más alta, y algunas incluso presentan su óptimo a más de 80 °C.



**Figura 8.** La línea continua muestra el efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la sacarosa isomerasa recombinante contenida en el extracto de proteína celular de *K. phaffii* SMD. La línea a puntos muestra el perfil de producción de glucosa a partir de la actividad hidrolasa de la sacarosa isomerasa para diferentes valores de temperatura (Sardiña-Peña, 2019).

### 5.3.2. Sacarosa isomerasa Pall NX-5, un punto de partida

La temperatura y el pH son dos factores que afectan en gran medida la actividad y la estabilidad de una enzima. La reducida actividad y termoestabilidad de las sacarosa isomerasas a temperaturas superiores a los 50 °C, es prácticamente una generalidad. La sacarosa isomerasa Pall NX-5 no está exenta de este comportamiento. En este sentido, Ren *et al.* (2011) reportó que la Pall NX-5 nativa presentó actividad máxima a 30 °C y que la enzima fue altamente estable en el rango de temperaturas de 20 a 50 °C, reteniendo más del 70% de su actividad inicial (Figura 9A). No obstante, la Pall NX-5 no mostró actividad a 60 °C luego de 30 min de incubación. Para el caso de la variante recombinante de la Pall NX-5 (expresada en *E. coli* BI21 (DE3)), Li *et al.* (2011) informó una tendencia similar a la de su contraparte nativa, al analizar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática (Figura 9A y B).



**Figura 9.** Actividad de las sacarosa isomerasas Pall NX-5 nativa (Ren *et al.*, 2011) y recombinante (Li *et al.*, 2011), frente a la temperatura y el pH. (A) Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática (cuadrados llenos) y la estabilidad (cuadrados abiertos) de la Pall NX-5 nativa. (B) Efecto de la temperatura sobre la actividad de la Pall NX-5 recombinante. (C) Efecto del pH sobre la actividad enzimática (círculos rellenos, cuadrados rellenos, triángulos rellenos) y estabilidad (círculos abiertos) de la NX-5 nativa. (D) Efecto del pH sobre la actividad de la Pall NX-5 recombinante. Solución tampón: cuadrados llenos Ácido cítrico- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; círculos rellenos  $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ ; triángulos rellenos Glicina- $\text{NaOH}$ .

En relación al comportamiento de la actividad y estabilidad frente al pH de la Pall NX-5 nativa, Ren *et al.* (2011) reportó un máximo a pH 6, una pérdida de actividad y estabilidad considerable solo a pH superiores a 8 o inferiores a 5, y una inactivación total a pH superiores a 10 (Figura 9C). Este comportamiento otorga a la Pall NX-5 nativa una gran flexibilidad en lo que a aplicaciones industriales se refiere. Por otro lado, Li *et al.* (2011) informa que el pH óptimo para la Pall NX-5 recombinante fue 5.0, con un 89%, 86%, 80%, 34% y 30% de la actividad máxima a pH 4.0, 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0, respectivamente. De esta manera, la Pall NX-5

recombinante se distingue de la nativa por poseer un pH óptimo y un margen de actividad más ácido para la síntesis de isomaltulosa.

Pese a que la actividad y estabilidad de la Pall NX-5 decrece considerablemente a temperaturas superiores a los 50 °C. Su desempeño frente a la variación del pH es poco común entre las sacarosa isomerasas. Por ello, es prudente utilizar esta isoforma de sacarosa isomerasa como punto de partida en una estrategia de mejora de características (estabilidad y actividad de la enzima) para aplicaciones industriales.

#### **5.4. Ingeniería de proteínas: una poderosa herramienta**

Varios factores contribuyen a la estabilidad térmica de las proteínas. Entre estos destaca, la composición de los aminoácidos que constituyen sus hélices. En este sentido, si se compara la prevalencia de Tyr, Gly y Gln en hélices de proteínas termoestables, se concluirá que estos aminoácidos se encuentran en mayor cuantía que en proteínas mesófilas, mientras que con la Val sucederá lo contrario (Warren *et al.*, 1995). También se ha observado que las sustituciones Lys → Arg y Ser → Ala, son comunes al comparar proteínas mesófilas con termófilas (Menéndez-Arias *et al.*, 1989). Otros factores centrales que determinan la estabilidad térmica de una proteína son: el incremento de enlaces de hidrógeno (Bi *et al.*, 2020; Masakari *et al.*, 2020; You *et al.*, 2019), la introducción de enlaces disulfuro (Li *et al.*, 2018b; Pang *et al.*, 2020; Teng *et al.*, 2019), puentes salinos (Bian *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020b), acortamiento de los bucles (Farnoosh *et al.*, 2020a; Kim *et al.*, 2012), optimización de superficies electrostáticas (Kumar *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2012), mayor solvatación en regiones específicas de la proteína (McCarthy *et al.*, 2000) y el aumento del empaquetamiento hidrofóbico intramolecular (Maenpuen *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2019a). Todos los factores enunciados con anterioridad comparten en gran medida un fundamento similar, permitiendo la disminución de la entropía de la molécula; es decir; se requiere rigidez de la enzima para una mayor termoestabilidad (You *et al.*, 2019). Aquí

debe notarse que la mejora de la estabilidad térmica es lograda mediante la optimización cooperativa de varios factores en lugar de una interacción predominante (Parthasarathy *et al.*, 2000).

La ingeniería de proteínas es un método ampliamente usado en la estabilización de enzimas mesófilas (Sheldon *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2020b). En este sentido, la utilización de herramientas de ingeniería de proteínas acumula varios éxitos industriales, que inclusive se remontan a la década de los 80 del siglo pasado cuando Genencor diseñó proteasas tolerantes al blanqueador presente en los detergentes para ropa (Estell *et al.*, 1985) y más recientemente, el diseño de enzimas para mejorar la recuperación de petróleo y para la fabricación de etanol celulósico (Gray *et al.*, 2006). Se han desarrollado numerosas estrategias para mejorar la termoestabilidad de las proteínas, las cuales siguen tres enfoques, estos son: el diseño racional, la evolución dirigida y el diseño semirracional (Basheer *et al.*, 2017; Teng *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2015). La elección de la estrategia dependerá tanto de la disponibilidad de un método robusto de cribado, como de la información sobre la estructura y función de la enzima (Lutz, 2010). A grandes rasgos, la ingeniería de mejora de las propiedades de una enzima sigue tres pasos: primeramente, se definen los cambios a realizar en la proteína, utilizando para ello alguna de las estrategias de ingeniería, seguidamente, se realizan los cambios propuestos (mutagénesis), para finalmente, evaluar las variantes de proteínas y así seleccionar los mutantes con mejores propiedades (Kazlauskas *et al.*, 2009).

#### **5.4.1. Ingeniería de proteínas: evolución dirigida**

La evolución dirigida, propuesta por H. Arnold en la década de 1990, imita el proceso de evolución natural; así, esta estrategia comprende la diversificación genética, el cribado y la selección de mutantes valiosos a partir de un gran número de bibliotecas de mutantes (Chen *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1997). La técnica PCR propensa a error (epPCR), cardinal en el marco de la evolución dirigida, es un

procedimiento altamente efectivo para generar mutantes con termoestabilidad mejorada (Xu *et al.*, 2020b). En esta, durante el proceso de replicación una ADN polimerasa modificada inserta mutaciones aleatorias en el gen de interés (Cirino *et al.*, 2003; Tizei *et al.*, 2016). De ahí, que el ejercicio de la evolución dirigida tenga un carácter *quid pro quo*, ya que si bien, para su ejecución no es necesario un conocimiento previo de la estructura y función de la enzima blanco, ni de las diferentes sustituciones de aminoácidos generadas (Sharma *et al.*, 2019), esta estrategia tiene como principal inconveniente que ante el gran número de colonias mutantes generadas (normalmente N104) (Teng *et al.*, 2019), se requiere un método potente de cribado y selección de los mutantes con las características deseadas, lo que lo hace lento y costoso (Khan *et al.*, 2019). Además existen algunas limitaciones en la construcción de bibliotecas de mutantes muy diversas, tal es el caso de la frecuencia mutagénica que es comúnmente baja, la redundancia del código genético y los "puntos calientes" mutagénicos causados por la propensión de las polimerasas (Packer *et al.*, 2015).

El diseño racional debe guiarse, obligatoriamente, por información estructural detallada que aún puede no estar disponible a todas las enzimas (Xu *et al.*, 2020b). De esta manera, la evolución dirigida podría aplicarse a las proteínas que carecen de investigación sobre su estructura, además la efectividad de esta estrategia ha garantizado su popularidad, aun cuando la ingeniería computacionalmente asistida juega un papel importante en la termoestabilización de enzimas. En este sentido, la ingeniería enzimática a través de la evolución dirigida, aunque no ha sido aplicada en sacarosa isomerasas, ha permitido mejorar con éxito la termoestabilidad de enzimas GH13 como: la  $\alpha$ -glucosidasa de *Thermus thermophilus* TC11 (Zhou *et al.*, 2015) y la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Huang *et al.*, 2019).

#### 5.4.2. Ingeniería de proteínas: diseño semirracional

El uso de la estructura primaria de una proteína para predecir parámetros bioquímicos y biofísicos, es un campo de investigación muy atractivo, pues, la información disponible sobre la secuencia genómica crece mucho más rápido que los datos estructurales o bioquímicos (Peng *et al.*, 2019). Es por ello que el diseño semirracional se ha proyectado como una estrategia muy atractiva, en la cual se combinan la evolución dirigida y el diseño racional. Precisamente, esta combinación permite reducir el tamaño de las bibliotecas de mutantes (Sharma *et al.*, 2019), además, la consideración de la variabilidad evolutiva, las características mecánicas y las limitaciones topológicas para la identificación de aminoácidos puede dar como resultado que las bibliotecas tengan un mayor contenido funcional (Ali *et al.*, 2020).

#### 5.4.3. Ingeniería de proteínas: diseño racional

El diseño racional se basa en la comprensión de la relación entre la estructura y la función de una proteína (Chen *et al.*, 2019), a partir de esta relación, se introducen cambios precisos en la secuencia de aminoácidos mediante mutagénesis dirigida al sitio (Sharma *et al.*, 2019). En este sentido, el diseño racional y la comprensión de la relación estructura-función, han evolucionado sinérgicamente, abriendo así nuevas perspectivas para la modulación de la función enzimática y la predicción de *novo* (Steiner *et al.*, 2012). Estas características brindan al diseño racional la potencialidad de reducir de manera drástica el tamaño de la biblioteca de mutantes y los costos asociados al cribado (Xu *et al.*, 2020b).

En los últimos años, con el desarrollo de la bioinformática se han desarrollado numerosos algoritmos y herramientas computacionales que permiten monitorear regiones flexibles en las moléculas proteicas, así como predecir la termoestabilización (Li *et al.*, 2018a; Liu *et al.*, 2019). Precisamente, el diseño racional asistido por computadora es una alternativa atractiva que permite acelerar el proceso de ingeniería enzimática (Bashirova *et al.*, 2019). Comúnmente, en la

estabilización *in silico* de enzimas se siguen estrategias como: comparación con secuencias homólogas con mayor termoestabilidad (Cui *et al.*, 2022), análisis del factor B (Chen *et al.*, 2015; He *et al.*, 2019), simulaciones de dinámica molecular (MD) (Chen *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020b), análisis de redes de restricciones (CNA) (Krüger *et al.*, 2013), diseño de enlaces disulfuro (DSB) (Ban *et al.*, 2023; Bashirova *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021b), ingeniería de sitios de glicosilación (Han *et al.*, 2020), diseño de puentes salinos estabilizadores basados en la secuencia y estructura de las enzimas (Vicente *et al.*, 2020) y cálculos para minimizar una energía efectiva que imita la energía libre de Gibbs (Modarres *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2019). Durante la aplicación de estas estrategias, las sustituciones realizadas no deben pertenecer a un centro de estabilización o la cavidad del sitio activo, así, frecuentemente las mutaciones se observan en regiones de bucles o regiones superficiales expuestas (Farnoosh *et al.*, 2020a; Pang *et al.*, 2020).

Uno de los métodos de diseño racional, vinculado a la primera etapa de ingeniería de proteínas, es la mutagénesis dirigida basada en el factor B (Parthasarathy *et al.*, 2000). Donde, los valores B representan perfiles de densidad de electrones alrededor de sus posiciones de equilibrio, de manera que, en el análisis de la estructura tridimensional de una proteína estos pueden ser interpretados como una medida de la entropía y flexibilidad de los residuos aminoacídicos (Parthasarathy *et al.*, 2000). El diseño racional basado en el factor B consta de dos pasos. Primero, los sitios apropiados en los que debe aumentarse la rigidez se eligen sobre la base de los parámetros de desplazamiento atómico obtenidos de los datos estructurales de rayos X. Luego, los sitios seleccionados se sustituyen por otros aminoácidos, para los que según el modelado computacional se predice mayor rigidez (Rosetta Design); o se someten a mutagénesis de saturación (Duan *et al.*, 2016).

Si se analizan los trabajos reportados por Xie *et al.* (2014), Han *et al.* (2019a), He *et al.* (2019) o Duan *et al.* (2016), se podría concluir que la metodología del factor



B establece una estrategia sencilla para identificar residuos flexibles. Sin embargo, siguiendo la lógica del diseño racional, la selección de residuos potencialmente termoestabilizantes debería estar sustentada por el análisis *in silico* del mejoramiento de las redes de puentes de hidrógeno (Teng *et al.*, 2019), de puentes salinos (Vicente *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020b), interacciones entre grupos aromáticos (Pongpamorn *et al.*, 2019) y modificaciones postraduccionales como los puentes disulfuro (He *et al.*, 2019) y la glicosilación de la molécula (Han *et al.*, 2020). De esta manera, la termoestabilización de una enzima debería estar guiada por una estrategia integradora que involucre tanto los datos cristalográficos (estructura) y mecanismo de catálisis (función), como las predicciones *in silico* y la selección de un hospedero adecuado.

#### **5.4.4. Ingeniería de proteínas: caracterización de la termoestabilidad**

Frecuentemente, la termoestabilidad de una enzima es caracterizada mediante la cuantificación de los parámetros físicos: temperatura óptima ( $T_{op}$ ) y rango de actividad asociado (Zheng *et al.*, 2019a), temperatura de punto de fusión ( $T_m$ ) (Maenpuen *et al.*, 2020), la  $T_{50x}$  y el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) (Ban *et al.*, 2020).  $T_m$  caracteriza el desdoblamiento irreversible de la estructura secundaria o terciaria de las proteínas, siendo uno de los parámetros más informativos de la termoestabilidad (Xu *et al.*, 2020a). Por otro lado,  $T_{50x}$  representa la temperatura a la que se retiene la mitad de la actividad residual después de un tiempo “x” (min), este parámetro es un indicador de la desactivación dependiente de la temperatura. El parámetro  $t_{1/2}$  representa el tiempo para el cual la enzima retiene la mitad de su actividad residual a una temperatura determinada, por tanto es un parámetro cinético de estabilidad (Zheng *et al.*, 2019a).

#### **5.4.5. Ingeniería de proteínas de sacarosa isomerasas**

Los objetivos de ingeniería de proteínas de sacarosa isomerasas se han enfocado en tres aspectos: mejorar la termoestabilidad de la enzima, incrementar la actividad de la enzima y aumentar la razón de producción de isomaltulosa (Tabla

III). Así, Zhang *et al.* (2002) enfocó la mejora de la termoestabilidad en la identificación de sitios potenciales para la sustitución de prolina. Pues, es conocido que la presencia de prolina en la segunda posición de un  $\beta$ -giro hace que una proteína sea más estable al disminuir su entropía (Suzuki, 1989; Suzuki *et al.*, 1987); este concepto se ha aplicado ampliamente para mejorar la termoestabilidad en  $\alpha$ -amilasas (Igarashi *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1987). Zhang *et al.* (2002) seleccionó los residuos, Arg<sup>310</sup> y Glu<sup>498</sup>, para la sustitución con Pro. Como resultado de las mutaciones, la temperatura óptima de Pall fue incrementada de 35 °C a 40 y 45 °C para Pall:Glu<sup>498</sup>Pro y Pall:Glu<sup>498</sup>Pro/Arg<sup>310</sup>Pro, respectivamente. Las vidas medias de Pall, Pall:Glu<sup>498</sup>Pro y Pall:Glu<sup>498</sup>Pro/Arg<sup>310</sup>Pro fueron 1.81, 9.45 y 13.61 min a 50 °C, respectivamente. De esta manera, la vida media de Pall:Glu<sup>498</sup>Pro/Arg<sup>310</sup>Pro a 50 °C fue aproximadamente 11 veces superior a la de Pall. Asimismo, para mejorar la estabilidad de la isoforma de *S. plymuthica* AS9, Duan *et al.* (2016) identificó residuos de aminoácidos con elevados factores B, a los que se aplicó mutagénesis dirigida al sitio. Los mutantes E<sup>175</sup>N, K<sup>576</sup>D y E<sup>175</sup>N/K<sup>576</sup>D se diseñaron empleando la base de datos Rosetta Design. Como resultado de la mejora de la termoestabilidad, los mutantes presentaron una temperatura óptima ligeramente aumentada (35 °C), en comparación con la de la enzima silvestre (30 °C). La vida media de los mutantes E<sup>175</sup>N, K<sup>576</sup>D y E<sup>175</sup>N/K<sup>576</sup>D fue 2.30, 1.78 y 7.65 veces mayor que la de la enzima silvestre a 45 °C, respectivamente.

**Tabla III.** Características de las sacarosa isomerasas mutantes con termoestabilidad mejorada.

Isoforma	Modificación	Estrategia seguida	Interacciones termoestabilizantes	T <sub>op</sub> (°C)	Vida media (min)	Actividad específica (U/mg)	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (mM <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	Referencia
Recombinante Pall AS9	N.M.			30	39.2 <sup>a</sup>	957.5	30.1	33	
Recombinante Pall AS9	E175N	Metodología del factor B	Fortalecimiento de la red de puentes de hidrógeno	35	90.2 <sup>a</sup>	1017.6	28.1	45.6	(Duan <i>et al.</i> , 2016)
Recombinante Pall AS9	K576D			35	69.8 <sup>a</sup>	1045.7	29.5	34.4	
Recombinante Pall AS9	E175N/K576D			35	300 <sup>a</sup>	1218.9	26.8	39.4	
Recombinante Pall LX3	N.M.			35	1.81 <sup>b</sup>	328	54.6	0.27	
Recombinante Pall LX3	E498P	Teoría de sustitución por Pro	Estabilización de bucle	40	9.45 <sup>b</sup>	350	NR	0.29	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
Recombinante Pall LX3	E498P/R310P			40	13.61 <sup>b</sup>	340	NR	0.31	

N.M.: no mutada.

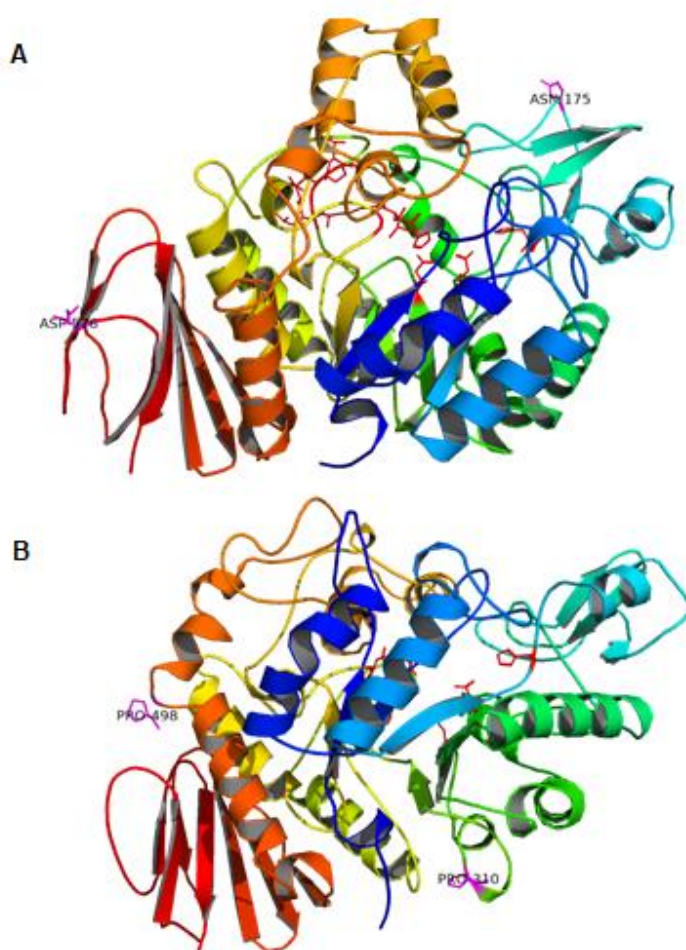
<sup>a</sup> Las enzimas se incubaron en tampón de ácido cítrico-fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0) a 45 °C.

<sup>b</sup> Las enzimas se incubaron en tampón citrato-fosfato 0.1 M (pH 6.0) a 50 °C.

Las estrategias trazadas por Zhang *et al.* (2002) y Duan *et al.* (2016) no tenían como fin mejorar las enzimas desde el punto de vista cinético. No obstante (Tabla III), según el reporte de Zhang *et al.* (2002), en comparación con Pall, la actividad específica máxima aumentó un 7% para Pall:Glu<sup>498</sup>Pro y un 16% para Pall:Glu<sup>498</sup>Pro/Arg<sup>310</sup>Pro. Por su parte Duan *et al.* (2016) informa que respecto a la Pall AS9, los valores de  $K_m$  para los mutantes E<sup>175</sup>N, K<sup>576</sup>D y E<sup>175</sup>N/K<sup>576</sup>D disminuyeron en 6.6%, 2.0% y 11.0%, respectivamente, y sus valores de eficiencia catalítica aumentaron en 38.2%, 4.2% y 19.4%, respectivamente. Asimismo, los mutantes mostraron un aumento de actividad del 20.3% hasta el 25.3%. Atendiendo a esto, Liu *et al.* (2021) mejoró la actividad enzimática de la isoforma *Raoultella terrigena* usando una estrategia de optimización de la estabilidad térmica. Para esto emplearon la herramienta Hotspot Wizard (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard/>) (Bendl *et al.*, 2016), la cual permitió identificar puntos calientes mediante el alineamiento múltiple de secuencias. Respecto a la Pall-2 silvestre, las actividades enzimáticas de los mutantes N<sup>498</sup>P y Q<sup>275</sup>R aumentaron un 89.2% y un 42.2%, respectivamente, mientras las eficiencias de producción de isomaltulosa de los mutantes Y<sup>246</sup>L, H<sup>287</sup>R y H<sup>481</sup>P mejoraron hasta un 89.1% 90.7% y 92.4%, respectivamente.

Al analizar conjuntamente los reportes de Zhang *et al.* (2002) y Duan *et al.* (2016), resultan destacables las siguientes semblanzas. Primeramente, que los sitios de mutación (residuos sustituidos) se encontraban en la periferia (superficie) de las moléculas (Figura 10), lo que indudablemente está asociado a que esta región es la más susceptible a los cambios en el microambiente de la enzima y en gran medida, de su estabilidad dependerá la rigidez en las regiones más interiores de la molécula. También, como se observa en la Figura 10, los sitios blanco correspondieron a regiones de bucle (carentes de conformación  $\alpha$ -hélice o lámina  $\beta$ ) o la transición entre un bucle y una lámina  $\beta$ , caracterizándose dichas regiones por una mayor flexibilidad. Al encontrarse los sitios de mutación alejados del sitio activo, al parecer, las implicaciones sobre la cinética enzimática fueron mínimas y

positivas. Por último, el cambio observado en el valor óptimo de temperatura fue de solo 5 °C, aun así, el desempeño a temperaturas superiores a la óptima es mejorado, por ejemplo, en los datos de Duan *et al.* (2016) se observa un incremento de un 10% en la actividad (a 50 °C) del mutante E<sup>175</sup>N/K<sup>576</sup>D respecto a la enzima nativa, mientras en los de Zhang *et al.* (2002) se observa que la actividad (a 60 °C) del mutante Glu<sup>498</sup>Pro/Arg<sup>310</sup>Pro es 4 veces superior a la de la enzima nativa.



**Figura 10.** Modelos tridimensionales de las sacarosa isomerasas AS9 Pall (A) y Pall (B) construidos a partir de los datos reportados por Duan *et al.* (2016) y Zhang *et al.* (2002), respectivamente. En ambos modelos los residuos asociados a la actividad catalítica se muestran como estructuras lineales en color rojo, mientras los sitios mutados se muestran como estructuras lineales en color magenta.

Finalmente, Lee *et al.* (2008) enfocó sus acciones a la modificación del sitio de unión de la fructosa (<sup>325</sup>RLDRD<sup>329</sup>) en la sacarosa isomerasa de *Protaminobacter rubrum*. Para las mutaciones fueron seleccionados los residuos Arg<sup>325</sup> y Arg<sup>328</sup> los cuales se encuentran muy próximos al fructosil formado como resultado de la hidrólisis de la sacarosa, además estos residuos se encuentran cargados positivamente y poseen largas cadenas laterales, lo que permitió la interacción con el O6 de la fructosa mediante un puente de hidrógeno. Los mutantes diseñados fueron: Arg<sup>325</sup>Asp, Arg<sup>325</sup>Ala, Arg<sup>325</sup>Gln, Arg<sup>325</sup>Lys, Arg<sup>328</sup>Asp, Arg<sup>328</sup>Ala, Arg<sup>328</sup>Gln y Arg<sup>328</sup>Lys; estas mutaciones redujeron la producción de isomaltulosa y aumentaron ligeramente la producción de trehalulosa. Además, las nuevas interacciones, entre los residuos mutados y el fructosil, parecen haber alterado la afinidad de unión del sitio. En todos los casos se produjo una considerable disminución de la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ), siendo este valor entre un 16 a un 2.5% de su valor original. Lee *et al.* (2008), justifica estos resultados mediante los cambios en la variación de energía libre del estado transicional, la polaridad e hidrofobicidad de los residuos mutados y la distancia entre el fructosil y los correspondientes residuos. Sin embargo, no se analiza el posible efecto de la sustitución de Arg<sup>325</sup>His y Arg<sup>328</sup>His, teniendo en cuenta que la His es un aminoácido cargado positivamente a pH 7.0. Tampoco se analiza el efecto de mutaciones en residuos próximos al sitio de unión a la fructosa que impliquen la disminución de la distancia del fructosil a los residuos Arg<sup>325</sup> y Arg<sup>328</sup>.

### **5.5. Expresión recombinante de sacarosa isomerasas**

Con anterioridad se planteó que el último paso en la implementación de la ingeniería de proteínas era la evaluación de las variantes diseñadas. Para ello es imprescindible poseer una fuente de obtención de la enzima Pall NX-5. En este sentido, la correcta selección de la célula huésped pasa necesariamente por la consideración de las características de la proteína de interés y de las variantes de organismos hospederos que actualmente se pueden encontrar.

Al analizar los trabajos de Zhang *et al.* (2002), Börnke *et al.* (2001), Wu *et al.* (2005), Aroonual *et al.* (2007), Lee *et al.* (2008), Watzlawick *et al.* (2009), Cha *et al.* (2009) y Li *et al.* (2011) se observa que comúnmente para la expresión recombinante de las isoformas de sacarosa isomerasas el sistema de expresión utilizado es *E. coli* (cepas DL21 (DE3) o DH5 $\alpha$ ), existiendo hasta la fecha solo los trabajos de Lee *et al.* (2011) y Castillo-Aragón (2017) como reportes de expresión de sacarosa isomerasa en un hospedero eucariota (*Saccharomyces cerevisiae* y *K. phaffii*). Comportamiento que debe estar asociado al hecho de que las isoformas de la enzima son nativamente producidas en organismos procariontes (Mu *et al.*, 2014), de esto se deduce la falta de necesidad de un procesamiento postraduccional más complejo como el que ofrecen los hospederos eucariotas.

#### **5.5.1. *Komagataella phaffii* como sistema de expresión**

*Komagataella phaffii* ha emergido como uno de los caballos de batalla de la biotecnología, pues más de 400 proteínas se han clonado y expresado mediante este sistema (Cereghino *et al.*, 2002; Cereghino *et al.*, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005). *K. phaffii* combina la capacidad de crecer en un medio mínimo a densidades celulares elevadas (Hong *et al.*, 2002), pudiendo utilizar el metanol como única fuente de carbono y energía (Beldarraín *et al.*, 2000; Cregg *et al.*, 2009). Asimismo, *K. phaffii* muestra preferencia por el metabolismo respiratorio en lugar del fermentativo, evitando la acumulación de metabolitos secundarios como el etanol y el ácido acético (Cereghino *et al.*, 2002). Además, lleva a cabo muchas de las modificaciones eucarióticas postraduccionales, tal es el caso del plegamiento de proteínas, el procesamiento proteolítico, la formación de enlaces disulfuro y la glicosilación (Bretthauer *et al.*, 1999; Cereghino *et al.*, 2000; Dębski *et al.*, 2004; White *et al.*, 1994). En este último aspecto, a diferencia de *S. cerevisiae*, *K. phaffii* se caracteriza por la ausencia de patrones hiperglicosilados en sus proteínas (Daly *et al.*, 2005; Macauley-Patrick *et al.*, 2005), lo que constituiría una ventaja para la expresión de recombinantes que en su forma nativa carecen de estas estructuras. Además, *K. phaffii* no contiene los ácidos

nucleicos potencialmente oncogénicos o virales presentes en las células de mamíferos, ni los pirógenos de la pared celular encontrados en *E. coli*, lo que en parte respalda el estado GRAS de esta levadura (Ciofalo *et al.*, 2006; Cregg *et al.*, 1993). Pero, probablemente la característica más importante de *K. phaffii* como microorganismo hospedero es la existencia de un promotor fuerte y estrechamente regulado para el gen alcohol oxidasa 1 (Cregg *et al.*, 2000).

Una de las características más atractivas de los sistemas de expresión basados en *K. phaffii* es la facilidad para obtener proteínas que se excretan en el medio de cultivo. Este beneficio se logra gracias a la presencia de péptidos señal que facilitan la translocación de las proteínas. Existen distintos tipos de péptidos señal, entre ellos los cotraduccionales, donde la preproteína se sintetiza simultáneamente con la translocación al retículo endoplásmico; y los postraduccionales, en los cuales la preproteína se sintetiza por completo y se libera de los ribosomas antes de su translocación en el retículo endoplásmico (Damasceno *et al.*, 2012). En la actualidad, uno de los péptidos señal más comúnmente utilizados es el factor  $\alpha$ -MF (alpha-mating factor, por sus siglas en inglés), este es un péptido postraduccionales que tiene su origen en la levadura levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Tanghe *et al.*, 2015). Se ha informado que la utilización de  $\alpha$ -MF como péptido señal puede resultar en la secreción de cantidades más significativas de una proteína recombinante en comparación con el uso de su péptido señal natural. La secuencia líder  $\alpha$ -MF está compuesta dos regiones: un pre-péptido que abarca 19 aminoácidos y un pro-péptido que abarca 67 aminoácidos (Daly *et al.*, 2005).

El procesamiento de la señal pre-pro MAT $\alpha$  ocurre en tres etapas principales. En la primera etapa, las peptidasas iniciales en el retículo endoplasmático eliminan la señal previa. Luego, en el aparato de Golgi, la endo-peptidasa Kex2 divide la secuencia pro-péptido entre la arginina C-terminal y la lisina. Finalmente, la proteína Ste13 corta de manera rápida las repeticiones de Glu-Ala (Lin-Cereghino *et al.*, 2013) Se plantea que el pro-péptido tiene la función de reducir la velocidad y



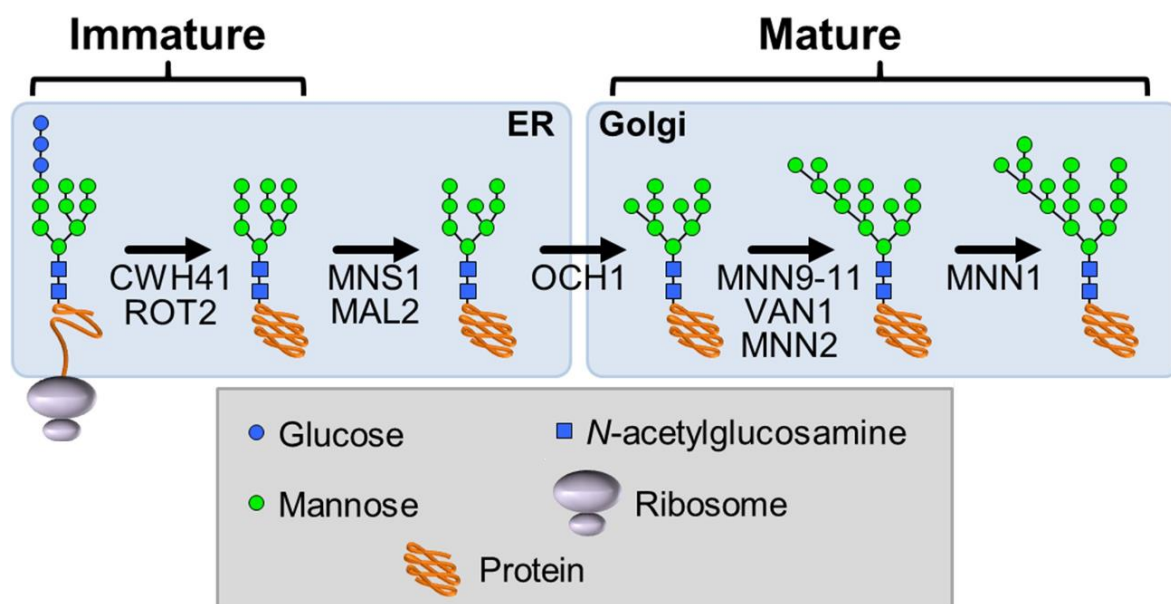
garantizar un plegamiento apropiado de la proteína completa antes y después de su translocación al retículo endoplasmático; así, que esta región desempeña el papel de una chaperona molecular para la proteína destinada a la secreción (Chahal *et al.*, 2017).

### 5.5.2. N-glicosilación de proteínas recombinantes

Actualmente no existen reportes de expresión de sacarosa isomerasas glicosiladas. Sin embargo, una eventual expresión (secretada) de esta enzima en *K. phaffii* (u otro hospedero eucariota) pudiera dar como resultado la obtención de una variante glicosilada de la enzima. La N-glicosilación es una de las modificaciones co- y post-traduccionales más comunes en eucariotas (Helenius *et al.*, 2004). Esta modificación ocurre (usualmente) en los residuos de asparagina dentro de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, donde X no puede ser prolina, porque la estructura del anillo pirrol de la prolina aumenta la rigidez de la cadena peptídica e inhibe la glicosilación (Gong *et al.*, 2014). En este sentido, Knauer *et al.* (1999) estima que entre el 70%-90% de la secuencias consenso presente en proteínas secretadas, presentan glicanos.

Como se muestra en la Figura 11, la N-glicosilación inicia cuando el precursor del oligosacárido ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) se transfiere, mediante la oligosacariltransferasa, a la secuencia consenso presente en el polipéptido naciente (Aebi *et al.*, 2010). Los N-glicanos de las proteínas son posteriormente procesados por una serie de glucosidasas y glicosiltransferasas en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Haltiwanger *et al.*, 2004). En las levaduras, los N-glicanos de las proteínas se procesan conformando estructuras ricas en manosa. No obstante, las formas completamente procesadas del N-glicano dependen de la especie (Wang *et al.*, 2018). Aunque para un microorganismo dado, el proceso de glicosilación puede estar influenciado por factores ambientales, como el tiempo de fermentación, nivel de expresión de glucosidasas/glicosiltransferasas y la composición del medio de cultivo (Villiger *et*

*al.*, 2016). Además, factores estructurales intrínsecos asociados a la proteína en formación, también influyen en el procesamiento y la maduración de los glicanos (Hang *et al.*, 2015). Por ejemplo, las características estructurales locales alrededor de cada sitio de N-glicosilación parecen afectar el acceso de las glicosidasas y las glicosiltransferasas, lo que conllevaría a una maduración específica de los N-glicanos (Sumer-Bayraktar *et al.*, 2011).



**Figura 11.** Representación esquemática de las vías de procesamiento de N-glicanos en levaduras (Varki *et al.*, 2015). ER: retículo endoplasmático. La definición de glicanos inmaduros y maduros se indica para cada recuadro. Los nombres de las enzimas siguen la nomenclatura de la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). Los símbolos de monosacáridos siguen el sistema SNFG.

Estudios como los de Ryu *et al.* (2009) y Maksimainen *et al.* (2011) indican una amplia interacción de los N-glicanos inmaduros con sus proteínas portadoras. Así, los residuos de glucosa en el extremo no reductor exhiben amplias interacciones con la superficie de la proteína (Nagae *et al.*, 2012). Inclusive, se han observado interacciones entre los glicanos y residuos ubicados a 30 Å de la Asn N-glicosilada (Joao *et al.*, 1992). De esta manera, la N-glicosilación podría tener efectos sobre la estabilidad (Gavel *et al.*, 1990; Han *et al.*, 2020), la actividad (He *et al.*, 2019) y la especificidad de una proteína (Trimble *et al.*, 2004).

## 5.6. Simulación de procesos químicos, SuperPro Designer®

Desde la década de 1980, los paquetes de cómputo y el lenguaje de programación han ejercido un impacto significativo en el campo de la Ingeniería de Procesos (Alnur *et al.*, 2013). En consecuencia, el empleo del modelado matemático y la simulación ha posibilitado la realización de actividades de carácter conceptual, tales como: el diseño, la evaluación de alternativas, la planificación y la implementación de la información generada (García Pérez, 2016). De esta manera, la simulación de procesos químicos ha contribuido a la reducción de las fases de desarrollo de productos, que comúnmente son prolongadas, así como a la disminución del costoso esfuerzo requerido en el escalado de procesos (Petrides *et al.*, 2002). Así, diversos sectores industriales como: la petroquímica (Mularski *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020a), la industria alimentaria (Kaur *et al.*, 2022), el tratamiento de residuos (Kim *et al.*, 2023) y la industria biotecnológica (Petrides *et al.*, 2014), han encontrado respaldo en el empleo de simuladores.

Entre los simuladores más ampliamente empleados se destacan Aspen Plus®, Aspen-Hysys®, el ChemCAD®, el Pro-SIM® y el SuperPro Designer®. Específicamente, el simulador profesional SuperPro Designer® ha sido diseñado de manera especializada para llevar a cabo la simulación de operaciones unitarias relacionadas con bioprocesos, permitiendo tanto operaciones continuas como por lotes (Athimulam *et al.*, 2006; Benítez-Cortés *et al.*, 2018; Petrides *et al.*, 2014). Además, este simulador cuenta con herramientas de cálculo específicamente diseñadas para procesos que involucran componentes biológicos (Benítez-Cortés *et al.*, 2018). Asimismo, SuperPro Designer® ofrece numerosas características avanzadas para la ejecución de balances de materia y energía. De igual forma, cuenta con una exhaustiva base de datos de componentes y mezclas químicas, equipos, recursos para dimensionamiento y costos de equipos, y un análisis detallado de la economía del proceso (Ernst *et al.*, 1997). Precisamente, este enfoque facilita la evaluación económica de un proceso en las primeras etapas de su desarrollo tecnológico, lo que permite identificar factores de rentabilidad



(Humphrey, 2006; Phan-Thien, 2011). En los últimos años, se ha empleado extensamente el software simulador SuperPro Designer® para simular diversas aplicaciones en industrias químicas, que abarcan desde la optimización económica y ambiental de la producción de ácido pirúvico utilizando *Escherichia coli* (Taraş *et al.*, 2011), hasta la simulación de la producción de diferentes anticuerpos monoclonales terapéuticos (García Pérez, 2016).

## VI. HIPÓTESIS

La aplicación de una estrategia integradora de termoestabilización de la sacarosa isomerasa Pall NX-5, permitirá obtener al menos una variante de la enzima con termoestabilidad y actividad enzimática mejorada, para temperaturas superiores a 40 °C.

## VII. OBJETIVOS

**Objetivo general:** Obtener sacarosa isomerasa Pall NX-5 apta para uso industrial mediante el incremento de su estabilidad a 40 °C, usando técnicas de ingeniería de proteínas.

**Objetivos específicos:**

1. Identificar los residuos aminoacídicos cuyas mutaciones permitan el incremento de la estabilidad de la Pall NX-5 ante la temperatura.
2. Producir variantes de la Pall NX-5 a partir de su expresión en la levadura *Komagataella phaffii* X33.
3. Evaluar los parámetros cinéticos de las variantes recombinantes de la Pall NX-5 expresadas en *Komagataella phaffii* X33.
4. Evaluar económicamente el uso de la Pall NX-5 mejorada mediante la simulación en SuperPro Designer de la producción de isomaltulosa a escala piloto.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Estrategia general de la investigación

En la Figura 12 se muestra de manera resumida las etapas y metodologías necesarias para la cumplimentación del presente proyecto. La primera etapa del proyecto se enfocó en el diseño de mutantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 mediante el cambio de aminoácidos específicos. Seguidamente, las regiones codificantes del gen *pall* silvestre y de los genes mutantes, fueron sintetizadas y clonadas en el plásmido pPICZ $\alpha$  A, para la transformación de células competentes de *K. phaffii* X33. En una segunda etapa se procedió a la evaluación y comparación de mutantes respecto a la enzima no mutada. Finalmente, se realizó una propuesta de proceso de obtención de isomaltulosa. En los siguientes acápites se presentan con detalle los pasos y elementos que componen la metodología del proyecto.

### 8.2. Diseño y construcción de mutantes

La estructura de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 se modeló utilizando el software Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) y la estructura cristalina 4hox (Xu *et al.*, 2013). Mediante el software B-FITTER se obtuvieron los valores B de los 600 residuos de aminoácidos que componen la enzima, a partir de los cuales se calculó el valor B medio de la molécula. Luego, se seleccionaron los residuos de aminoácidos cuyos factores B eran entre 2.5 y 3.5 veces el valor medio de la proteína. La selección de aminoácidos más rígidos se realizó mediante el servidor ROSETTA DESIGN (<http://rosettadesign.med.unc.edu>). Cada residuo seleccionado fue reemplazado por los 19 aminoácidos biológicos restantes. Usando el software PyMOL v2.5.5, se analizó la aparición de interacciones potenciales, que involucran residuos mutantes o su vecindad hasta 4 Å. Se utilizaron los softwares AutoDockTools-1.5.6 y AutoDock Vina para verificar la interacción enzima-sustrato y, por tanto, la potencial afinidad de las moléculas

mutantes hacia el sustrato. En el análisis de docking molecular al sitio catalítico se empleó la glucosa en lugar de la sacarosa, pues la glucosa es un inhibidor competitivo de la sacarosa. Se utilizaron parámetros de acoplamiento predeterminados. Los mutantes con las propiedades más prometedoras (*in silico*) se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida utilizando como punto de partida la proteína silvestre. La posible presencia de modificaciones postraduccionales que influyen en la termoestabilidad de la proteína diana se evaluó utilizando Prosite (<https://prosite.expasy.org/>) (De Castro *et al.*, 2006).

### 8.3. Cepas, vector y materiales

Las secuencias de nucleótidos (optimizadas) de las regiones codificantes de las variantes del gen *pall* se obtuvieron usando las estructuras primarias de las sacarosa isomerasas Pall NX-5 silvestre y mutantes. Para esto se empleó la herramienta Reverse Translate de Sequence Manipulation Suite (<https://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>) (Stothard, 2000) y los codones de uso de *K. phaffii*. Para eliminar los sitios de restricción no deseados, las secuencias mutantes y silvestre del gen *pall* NX-5 se sometieron a mutaciones puntuales silenciosas. Estos genes fueron flanqueados por sitios de restricción para *EcoRI* (extremo 5') y *SaI* (extremo 3'), luego se sintetizaron y clonaron en el plásmido pPICZ $\alpha$  A (Invitrogen<sup>®</sup>), generando los plásmidos pSINX5n (que contiene el gen silvestre), pSINX5 L202E (que contiene el gen que codifica para el mutante L202E), pSINX5 K174Q (que contiene el gen que codifica para el mutante K174Q) y pSINX5 K174Q-L202E (que contiene el gen que codifica para el doble mutante). Para las construcciones pSINX5n, pSINX5 L202, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E, la expresión de los genes de interés está bajo el control del promotor del gen *AOX1* (Alcohol Oxidasa 1). Además, las construcciones contienen un gen (*BleoR*) que confiere resistencia a la zeocina (marcador de selección), un péptido señal  $\alpha$ F de *Saccharomyces cerevisiae* que permite la secreción de proteínas en el medio, un origen de replicación bacteriano y una secuencia codificante para una etiqueta de seis His.

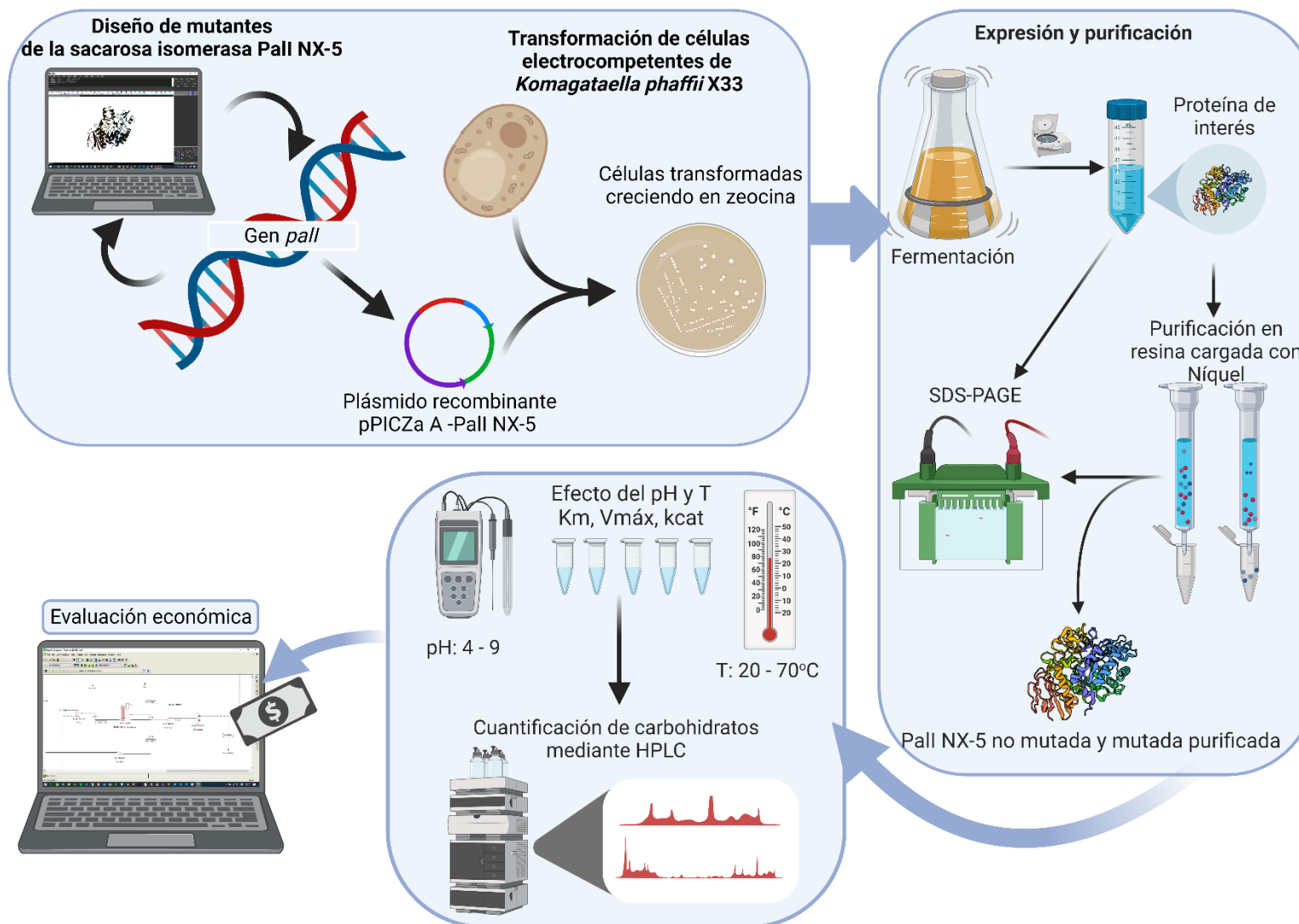


Figura 12. Diagrama resumen de la metodología seguida para la cumplimentación de los objetivos del proyecto.



#### 8.4. Transformación genética de *E. coli* DH5 $\alpha$ para la conservación y propagación de plásmidos

Para realizar la transformación genética se siguió el protocolo reportado por Hoisington *et al.* (1998). Se prepararon células químicamente competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad CA, EUA). Las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  fueron preparadas inoculando 5 mL de medio de cultivo LB (10.0 g·L<sup>-1</sup> de triptona, 5.0 g·L<sup>-1</sup> de extracto de levadura y 10 g·L<sup>-1</sup> de NaCl). El cultivo se incubó 15 h a 37 °C. Posteriormente, 1 mL del cultivo inicial fue utilizado para inocular 100 mL de medio LB. El nuevo cultivo fue incubado a 37 °C con agitación constante (250 rpm) hasta obtener una densidad óptica de 0.35-0.4 (DO<sub>600</sub>). Seguidamente, el cultivo se colocó en tubos Falcon<sup>®</sup> de 50 mL previamente fríos (4 °C) y se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue decantado y la pastilla fue resuspendida en 10 mL de MgCl<sub>2</sub> 100 mM frío, para luego ser centrifugada a 3000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue decantado y la pastilla resuspendida en 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM; la suspensión se colocó en hielo por 20 min. La suspensión fue centrifugada a 3000 rpm por 15 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 85 mM, 15% glicerol, la suspensión fue centrifugada nuevamente a 2100 rpm por 15 min a 4 °C. Finalmente, el sobrenadante fue retirado y la pastilla se resuspendió en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 85 mM, 15% glicerol (DO<sub>600</sub> de células ~200-250). 50  $\mu$ L de células competentes fueron colocadas en microtubos de 1.5 mL y congeladas a -80 °C.

La transformación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  fue realizada por choque térmico. 100 ng de ADN plasmídico fueron colocados en 50  $\mu$ L de células competentes mezcladas y colocadas en hielo por 15 min. Posteriormente, las células fueron sometidas a choque térmico a 42 °C por un minuto y colocadas en hielo por 5 min; luego, se le adicionaron 500  $\mu$ l de medio LB a la transformación y se colocó en agitación a 37 °C por una hora. Transcurrido este periodo, las células fueron sometidas a centrifugación a 13200 rpm durante 20 s y se descartaron 400  $\mu$ L de

medio, los 150  $\mu\text{L}$  restantes fueron colocados en caja Petri con medio LB suplementado con zeocina ( $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 16 h.

### **8.5. Aislamiento de ADN plasmídico (Miniprep)**

Tal como describe Bimboim *et al.* (1979), el ADN plasmídico fue extraído de *E. coli* DH5 $\alpha$  por el método de lisis alcalina. Los cultivos bacterianos fueron incubados en placas LB suplementadas con zeocina ( $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 16 h. Las células cultivadas fueron colectadas y resuspendidas en 70  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril, posteriormente se adicionaron 350  $\mu\text{L}$  de TENS (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 M NaOH, 0.5% SDS), la solución se mezcló por inversión de tubo y se reposó por 3 min, después de los cuales se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3.0 M pH 5.2 y mezclados suavemente por inversión, y colocados en hielo 5 min para precipitar proteínas y ADN cromosomal. Posteriormente se centrifugó a 13200 rpm durante 5 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , el sobrenadante fue recuperado en un microtubo de 1.5 mL para luego ser resuspendido con 700  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y centrifugado a 13200 rpm durante 10 min. El ADN precipitado fue lavado con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se dejó evaporar a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN fue resuspendido con 20  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril y posteriormente cuantificado y almacenado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### **8.6. Caracterización y preparación de ADN plasmídico para la transformación genética de *Komagataella phaffii* X33**

Para comprobar que el ADN plasmídico extraído luego de la transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$  perteneció potencialmente a las construcciones pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E; se realizaron cortes con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SaI*. Las mezclas de reacción se muestran en la Tabla IV. Las reacciones se dejaron incubando a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 4 h. La linearización del ADN plasmídico se realizó con la enzima *SacI* durante 24 h a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . El ADN cortado fue concentrado con dos volúmenes de etanol absoluto y resuspendido finalmente en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  inyectable y almacenado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Los fragmentos obtenidos fueron observados y cuantificados mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El resultado se observó en el fotodocumentador Kodak DC290.

**Tabla IV.** Mezcla de reacción de las digestiones enzimáticas con *EcoRI/SaI* y la linearización de las construcciones pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E con *SacI*.

Reactivo	Corte con <i>EcoRI/SaI</i> Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Linearización Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua estéril libre de nucleasas	17	18
Buffer CutSmart (10X)	2	-
Buffer <i>SacI</i> 10X (Thermo Scientific™)	-	2
Enzima <i>EcoRI</i> (Thermo Scientific™, 10 U/ $\mu\text{L}$ )	1	-
Enzima <i>SaI</i> (Thermo Scientific™, 10 U/ $\mu\text{L}$ )	1	-
Enzima <i>SacI</i> (Thermo Scientific™, 10 U/ $\mu\text{L}$ )	-	1
ADN*	4	4
Volumen total	25	25

ADN\*: pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E.

### 8.7. Preparación de células electrocompetentes de *Komagataella phaffii* para su transformación genética

Acorde con Cregg *et al.* (1998), para la preparación de células electrocompetentes se inocularon 10 mL de medio YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Dextrosa 2%) en un tubo Falcon® de 50 mL con 100  $\mu\text{L}$  de *K. phaffii* X33 y se incubó a 250 rpm a 30 °C hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600}$  de 6. A partir del cultivo anterior, se inocularon 100 mL de medio YPD (en un matraz de 500 mL) con 1.17 mL del cultivo, iniciando con una  $\text{DO}_{600}$  de 0.1. Se incubó a 30 °C y 250 rpm hasta que la  $\text{DO}_{600}$  llegó al valor de 1.0. Después, se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 5000 rpm y 4 °C por 5 min en dos tubos Falcon® de 50 mL, se descartó el sobrenadante y se resuspendió (mediante vortex) el paquete celular en 5 mL de medio YPD-HEPES (1M, pH 8.0). Se agregaron 125  $\mu\text{L}$  de dithiothreitol (DTT) 1M y se mezcló suavemente. Las células se incubaron durante 15 min a 30 °C. Transcurrido ese tiempo las células se lavaron con 20 mL de sorbitol 1M frío y

las células fueron recuperadas por centrifugación a 5000 rpm por 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y las células fueron lavadas nuevamente con 5 mL de sorbitol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) 1M frío y resuspendidas por vórtex, llevando el volumen a 25 mL con sorbitol 1M frío. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 5000 rpm por 5 min a 4 °C. Las células se resuspendieron en 1 mL de sorbitol 1M frío y fueron recuperadas por centrifugación a 5000 rpm por 5 min a 4 °C. Finalmente las células fueron resuspendidas en 0.5 mL de sorbitol 1M frío, luego alicuotadas en viales de 50 µL y almacenadas en hielo hasta su uso.

### **8.8. Transformación genética de *Komagataella phaffii* X33**

La transformación genética de *K. phaffii* fue llevada a cabo en un electroporador MicroPulser™ Electroporator (BIO-RAD®, Hercules CA, EUA). 500 ng de ADN linearizado con la enzima *SacI* fueron mezclados con 50 µL de células electrocompetentes y transferidos a una cubeta de electroporación (MicroPulser/Gene Pulser Cuvettes 0.2 cm gap BIO-RAD®, Hercules CA, EUA) previamente enfriada a -20 °C durante 4 h. Se utilizaron los parámetros preestablecidos por el electroporador para *K. phaffii* (voltaje 1500V, resistencia 200 Ω, capacitancia 25 mF) y se pulsó una vez. La cubeta fue removida de la cámara e inmediatamente se agregó 1 mL de YPD/sorbitol 1M frío y se transfirió el contenido de la cubeta a un microtubo de 1.5 mL estéril. Las células electroporadas fueron incubadas a 30 °C durante 2 h. Transcurrido ese tiempo las células fueron centrifugadas y se decantaron 800 µL de sobrenadante, el resto fue resuspendido e inoculado en placas YPD/sorbitol 1M suplementado con 200 µg·mL<sup>-1</sup> de zeocina. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 72-96 h hasta el crecimiento de colonias.

### **8.9. Extracción de ADN genómico y amplificación de genes de interés**

Para la extracción de ADN genómico se siguió la metodología propuesta por Lõoke *et al.* (2011). Las colonias que crecieron en presencia del agente de selección fueron cultivadas en 5 mL de medio YPD suplementado con 200 µg·mL<sup>-1</sup>

de zeocina. Seguidamente, 1 mL del cultivo se centrifugó a 5000 rpm por 5 min a 4 °C; se decantó el sobrenadante y se agregaron 200 µL de solución de acetato de litio (200 mM) – SDS (1%). Las células fueron resuspendidas mediante vórtex y la mezcla se incubó durante 10 min a 70 °C. Se agregaron 600 µL de etanol al 96% para la precipitación del ADN, las muestras se mezclaron mediante un vórtex breve y el ADN se recogió por centrifugación (15000 × *g*) durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 1000 µL de etanol al 70% y luego se resuspendió en 100 µL de agua inyectable para disolver el ADN. Los residuos se retiraron por centrifugación (15000 × *g* durante 1 min).

Las amplificaciones por PCR se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Iglesias-Figueroa (2019). Se utilizaron *primers* específicos para amplificar una región de 2561 pb, que incluye una parte del promotor *AOX1* hasta el terminador *AOX1*: Fw – 5'TCTATCGCTTCTGAACCCCG3' Rv – 5'GAAGCCTGCATCTCTCAGG3', bajo las siguientes condiciones: 2 min de desnaturalización a 94 °C, seguido por 35 ciclos de amplificación (45 s a 94 °C, 45 s a 58 °C, 1 min a 72 °C) y un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min.

### **8.10. Expresión y purificación de las variantes de la Pall NX-5**

Las clonas obtenidas fueron inoculadas en 20 mL de medio YPD suplementado con zeocina (200 µL/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas a 30 °C durante 12 h en agitación (250 rpm). Las células fueron recuperadas luego de 5 min de centrifugación a 5000 rpm y temperatura ambiente; posteriormente, fueron resuspendidas e incubadas a una DO<sub>600</sub> de 0.2 en medio de inducción BMMY (PBS 100 mmol/L-1 pH 6.5, 1% extracto de levadura (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 2% peptona (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 1.34% YNB Sigma-Aldrich, Missouri, EUA, 400 µg·L<sup>-1</sup> biotina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) y 0.5% metanol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Durante la etapa de inducción la temperatura se ajustó a 30 °C y la agitación a 250 rpm. La aplicación de metanol se realizó al

0.5% (v/v concentración final) cada 24 h, hasta que el cultivo alcanzó las 72 h (Jiang *et al.*, 2008).

Se añadió sulfato de amonio sólido (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) a los sobrenadantes del cultivo de levadura hasta una saturación del 60%. Las muestras se incubaron con agitación (100 rpm) durante 2 h a 4 °C. El precipitado activo se recogió mediante centrifugación a 10000 x g durante 30 min y se disolvió en PBS 1X (pH 7,4). Las muestras se dializaron frente a 1X PBS pH 7,4 durante 24 h a 4 °C y 100 rpm. Después de la diálisis, los extractos de proteínas se purificaron usando una resina cargada con Ni de alta afinidad. El proceso de purificación se llevó a cabo siguiendo la estrategia de purificación nativa propuesta en las instrucciones del fabricante (GenScript®, High Affinity Ni-Charged Resin FF, Protocol Version: 01, Cat No: L00666) para obtener variantes de sacarosa isomerasa Pall NX-5 purificadas. Además, siguiendo un enfoque por lotes, los extractos de proteína dializados se incubaron con la resina (Relación Extracto/Resina: 2.5/1) durante un período de 12 h a 4 °C y 100 rpm. El flujo a través de la columna estuvo dado por la acción de la gravedad.

### **8.11. Análisis de proteínas en un gel de acrilamida**

Se utilizó una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems (BIORAD, Hércules, CA, EUA); se colocaron en el soporte de preparación dos vidrios para electroforesis con una separación de 1 mm entre cada uno, previamente lavados con etanol al 70%. Se preparó el gel concentrador con H<sub>2</sub>O (2.9 mL), poliacrilamida (SigmaAldrich, Missouri, EUA) 30% (3.0mL), Tris (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) 1 M mL, SDS 10% (0.100 mL), APS (Bio Basic Inc, Canadá) 10% (0.100 mL) y TEMED (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) 6 µL. Una vez polimerizado se preparó el gel separador con H<sub>2</sub>O (2.85 mL), poliacrilamida al 30% (0.35mL), Tris 1 M pH=6.8 (0.570 mL), SDS 20% (0.020 mL), APS 10% (0.038 mL) y TEMED (5 µL). En un microtubo de 1.5 mL se colocaron 100 µg de cada muestra y se mezclaron en 10 µL de buffer de carga 4X (0.125 M Tris HCl (Sigma-Aldrich,

Missouri, EUA), 0.5 M pH 6.8, 20% glicerol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 0.715 M  $\beta$ - mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 0.005% azul de bromofenol (SigmaAldrich, Missouri, EUA) y 4% (p/v) SDS); las muestras se calentaron a ebullición durante 5 min y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min, después fueron cargadas en el gel (Laemmli, 1970). Se corrió el gel a 85 Volts durante 3 h. Transcurrido ese tiempo el gel fue retirado de la cámara y colocado en solución fijadora (500 mL metanol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 70 mL ácido acético glacial (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 430 mL de agua destilada) durante 15 min en agitación suave. Posteriormente, el gel fue teñido durante 1 h con solución de teñir (200 mL metanol, 265 mL dH<sub>2</sub>O, 35 mL ácido acético y 0.5 g azul de Coomassie R-250); transcurrido este tiempo el gel se colocó en solución de desteñir (200 mL metanol, 100 mL etanol, 50 mL ácido pH=8.8 (4.0 acético, 650 mL dH<sub>2</sub>O) durante 1 h. Los geles fueron visualizados y analizados en un fotodocumentador KODAK® Gel Logic 100 System (KODAK, NY, EUA). Para la determinación cualitativa de la presencia de glicoproteínas en el sobrenadante de *K. phaffii* X33 transformada con las variantes del gen *pall*, se empleó el Kit de Detección de glicoproteínas (Sigma-Aldrich, GLYCOPRO-1KT).

### **8.12. Ensayo de actividad de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5**

La actividad de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 se midió a 30 °C en tampón de ácido cítrico/fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0) que contenía sacarosa a una concentración final de 292 mM. Específicamente, se mezclaron 100  $\mu$ L de solución de enzima diluida con 400  $\mu$ L de solución de ensayo y se incubaron durante 15 min. La reacción se detuvo hirviendo la mezcla en un baño de agua a 100 °C durante 5 min (Zhang *et al.*, 2002). Posteriormente, se cuantificaron los contenidos de sacarosa, isomaltulosa, trehalulosa, glucosa y fructosa de la mezcla de ensayo utilizando un sistema de HPLC equipado con un detector de índice de refracción, como se describe a continuación. Una unidad de actividad de sacarosa isomerasa se definió como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol de isomaltulosa por minuto en las condiciones descritas anteriormente. Los ensayos

se realizaron por triplicado de manera que el resultado obtenido se reportó atendiendo a la nomenclatura *media ± desviación estándar*.

### 8.13. Efectos del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática

Para determinar el pH óptimo para la actividad enzimática, los ensayos se realizaron en tampones: ácido cítrico/fosfato de sodio (50 mM, pH 4.0 a 6.0), fosfato de sodio (50 mM, pH 6.0 a 8.0) o glicina-NaOH (50 mM, pH 8.0 a 9.0). La temperatura óptima se determinará entre 20 °C y 70 °C en tampón de ácido cítrico/fosfato de sodio (50 mM, pH 6.0), usando sacarosa 292 mM como sustrato.

Para analizar la estabilidad de la enzima, esta será incubada en tampón de ácido cítrico/fosfato de sodio (50 mM, pH 6.0) a una temperatura de 40 °C. Se extraeron alícuotas a diferentes tiempos de incubación y se midió su actividad residual a la temperatura óptima. La actividad inicial antes de la incubación se tomará como 100%. Los ensayos se realizarán por triplicado de manera que los resultados obtenidos se reportarán atendiendo a la nomenclatura *media ± desviación estándar* o mediante la representación gráfica de la desviación estándar en los perfiles de la actividad isomerasa y estabilidad.

### 8.14. Determinación de los parámetros cinéticos $V_{max}$ , $K_m$ y $k_{cat}$

Para determinar los parámetros cinéticos se midió la sacarosa isomerasa incubando la enzima purificada con diferentes concentraciones de sacarosa (110, 120, 135, 146, 190, 234, 292, 438, 584, 730, 876 y 1010 mM) en condiciones estándar de ensayo. Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  se determinaron mediante gráficos de Michaelis-Menten. Por su parte, el valor de la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) será determinado usando la ecuación 1, donde “E” representa la concentración de enzima presente en la reacción. Todos los parámetros cinéticos presentados en este estudio se determinaron por triplicado, y los resultados se expresaron usando la nomenclatura *media ± desviación estándar*.

$$V_{max} = k_{cat} \cdot E$$

**Ecuación 1**



### **8.15. Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de isomaltulosa**

Los volúmenes de reacción (5 mL) se incubaron durante 10 h a 35 °C en tampón de ácido cítrico/fosfato de sodio 50 mM (pH 6,0). Se evaluaron concentraciones de sacarosa de 300, 350, 400, 450 y 500 g·L<sup>-1</sup>. Se utilizaron 70 U de sacarosa isomerasa por gramo de sacarosa. Las reacciones se detuvieron hirviendo la mezcla en un baño de agua a 100 °C durante 5 min (Zhang *et al.*, 2002). Los ensayos se realizarán por triplicado de manera que los resultados obtenidos se reportarán atendiendo a la nomenclatura *media ± desviación estándar*. El rendimiento se expresó en g<sub>isomaltulosa</sub>·g<sup>-1</sup><sub>sacarosa</sub>.

### **8.16. Análisis de los productos de reacción mediante HPLC**

Los contenidos de sacarosa, isomaltulosa, trehalulosa, glucosa y fructosa de la mezcla de reacción fueron determinados por medio de la técnica HPLC (High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés). Se utilizó el equipo Agilent 1100 y la columna Zorbax NH2 analytical 4.6 x 250 mm 5 µm de Agilent®. Las condiciones de ensayo fueron, flujo: 0.8 mL/min, temperatura: 25 °C, fase móvil: acetonitrilo:agua (71:29). La concentración de los analitos se calculó mediante la comparación del área de sus respectivos picos, con los de los estándares.

### **8.17. Diseño, simulación y análisis económico de un proceso de producción de isomaltulosa**

La simulación del proceso de producción de isomaltulosa se realizó mediante el software SuperPro Designer® V10 (Intelligen, Inc., USA). Para la simulación y el análisis económico se siguieron los siguientes pasos: especificar el modo de operación, registrar componentes y mezclas que intervienen en el proceso, construir el diagrama de flujo del proceso, inicializar las operaciones unitarias, inicializar las corrientes de entrada, resolver los balances de materia y energía y

generar el informe de los resultados, clasificar las corrientes y los datos de costos asociados a los suministros, incluir la información económica de los equipos y materiales, realizar los cálculos económicos y generar el informe de los resultados.

El diagrama de flujo del proceso fue construido incluyendo los equipos principales y operaciones unitarias necesarias para la operación general. La producción de isomaltulosa se dividió en cuatro secciones principales: “Sección de fermentación”, “Sección de purificación” y “Reacción enzimática”. Seguidamente se describen los principios utilizados para desarrollar cada sección.

#### **8.17.1. Sección de fermentación**

La Sección de fermentación está conformada por el fermentador de producción. El crecimiento de *Komagataella phaffii* X33 (generación de biomasa), se simuló en modo discontinuo, a 30 °C, durante 24 h. Durante la fase de producción el microorganismo se cultivó aeróbicamente en un proceso *feed-batch* a 30 °C durante 72 h, expresando sacarosa isomerasa Pall NX-5 extracelularmente. El volumen efectivo del fermentador de producción fue de 30 L. Las transformaciones biológicas fundamentales que ocurren en el fermentador se modelaron utilizando la opción “Fermentación cinética discontinua” (*Batch Kinetics Fermentation*).

La formulación de un medio mínimo requiere de tres componentes básicos, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales. Así, las fuentes de carbono utilizadas fueron la glucosa (generación de biomasa) y el metanol (producción de la enzima), la fuente de nitrógeno fue el  $\text{NH}_4\text{OH}$ , mientras las sales representan una mezcla de minerales y otros componentes del medio necesarios para el crecimiento microbiano y la amortiguación del medio.

#### **8.17.2. Sección de purificación**

Se removió la biomasa presente en el sobrenadante mediante una filtración rotativa al vacío. El filtrado se recupera en un tanque de almacenamiento. Se

utilizan dos filtros de flujo cruzado, un microfiltro y un ultrafiltro, para purificar y concentrar la solución enzimática. El microfiltro funciona como un filtro de pulido que elimina las células residuales y los restos de células que no elimina el filtro de vacío giratorio. El permeado del microfiltro que contiene la enzima y los solutos se bombea al ultrafiltro. La membrana de ultrafiltración retiene la enzima, pero permite el paso del agua y de impurezas de moléculas pequeñas. El volumen de la solución se reduce por un factor de tres.

### **8.17.3. Reacción enzimática**

La transformación de sacarosa en isomaltulosa se simuló en un reactor enzimático de tipo tanque agitado operando en modo discontinuo. Las condiciones de operación del reactor, así como la composición de la mezcla producto de la reacción corresponden a las ensayadas en la sección “8.13”, “8.14” y “8.15”.

## IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1. Diseño de mutantes de sacarosa isomerasa Pall NX-5

#### 9.1.1. Identificación de residuos potenciales a ser sustituidos

No existe un procedimiento universal para la termoestabilización de una enzima (Dotsenko *et al.*, 2020; Teng *et al.*, 2019; Yin *et al.*, 2019). Sin embargo, en esta investigación, se trazó una estrategia integradora que combina diferentes principios que contribuyen a la termoestabilidad. Para ello se analizó el perfil del factor B de las estructuras cristalinas 4hox y 4how (Xu *et al.*, 2013) de la sacarosa isomerasa Pall NX-5. Así, se identificaron 19 residuos aminoacídicos con valores B entre 2.5 y 3.5 veces el promedio de la molécula (valor  $\bar{B}$ :16.5). Dichos residuos, fueron sujetos a sustituciones individuales empleando para ello el software ROSSETA DESING. En la Tabla V se muestran los 19 residuos identificados, así como sus sustituciones recomendadas, que potencialmente pudieran producir un incremento en la termoestabilidad de la sacarosa isomerasa Pall NX-5.

También se muestra en la Tabla V que, sin importar la polaridad del residuo nativo, las sustituciones recomendadas (cuando aplicaron) fueron en todos los casos aminoácidos polares repartidos de la siguiente manera, 60% por residuos neutros y el restante 40% residuos cargados. La prevalencia de residuos cargados entre proteínas termófilas y mesófilas ha sido un tema de interés para la elucidación de los factores que inciden en la termoestabilidad. Particularmente, Khan *et al.* (2019) observó que los motivos cargados (Residuos cargados > Glu > Residuos ácidos > Residuos básicos > Arg > Lys, abundancia relativa en ese orden) tenían mayor presencia en proteínas termófilas, que los aminoácidos pequeños (Residuos pequeños < Gln < Ser < Thr < Ala < Asn < Residuos polares, abundancia relativa en ese orden). Además, Chakravorty *et al.* (2017) afirma que los aminoácidos cargados están involucrados en la aparición de interacciones iónicas y la formación de puentes salinos, de ahí su contribución positiva a la

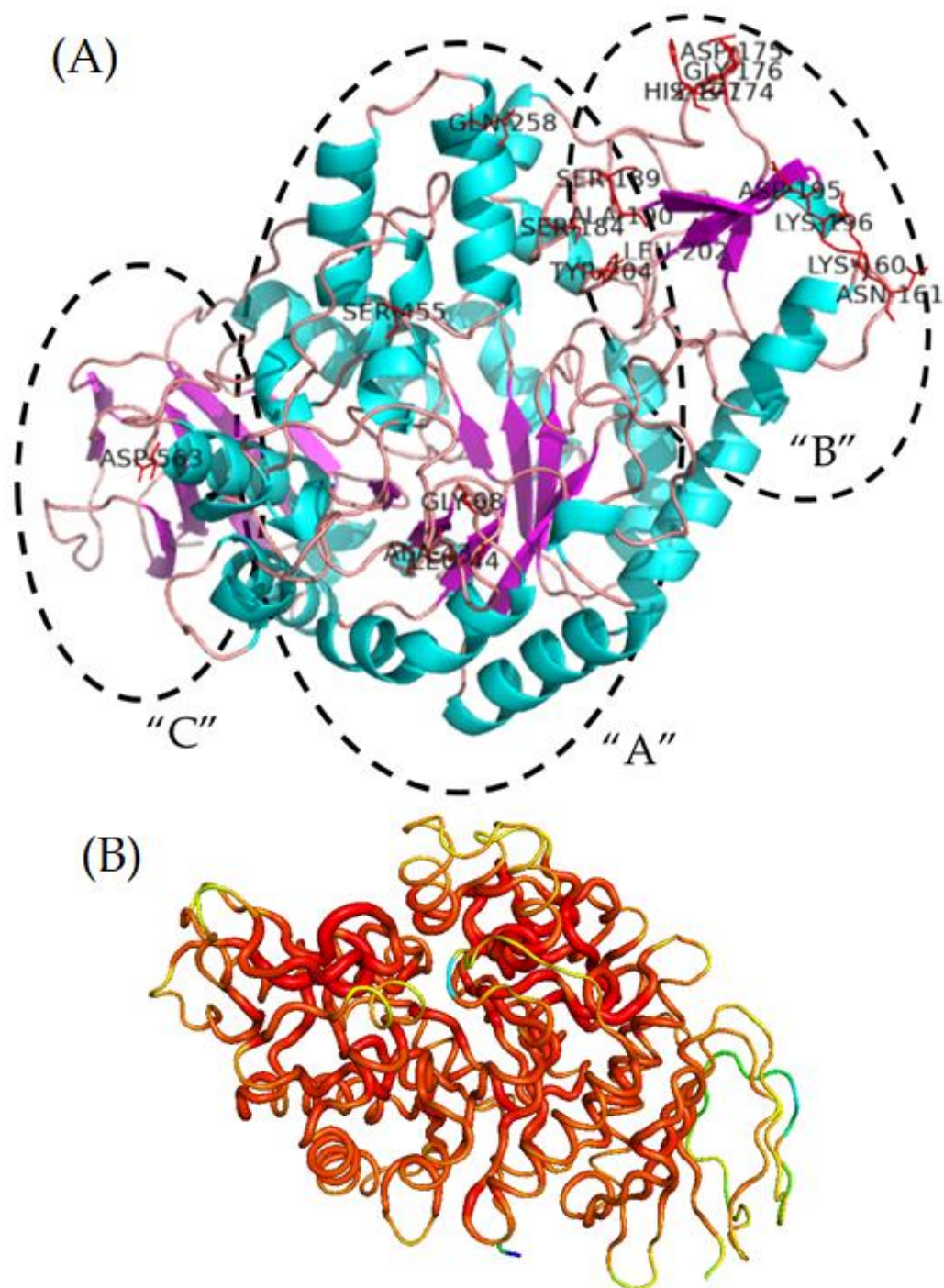
termoestabilidad. Asimismo, Wang *et al.* (2020b) confirmó el papel de los puentes salinos en la mejora de la estabilidad térmica de una variante de la enzima r27RCL de *Rhizopus chinensis*; precisamente, la aparición de un nuevo puente salino entre los residuos Glu<sup>292</sup> e His<sup>171</sup> del mutante m31, fue uno de los factores que condicionó la mejora de los parámetros indicadores de la termoestabilidad:  $t_{1/2}$ ,  $T_{op}$  y  $T_{50}$  (evaluada a los 30 min). Por su parte, Vicente *et al.* (2020) luego de implementar la sustitución Ser<sup>264</sup>Lys, hace referencia a la aparición de un nuevo puente salino (con el residuo Asp<sup>205</sup>) como interacción estabilizante en una variante de lacasa de alto potencial redox proveniente de hongos de pudrición blanca.

**Tabla V.** Residuos aminoacídicos con factores B entre 2.5 y 3.5 veces el valor promedio para la sacarosa isomerasa Pall NX-5 y sus sustituciones recomendadas por ROSETTA DESING. Los signos positivo o negativo hacen referencia a la polaridad de los residuos cargados.

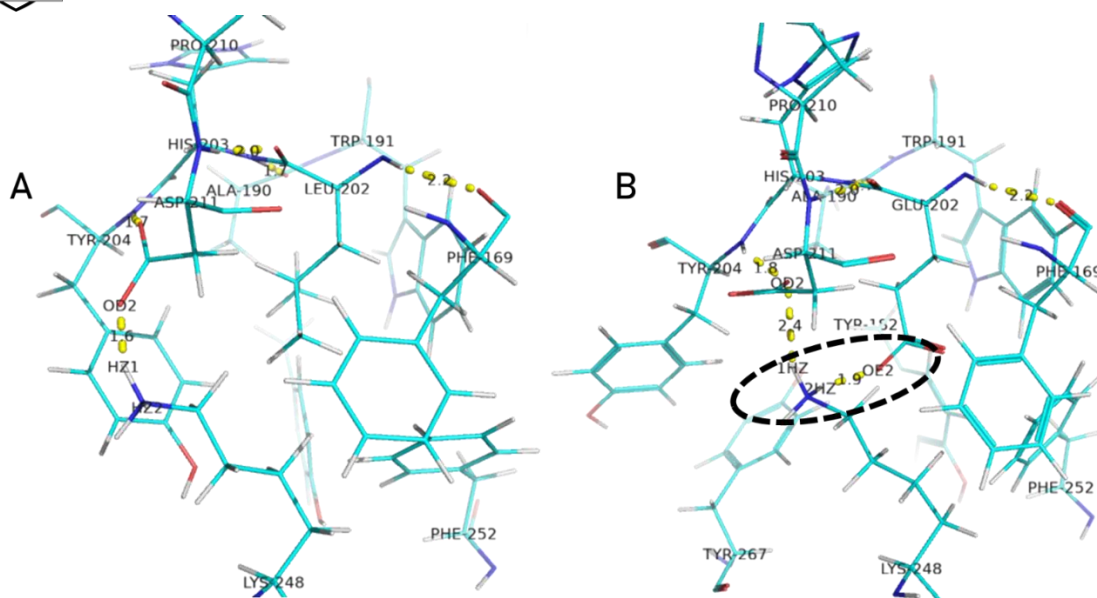
Número	Residuo	Posición	Factor B	Sustitución recomendada			Polaridad (Residuo nativo/Residuo mutante)
1	Ala	43	51.75	Gln	-	-	Apolar/Polar
2	Leu	44	44.22	Glu	-	-	Apolar/(-)
3	Gly	68	46.3	-	-	-	-
4	Lys	160	40.99	Ser	-	-	(+)/Polar
5	Asn	161	54.82	-	-	-	-
6	Lys	174	47.78	Asp	Gln	-	(+)/(-), Polar
7	Asp	175	57.48	Asn	-	-	(-)/Polar
8	Gly	176	48.44	-	-	-	-
9	His	177	55.34	Gln	-	-	(+)/Polar
10	Ser	184	45.26	Ala	-	-	Polar/Polar
11	Ser	189	44.3	-	-	-	-
12	Ala	190	48.14	-	-	-	-
13	Asp	195	46.54	Glu	-	-	(-)/(-)
14	Lys	196	52.49	Asn	-	-	(+)/Polar
15	Leu	202	45.68	Glu	-	-	Apolar/(-)
16	Tyr	204	47.06	His	Ser	Thr	Polar/(+), Polar, Polar
17	Gln	258	41.04	Asp	-	-	Polar/(-)
18	Ser	455	40.33	-	-	-	-
19	Asp	563	47.01	-	-	-	-

En la Figura 13A (en color rosa) se muestran las regiones en bucle, las cuales son estructuras secundarias no regulares que se caracterizan por poseer una elevada flexibilidad (Nestl *et al.*, 2014). Precisamente, la mayoría de los residuos potenciales a sustituir se encuentran en el dominio rico en bucles (Dominio B) o en regiones en bucle. Este comportamiento concuerda con lo que se esperaría según el perfil de factor B de la molécula (Figura 13B). En dicho perfil destacan tres regiones de la superficie de la molécula con presencia de bucles, estas son: los fragmentos de unión de las láminas  $\beta$  del dominio C (Residuos <sup>541</sup>GAE<sup>543</sup> y <sup>553</sup>EEVMHYTLPGDLSINKVITENNSHTIVNKNDRLR<sup>587</sup>), los fragmentos de unión de las  $\alpha$  hélices ubicados alrededor de la hendidura de entrada de la sacarosa al sitio catalítico (Residuos <sup>257</sup>QQQLK<sup>257</sup>, <sup>328</sup>RDADERWRRK<sup>337</sup>, <sup>419</sup>KKIDD<sup>423</sup> y <sup>433</sup>QDYVETGKVKAEFLQN<sup>450</sup>) y los bucles del dominio B (Residuos <sup>160</sup>KNNPYR<sup>166</sup>, <sup>171</sup>RDGKDG<sup>176</sup> y <sup>193</sup>KDDKSGQ<sup>199</sup>).

Una de las estrategias que aporta a la termoestabilidad de una proteína es la estabilización de bucles, ya sea, mediante el truncamiento de estas regiones (Farnoosh *et al.*, 2020b; Liu *et al.*, 2018), o la aplicación de mutagénesis dirigida al sitio para desarrollar mutaciones puntuales (Duan *et al.*, 2016). De manera particular, Duan *et al.* (2016) al termoestabilizar la sacarosa isomerasa AS9 Pall, observó que con la sustitución Lys<sup>576</sup>Glu se formó un nuevo puente de hidrógeno entre los residuos Asn<sup>574</sup> y Asn<sup>577</sup>. Este nuevo enlace de hidrógeno condujo a la reducción de la flexibilidad del bucle C-terminal, y la mejora de la estabilidad térmica de la enzima. Teniendo en cuenta que el éxito en la termoestabilización de una enzima, usualmente es condicionado por el aumento de la rigidez de la estructura proteica mediante la aparición de nuevas interacciones de hidrógeno, puentes disulfuro, puentes salinos y el mejoramiento del empaquetamiento de la molécula (Xu *et al.*, 2020a). Se procedió al análisis de la aparición de interacciones potenciales que involucrasen los residuos mutantes (Tabla V) o la vecindad de estos hasta 4 Å.



**Figura 13.** Estructura tridimensional de la sacarosa Pall NX-5. (A), vista superior de la molécula orientada en el sentido: dominio C, A y B (de izquierda a derecha) y disposición de los residuos potenciales a sustituir identificados en la estructura de la Pall NX-5. Estructuras en color violeta representan láminas  $\beta$ , estructuras cian representas hélices  $\alpha$  y estructuras en color rosa representan bucles. (B), vista lateral de la molécula orientada en el sentido: dominio B, A y C (de izquierda a derecha) y perfil del factor B. Colores claros están asociado a residuos con alto factor-B (mayor flexibilidad), mientras los colores oscuros están asociados a bajo factor B (mayor rigidez).

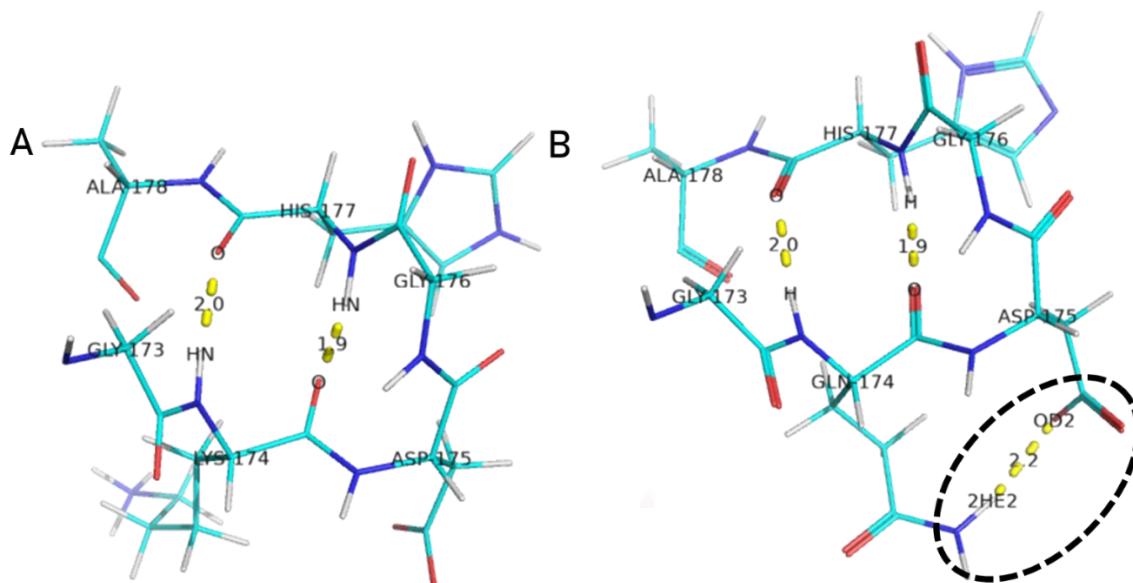


**Figura 14** . Disposición de los residuos e interacciones posibles en la proximidad del residuo Leu<sup>202</sup> (A) y el residuo Glu<sup>202</sup> (B).

Se analizaron *in silico* las interacciones potenciales a ocurrir en las vecindades de los residuos (nativos y mutantes) mostrados en la Tabla V. En las Figuras 14, 15 y 16 se muestran los casos particulares de las sustituciones Leu<sup>202</sup>Glu, Lys<sup>174</sup>Gln y Asp<sup>195</sup>Glu, en cuyos casos se observaron nuevas interacciones o el reforzamiento de las ya existentes. Al comparar la vecindad de los residuos Leu<sup>202</sup> y Glu<sup>202</sup> (Figura 14), aunque no se observaron diferencias en las distancias de los enlaces de hidrógeno con los residuos Phe<sup>169</sup> e His<sup>203</sup>; cuando el Glu ocupó la posición 202 se observó una nueva interacción entre el OE 2 (Glu<sup>202</sup>) y el HZ 2 (Lys<sup>248</sup>). También se observó una potencial reestructuración de la red de puentes de hidrógeno en la vecindad del Asp<sup>211</sup>, el cual ahora interactuaría con la Ala<sup>190</sup> en lugar de la Tyr<sup>204</sup>. Este reordenamiento de la red de puentes de hidrógeno alrededor del Asp<sup>211</sup> pudiera implicar un incremento de la estabilidad térmica de la molécula pues además de la aparición de una nueva interacción (Glu<sup>202</sup>–Lys<sup>248</sup>), ahora la red abarca a residuos más distantes pertenecientes a elementos diferentes de la cadena lateral. En este sentido, se ha observado que la prevalencia de redes de puentes de hidrógeno en enzimas mesófilas es menor que en termófilas (Tompa *et al.*, 2016), así como, que el mejoramiento de enlaces



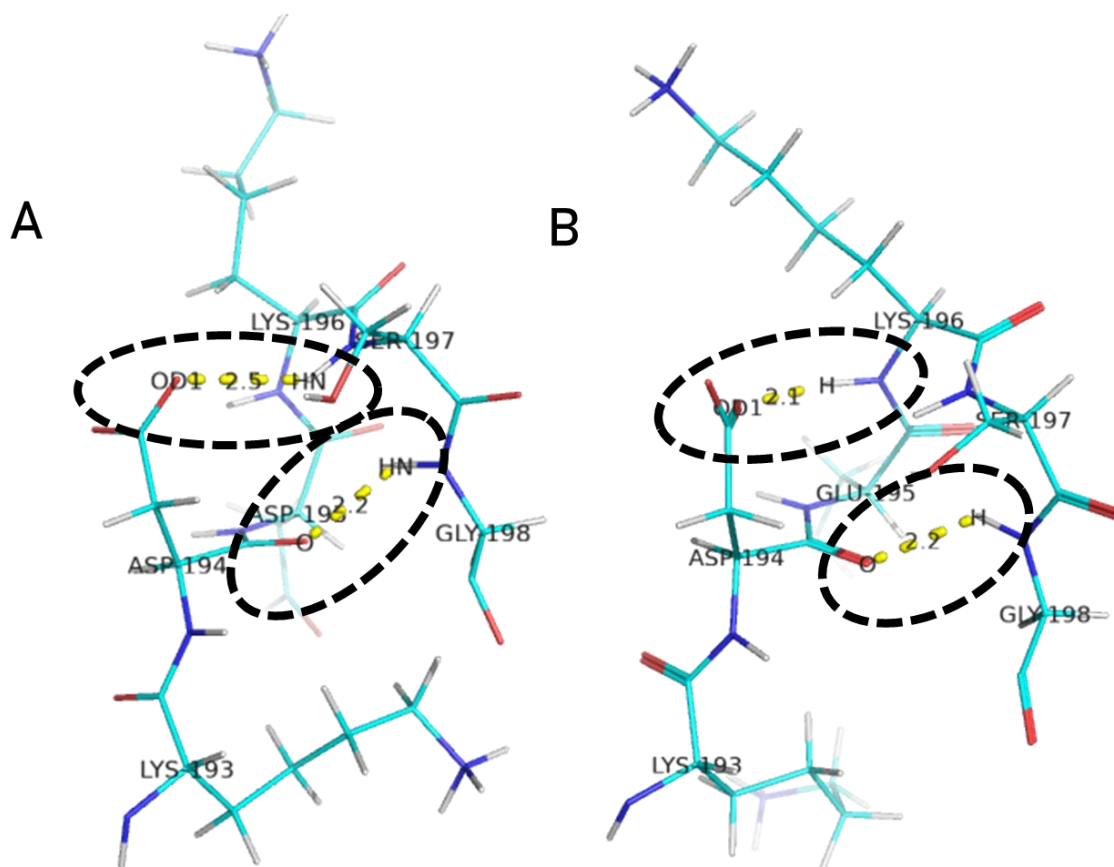
de hidrógeno es la interacción fisicoquímica más referenciada para explicar el incremento de la termoestabilidad (Querol *et al.*, 1996).



**Figura 15.** Disposición de los residuos e interacciones posibles en la proximidad del residuo Lys<sup>174</sup> (A) y el residuo Gln<sup>174</sup> (B).

Por otro lado, a pesar de que con la comparación de la vecindad de los residuos Lys<sup>174</sup> y Gln<sup>174</sup> (Figura 15) no se observaron cambios en las distancias de interacción con el residuo de His<sup>177</sup>, si se observó una nueva interacción entre el O $\gamma$  2 (Asp<sup>175</sup>) y el H $\epsilon$  2 (Gln<sup>174</sup>). En el caso de la comparación de la vecindad de los residuos Asp<sup>195</sup> y Glu<sup>195</sup> (Figura 16) la modificación estuvo dada por el reposicionamiento del puente de hidrógeno entre el O $\gamma$  1 (Asp<sup>194</sup>) y el hidrógeno disponible del N-terminal (comprometido en un enlace peptídico) inicialmente del residuo Ser<sup>197</sup> y luego del residuo Lys<sup>196</sup>. Además, esta reestructuración conllevaría a la reducción de la distancia de interacción, pasando a ser de 2.5 Å a 2.1 Å. Precisamente, Zheng *et al.* (2020) plantea que para la ocurrencia de enlaces de hidrógeno, la distancia entre el aceptor de protones y el átomo de hidrógeno debe ser menor que la suma de radios atómicos de van der Waals de los dos átomos en cuestión; en el caso de la combinación oxígeno – hidrógeno, esta distancia es de 2.5 Å (Pauling, 1960). De esta manera, la reducción en la

distancia del enlace de hidrógeno implicaría un fortalecimiento de dicha interacción.



**Figura 16.** Disposición de los residuos e interacciones posibles en la proximidad del residuo Asp<sup>195</sup> (A) y el residuo Glu<sup>195</sup> (B).

Dos elementos que resultan interesantes hasta este momento son: primeramente, que las sustituciones para las que se observaron interacciones no corresponden a los residuos que presentaron los mayores valores de factor B como los son el Asp<sup>175</sup> y la His<sup>177</sup>, confirmando esto que la estabilidad térmica es lograda mediante la optimización cooperativa de varios factores en lugar de una interacción predominante. Segundo, que de las tres sustituciones donde se observaron nuevas interacciones en la vecindad, una corresponde a la Gln, residuo sobre el que la estadística de proteínas de Khan *et al.* (2019) indica una pobre prevalencia en moléculas termófilas, mientras que Warren *et al.* (1995) plantearon que la

presencia de Gln en hélices de proteínas termoestables es mayor que en proteínas mesófilas. Ante esta ambigüedad la evaluación práctica será concluyente.

Para cada uno de los tres posibles mutantes de la enzima sacarosa isomerasa Pall NX-5, así como su combinación, se comprobó la conservación de la interacción enzima – sustrato, siendo esto un indicador de la actividad potencial de estas moléculas. En el análisis de *docking* molecular al sitio catalítico se empleó la glucosa en lugar de la sacarosa. Para ello se tuvo en cuenta que Véronèse *et al.* (1998) demostró que la glucosa es un inhibidor competitivo de la sacarosa; y que más tarde Veronese *et al.* (1998) dedujo la unión del glicosil de la sacarosa al sitio activo, asumiendo que la glucosa libre se une a la enzima en el mismo sitio y de la misma manera.

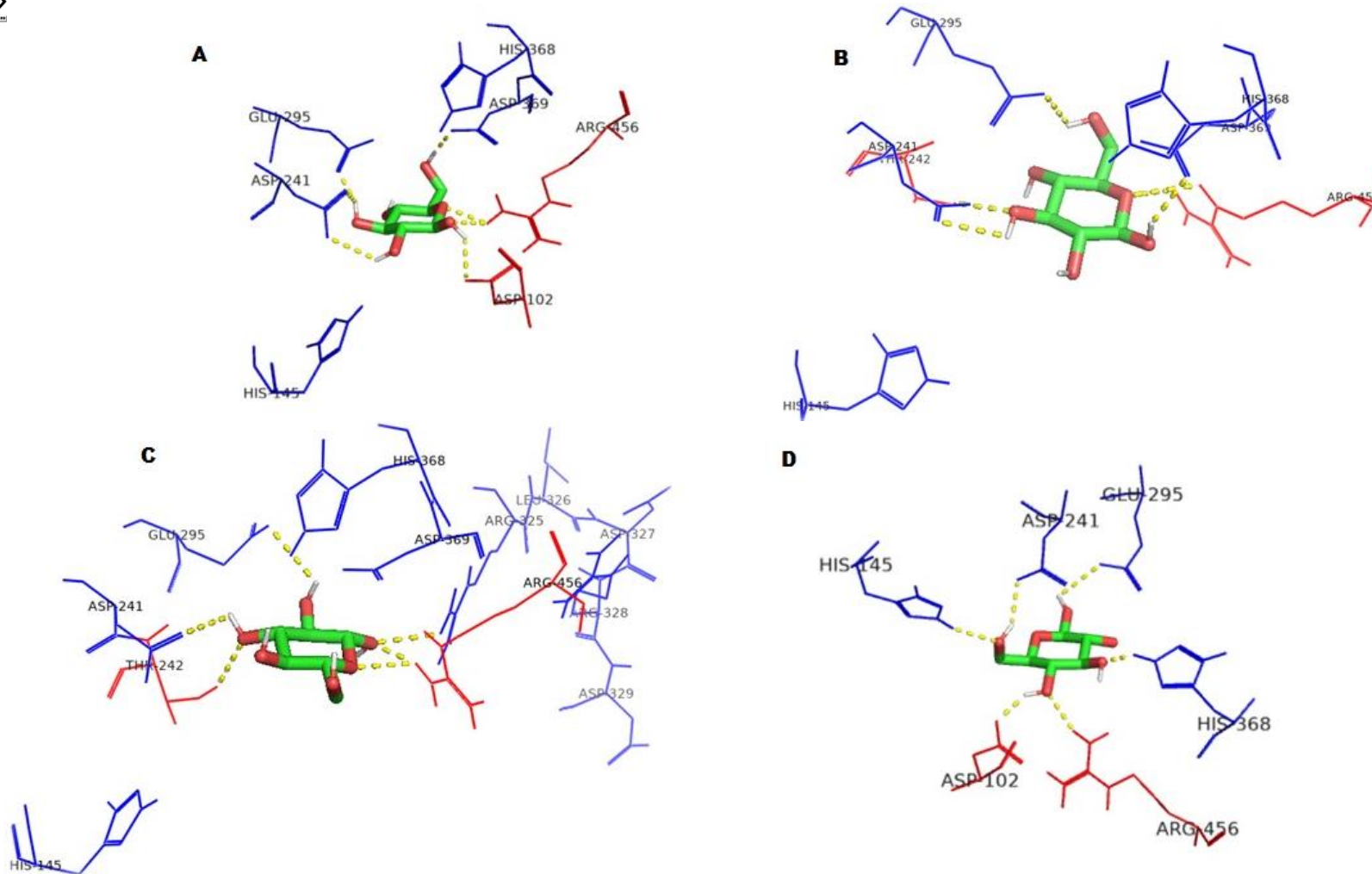
En la Tabla VI se muestran las energías de interacción entre la molécula D-glucosa y las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5. Estas energías de interacción (predichas) pudieran ser interpretadas como una medida de la afinidad potencial que existe entre el sustrato y la enzima durante el acoplamiento catalítico, constituyendo una semblanza a lo que desde el punto de vista cinético – experimental representa  $K_m$ . Las mayores afinidades (Vistas como:  $|Energía| < 0$ ) enzima – glucosa son predichas para las variantes L<sup>202</sup>E, L<sup>202</sup>E/K<sup>174</sup>Q, K<sup>174</sup>Q/D<sup>195</sup>E y L<sup>202</sup>E/D<sup>195</sup>E, las cuales presentan valores de energía de interacción que son un 6% superiores a la de la enzima no mutada (máximo incremento observado entre las 1440 configuraciones analizadas).

Atendiendo a los datos *in silico* mostrados en la Tabla VI, los mutantes seleccionados para su expresión recombinante y posterior evaluación fueron las variantes L<sup>202</sup>E, L<sup>202</sup>E/K<sup>174</sup>Q y K<sup>174</sup>Q. La variante L<sup>202</sup>E se seleccionó en vista a que presentó la mayor afinidad entre las mutantes simples. Por otro lado, el doble mutante L<sup>202</sup>E/K<sup>174</sup>Q se seleccionó atendiendo a que las variantes L<sup>202</sup>E y K<sup>174</sup>Q son los simple mutantes de mayores energías de interacción.

**Tabla VI.** Energías de interacción en el sitio catalítico de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 y la molécula D-glucosa. Resultados obtenidos mediante el software AutoDock Vina.

Variante	Energía (kcal/mol)	Condición
No mutada	-6.3	Semilla: 11, estado: 1.
L <sup>202</sup> E	-6.7	Semilla: 1, estado: 1.
K <sup>174</sup> Q	-6.5	Semilla: 7, estado: 2.
D <sup>195</sup> E	-6.3	Semilla: 11, estado: 2.
L <sup>202</sup> E/ K <sup>174</sup> Q	-6.7	Semilla: 1, estado: 1.
K <sup>174</sup> Q/D <sup>195</sup> E	-6.7	Semilla: 10, estado: 1.
L <sup>202</sup> E/D <sup>195</sup> E	-6.7	Semilla: 10, estado: 1.
K <sup>174</sup> Q/L <sup>202</sup> E/D <sup>195</sup> E	-6.3	Semilla: 1, estado: 1.

En la Figura 17 se muestran las interacciones predichas entre la D-glucosa y las tres variantes analizadas con anterioridad, incluida la enzima no mutada. Partiendo del reporte de Zhang *et al.* (2003), para los cuatro casos se observaron potenciales interacciones con residuos sobre los cuales existen evidencias experimentales de su actividad catalítica, siendo estos: H<sup>145</sup>, D<sup>241</sup>, E<sup>295</sup>, D<sup>369</sup> e H<sup>368</sup>. También es necesario destacar que estas predicciones son una aproximación a la realidad, por lo que como resultado el software brinda interacciones sobre las que no existen evidencias experimentales como las observadas con los residuos D<sup>102</sup>, R<sup>456</sup> y T<sup>242</sup>. De manera particular, en el caso del mutante K<sup>174</sup>Q existe un válido reconocimiento del motivo de isomerización (<sup>325</sup>RLDRD<sup>329</sup>), proyectándose una interacción con el residuo R<sup>325</sup>.



**Figura 17.** Disposición de los residuos aminoacídicos en el sitio activo de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 y sus interacciones predichas con la molécula de D-glucosa (inhibidor competitivo de la sacarosa). A, interacción glucosa-enzima no mutada, semilla: 11, estado: 1, energía de interacción -6.3 kcal/mol. B, interacción glucosa-variante NX-5 Pall L<sup>202</sup>E, semilla: 1, estado: 1, energía de interacción -6.7 kcal/mol. C interacción glucosa-variante NX-5 Pall K<sup>174</sup>Q, semilla: 7, estado: 1, energía de interacción -6.5 kcal/mol. D interacción glucosa-variante NX-5 Pall K<sup>174</sup>Q/ L<sup>202</sup>E, semilla: 1, estado: 1, energía de interacción -6.7 kcal/mol. En color azul los residuos aminoacídicos con actividad catalítica reportada. En color rojo los residuos aminoacídicos sin reporte de actividad catalítica.

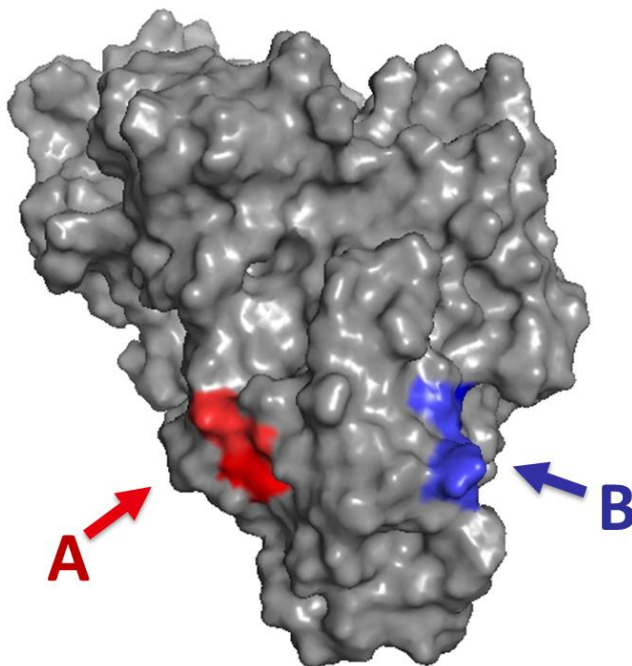
### 9.1.2. Potencial N-glicosilación de las variantes de la sacarosa isomerasa

Empleando la herramienta *Prosites* (<https://prosites.expasy.org/>) (De Castro *et al.*, 2006), se identificaron tres sitios potenciales a ser N-glicosilados en las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 expresada en *K. phaffii* X33. El primero de estos sitios se encuentra en la posición <sup>144</sup>NHT<sup>146</sup>, incluyendo al residuo catalítico H<sup>145</sup>, justo en el interior de la cavidad catalítica. Teniendo en cuenta que en la vía “retículo endoplasmático – aparato de Golgi”, los glicanos previamente ensamblados son agregados a la cadena polipeptídica en crecimiento (Colley *et al.*, 2015), se esperaría que la glicosilación del residuo N<sup>144</sup> conduzca a la obtención de una glicofoma con una estructura terciaria carente de funcionalidad. Sin embargo, como la expresión recombinante de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 ocurre mediada por el péptido señal  $\alpha$  factor de *Saccharomyces cerevisiae*, la translocación hacia el retículo endoplasmático es postraduccional (Barrero *et al.*, 2018), por lo que la proteína se plegaría en el citosol y el residuo N<sup>144</sup> no estaría disponible para ser glicosilado.

Como se muestra en la Figura 18, los dos restantes sitios potenciales para N – glicosilación (<sup>530</sup>NNS<sup>532</sup> y <sup>573</sup>NNS<sup>575</sup>) se encuentran ubicados en la superficie del dominio C terminal de la molécula. Fortuitamente, la posición de estas secuencias consenso para N-glicosilación son muy próximas a puntos calientes de alto valor B (Ver sección “7.1.1”) o se encuentran en una región de este tipo. De manera específica, el sitio potencial <sup>530</sup>NNS<sup>532</sup> se encuentra ubicado a 10 residuos del punto caliente <sup>541</sup>GAE<sup>543</sup>, mientras el sitio <sup>573</sup>NNS<sup>575</sup> se encuentra en el interior del segmento de alto factor B que va desde el residuo E<sup>553</sup> hasta el residuo R<sup>587</sup>.

Reportes como los de Colley *et al.* (2015), Katla *et al.* (2019), Benoit *et al.* (2006) y (Zou *et al.*, 2013) coinciden en que la presencia de glicosilación en una proteína constituye, en sentido general, un aporte a la estabilidad de la molécula, ya sea térmica, frente al pH, presencia de proteasas o estrés fisiológico. De manera específica, Benoit *et al.* (2006) aisló una *feruloil* esterasa A de *Aspergillus niger*

(naturalmente glicosilada), la cual es más termoestable que su contraparte no glicosilada expresada en *E. coli*. Por su parte, Zou *et al.* (2013) observó que la estabilidad estructural y funcional de la  $\beta$ -glucuronidasa de *Penicillium purpurogenum* mejoró después de su expresión glicosilada en *K. phaffii* GS115 en comparación con su contraparte nativa.



**Figura 18.** Sitios potenciales a ser N-glicosilados en las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 expresada en *K. phaffii* X33. A, secuencia consenso <sup>530</sup>NNS<sup>532</sup>. B, secuencia consenso <sup>573</sup>NNS<sup>575</sup>.

La estabilidad de gran cantidad de proteínas es potenciada por la presencia de glicosilación (Solá *et al.*, 2009), sin embargo, tal y como se evidencia en los trabajos de Han *et al.* (2020) y Hu *et al.* (2019) el efecto de esta modificación postraduccional es muy complejo y no siempre es predecible, ni beneficioso. Por ejemplo, Han *et al.* (2020) en su esfuerzo por mejorar la estabilidad térmica de la endoglucanasa CTendo45 (familia GH45) de *Chaetomium thermophilum*, eliminó el sitio de N-glicosilación existente en la CTendo45 e introdujo otros adicionales mediante mutagénesis dirigida al sitio. Así, luego de llevar a cabo la mutación T<sup>90</sup>A, que elimina el único sitio para N-glicosilación, Han *et al.* (2020) observó una mejora (hasta en 1.85 veces) en la actividad catalítica a temperatura superiores a

60 °C. La explicación a este evento recayó en el incremento de la flexibilidad de la cavidad donde ocurre el acoplamiento del sustrato, lo que condujo a una mejora funcional de los residuos catalíticos. Resulta interesante que contraria a la lógica que se ha venido trazando en esta investigación, el incremento en los grados de libertad del motivo  $\beta$  (Barril  $\beta$ , columna vertebral de la molécula) reportado por Han *et al.* (2020), no condujo a la pérdida de estabilidad térmica, sino por el contrario, esta fue potenciada. Este comportamiento pone en evidencia que no existe un procedimiento universal para la termoestabilización de las proteínas, y que el análisis *a priori* de una acción acometida en una molécula es difícil e impreciso si no se cuentan con todos los elementos estructurales que coadyuvan a la estabilidad térmica; entre los que se encuentran las redes de interacciones de hidrógeno, puentes salinos y la polaridad superficial, que se ven afectados por la presencia de glicanos adosados a la proteína (Huang *et al.*, 2012; Sriprapundh *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2018).

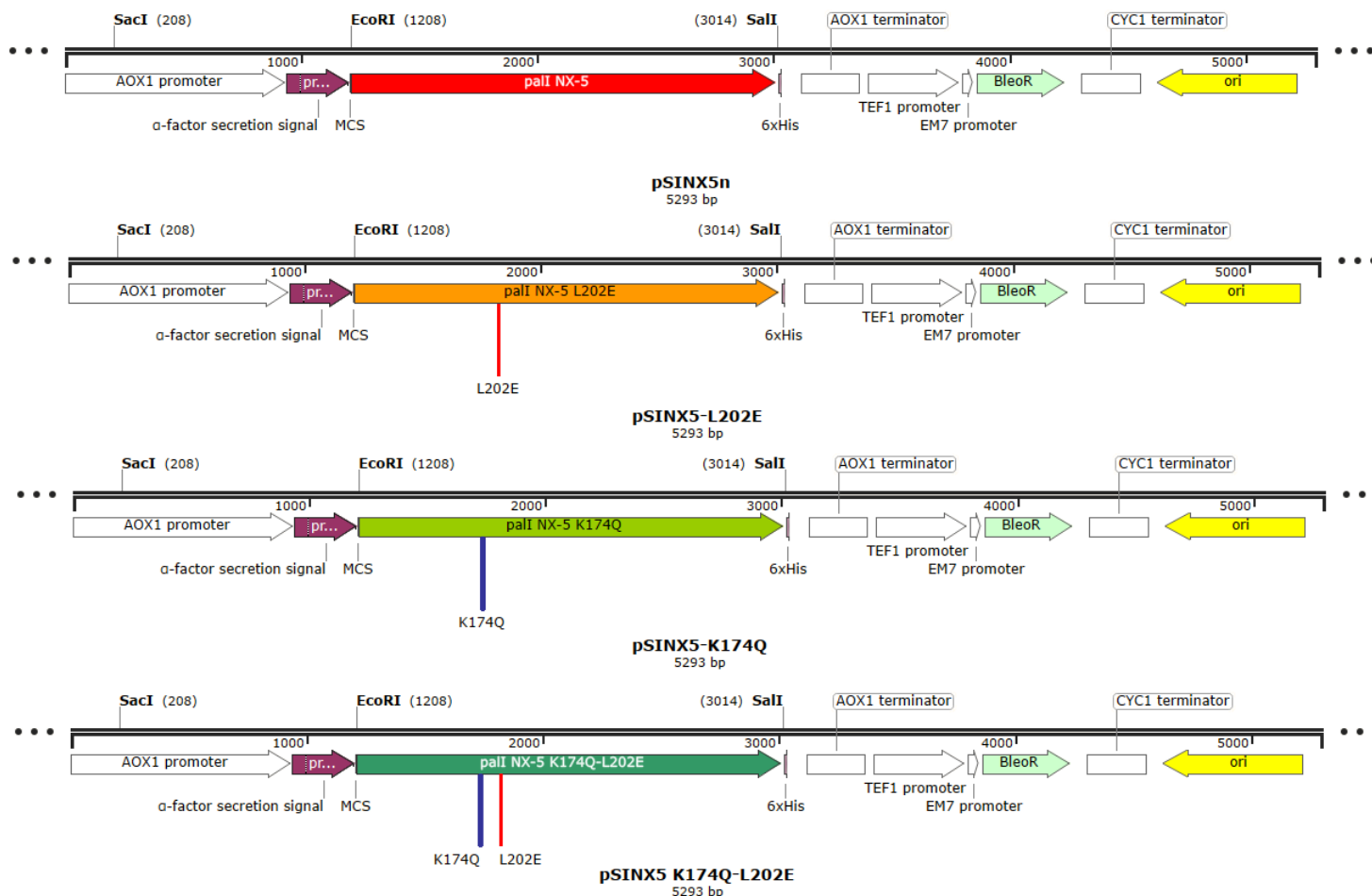
Adicionalmente, el trabajo de Han *et al.* (2020) confirma que, independientemente de que los mecanismos termodinámicos que conducen a la estabilización térmica aún no se han dilucidado por completo (Patel *et al.*, 2019), el éxito para lograr esta acción radica en seguir una estrategia holística, donde el objetivo *per se* no sea realizar una modificación, sino que la ejecución de esta complemente a otras interacciones estabilizantes. Se ha demostrado que la estabilización causada por la glicosilación, está estrechamente asociada con la entropía y con las posiciones de los sitios de glicosilación en la proteína (Helenius *et al.*, 2004; Shental-Bechor *et al.*, 2008). Los glicanos unidos a regiones flexibles, en general, confinarían el espacio conformacional y estimularían la reducción de la entropía de la proteína, mejorando así la estabilidad conformacional a altas temperaturas (Adney *et al.*, 2009; Dotsenko *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta este contexto es posible hipotetizar que, dado que los residuos N<sup>530</sup> y N<sup>573</sup> se encuentran en segmentos de bucle, en teoría carentes de una estructura secundaria rígida (con alto factor B), la adición de glicanos a esas posiciones tendrá un efecto positivo en la estabilidad



comparado con el que esperaríamos para la variante silvestre de *Erwinia rhapontici* NX-5 (no glicosilada), e incluso complementar las sustituciones realizadas en las posiciones K<sup>174</sup>Q y L<sup>202</sup>E.

### 9.1.3. Mutagénesis dirigida al sitio y vectores de expresión

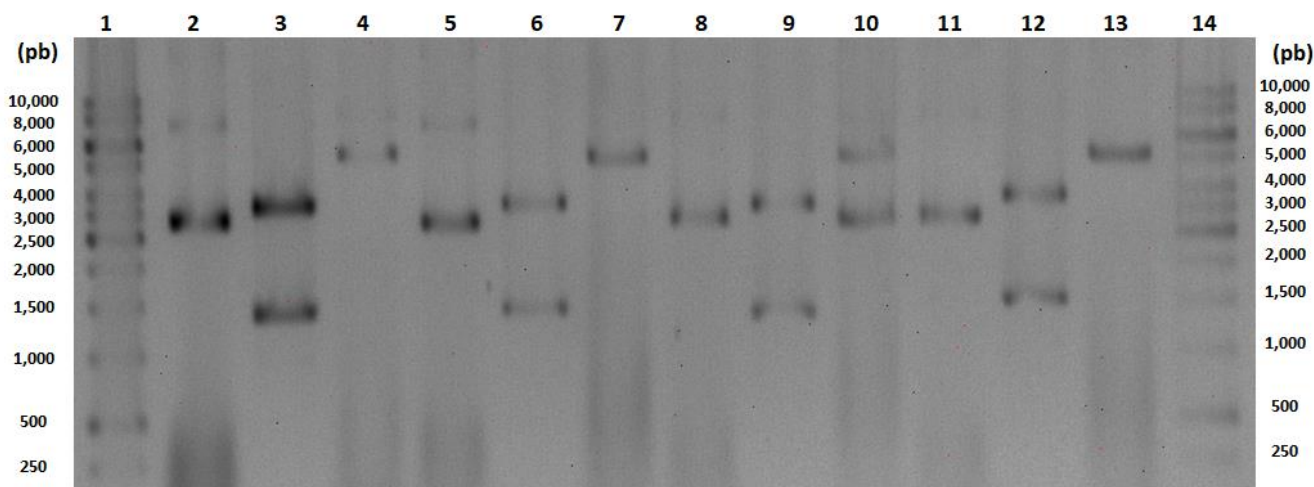
Se partió de las secuencias de aminoácidos de las cuatro variantes de sacarosa isomerasa Pall NX-5 (No mutada, L<sup>202</sup>E, K<sup>174</sup>Q y L<sup>202</sup>E/K<sup>174</sup>Q) previamente analizadas. Utilizando el software *Sequence Manipulation Suite* (Stothard, 2000) se realizó la traducción inversa de cada una de dichas secuencias, para lo cual se empleó los codones de uso de *K. phaffii*. Posteriormente se realizaron mutaciones puntuales silenciosas para eliminar sitios de restricción no deseados en las secuencias, las cuales fueron flanqueadas por sitios de restricción a *EcoRI* y *Sall* en sus extremos 5' y 3' respectivamente. Tal como se muestra en la Figura 19 las secuencias fueron insertadas en el vector de integración genómica pPICZ $\alpha$  A (INVITROGEN<sup>®</sup>) obteniéndose así las construcciones pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E. Para cada una de las construcciones genéticas diseñadas (Figura 19), la regulación de la expresión de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 está bajo el control del promotor *AOX1* (Alcohol oxidasa 1). Las variantes del gen *pall* estarán flanqueadas por la secuencia del factor de excreción  $\alpha$  *factor* en el extremo 5' y por una cola de seis His en el extremo 3'. El péptido líder  $\alpha$  *factor* proveniente de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, permite la exportación de proteínas a la vía secretora de la levadura; mientras la cola de His facilitaría la purificación de la proteína mediante columnas cromatográficas cargadas con Ni<sup>2+</sup>. Además, las construcciones cuentan con un gen marcador de selección que le confiere resistencia a la zeocina. Cada variante del gen *pall* tiene un tamaño 1800 pb codificando para variantes de la Pall NX-5 (600 aa) de un peso molecular calculado de 69.90 kDa (*Protein Calculator* v3.4, <http://protcalc.sourceforge.net/>).



**Figura 19.** Construcciones genéticas pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E. El marco abierto de lectura del gen *pall* NX5 y sus variantes (*pall* NX5 L202E, *pall* NX5 K174Q y *pall* NX5 K174Q/L202E) se clonaron en el vector pPICZ $\alpha$  A (Invitrogen), flanqueado por la señal de secreción del factor  $\alpha$  y la etiqueta 6xHis, en el extremo 5' y 3', respectivamente. Se muestran señaladas con una línea azul y roja las posiciones de las sustituciones K<sup>174</sup>Q y L<sup>202</sup>E en las variantes del gen *pall* NX-5, respetivamente. La expresión del gen *pall* NX5 y sus variantes está controlada por el AOX1, promotor alcohol oxidasa 1 de *K. phaffii*. El gen BleoR que confiere resistencia a la zeocina, se incluyó como gen marcador de selección.

## 9.2. Caracterización de las construcciones genéticas: pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E

Las construcciones genéticas: pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E fueron propagadas en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Luego de la extracción de ADN plasmídico, las construcciones fueron caracterizadas mediante digestión con enzimas de restricción. Se realizaron cortes con las enzimas *EcoRI/SalI* para liberar las variantes del gen *pall* NX-5 y con la enzima *SacI* para caracterizar el sitio de recombinación homóloga en *K. phaffii*, el cual se encuentra dentro del promotor *AOX1*. Luego del corte con las enzimas *EcoRI/SalI*, se obtuvieron dos fragmentos de aproximadamente 3500 y 1800 pb. Por otro lado, luego del corte con la enzima *SacI* se obtuvo un fragmento linearizado de aproximadamente 5300 pb (Figura 20). En todos los casos los tamaños de los fragmentos resultaron ser similar a los teóricos, evidenciando que el ADN plasmídico con que se contó, potencialmente pertenece a las construcciones: pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E.

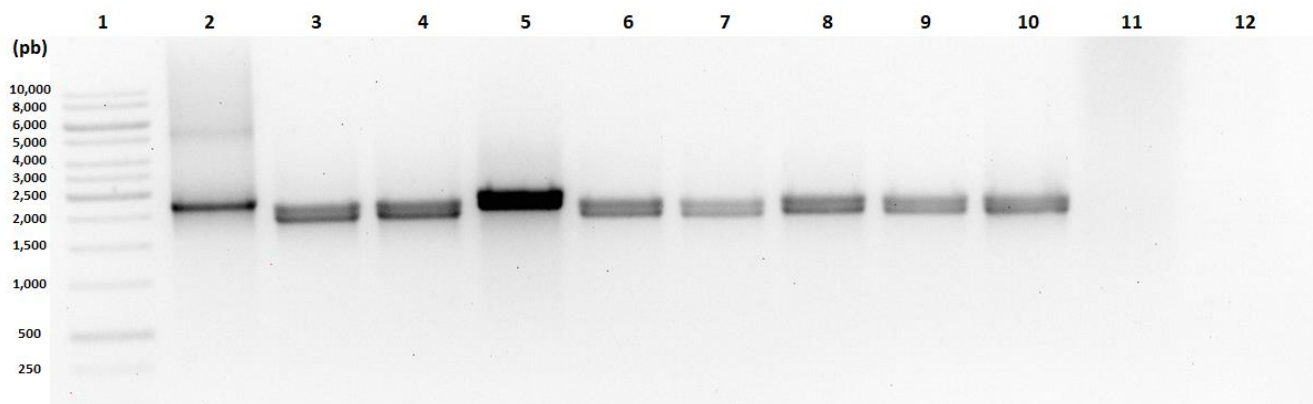


**Figura 20.** Caracterización de las construcciones genéticas: pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E. Carriles 1) MPM 1kb ADN Ladder, 2) pSINX5n linearizado con *SacI*, 3) pSINX5n cortado con *EcoRI/SalI*, 4) pSINX5n sin cortar, 5) pSINX5 K174Q linearizado con *SacI*, 6) pSINX5 K174Q cortado con *EcoRI/SalI*, 7) pSINX5 K174Q sin cortar, 8) pSINX5 L202E linearizado con *SacI*, 9) pSINX5 L202E cortado con *EcoRI/SalI*, 10) pSINX5 L202E sin cortar, 11) pSINX5 K174Q-L202E linearizado con *SacI*, 12) pSINX5 K174Q-L202E cortado con *EcoRI/SalI*, 13) pSINX5 K174Q-L202E sin cortar, 14) MPM 1kb ADN Ladder.

### 9.3. Transformación genética de *Komagataella phaffii* X33

Después de la transformación de *K. phaffii* X33 con las construcciones: pSINX5n, pSINX5 L202E, pSINX5 K174Q y pSINX5 K174Q-L202E, se observó crecimiento de colonias potencialmente transformadas a partir de las 72 h de incubación. Un total de 16 colonias fueron aisladas, cuatro para cada evento de transformación. La inserción de genes en un único locus de una célula ocurre de manera espontánea con una frecuencia baja pero detectable. Entre el 1% y el 10% de todas las colonias muestran la integración exitosa del gen de interés en el genoma de *K. phaffii* (Cregg *et al.*, 1998).

Para confirmar la efectiva transformación de *K. phaffii* X33, así como la integración genómica de las variantes del gen *pall*, se realizó un análisis de PCR. Luego de la extracción de ADN genómico se amplificó una región que parte del promotor *AOX1* hasta el terminador *AOX1*, incluyendo el gen *pall*. Se obtuvieron productos de amplificación de 2200 pb aproximadamente, muy próximos al tamaño esperado de 2561 pb (Figura 21). Este resultado confirmó que las clonas aisladas contienen las variantes del gen *pall* en el locus *AOX* del genoma de *K. phaffii* X33. Se identificaron 8 clonas positivas, las que se designaron como C1-pSINX5n-Pp, C2-pSINX5n-Pp, C1-pSINX5K174Q-Pp, C2-pSINX5K174Q-Pp, C1-pSINX5L202E-Pp, C2-pSINX5L202E-Pp, C1-pSINX5K174Q/L202E-Pp y C2-pSINX5K174Q/L202E-Pp (C1/2 corresponde al número de clona aislada; pSINX5n corresponde al plásmido que contiene la clona y Pp se refiere al organismo que la expresa, la levadura *Komagataella phaffii* X33).



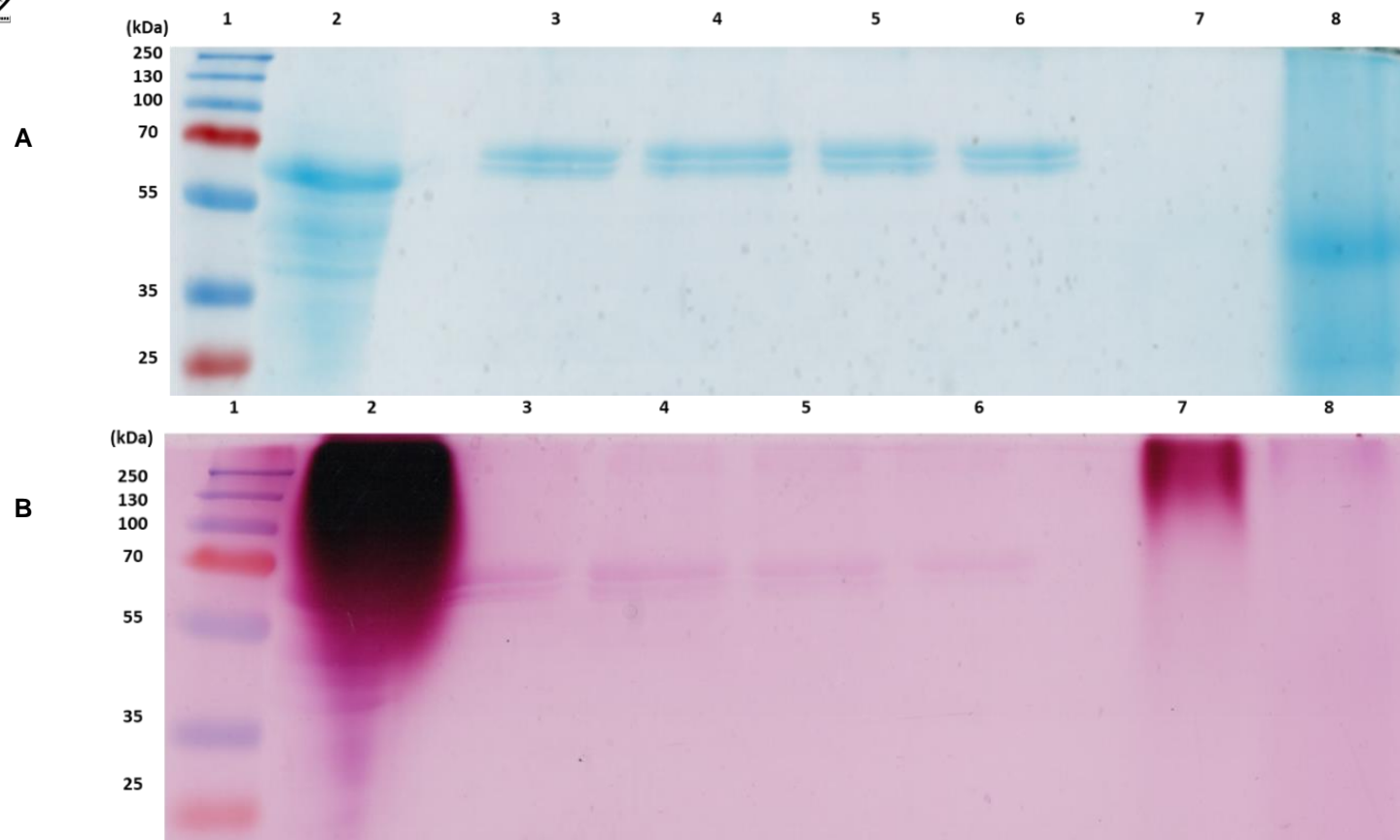
**Figura 21.** Amplificación de las variantes del gen *pall* NX-5 en la levadura *K. phaffii* X33. Carril 1) MPM 1kb ADN Ladder; carril 2) amplificación del pSINX5n linearizado con *SacI* (control positivo); carriles 3) Clona 1 de *K. phaffii* pSINX5n; carril 4) Clona 2 de *K. phaffii* pSINX5n; carril 5) Clona 1 de *K. phaffii* pSINX5 K174Q; carril 6) Clona 2 de *K. phaffii* pSINX5 K174Q; carril 7) Clona 1 de *K. phaffii* pSINX5 L202E; carril 8) Clona 2 de *K. phaffii* pSINX5 L202E; carril 9) Clona 1 de *P. phaffii* pSINX5 K174Q -L202E; carril 10) Clona 2 de *K. phaffii* pSINX5 K174Q -L202E; carril 11) *K. phaffii* sin transformar; carril 12) control negativo. Se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 2200 pb, muy próximo con el peso molecular esperado para las variantes del gen *pall* NX-5, integrado en el genoma de *K. phaffii*.

#### 9.4. Análisis de la expresión de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5

Colonias *provenientes* de las clonas C1-pSINX5n-Pp, C1-pSINX5K174Q-Pp, C1-pSINX5L202E-Pp y C2-pSINX5K174Q/L202E-Pp, se cultivaron en medio de inducción de proteínas. Después de 96 h de inducción con metanol (5% v/v), la proteína total extracelular se recuperó de los sobrenadantes de la fermentación y se purificó utilizando una resina comercial cargada con Níquel de alta afinidad (GenScript®). En cuanto al rendimiento, una vez finalizadas las etapas de cultivo y purificación, se recuperaron  $24.80 \pm 1.75$  mg de las enzimas purificadas por 100 mL de cultivo. Luego del análisis en SDS-PAGE (12%) de las proteínas purificadas, se observaron bandas a aproximadamente 70 kDa (Figura 22A, carriles 3, 4, 5 y 6), próximas al peso molecular predicho por *Protein Calculator* v3.4. Al comparar el perfil de migración de la proteína purificada expresada por los transformantes y *K. phaffii* X33 no transformada, resulta potencial el hecho de que las bandas anteriormente reportadas pertenecen a las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5. También resulta interesante el hecho de que en los

purificados de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 (Figura 22A, carriles 3, 4, 5 y 6) se observaron al menos dos bandas. Con base a lo analizado en la sección “9.1.2”, una hipótesis a este comportamiento se encuentra en la capacidad de *K. phaffii* de glicosilar proteínas secretadas. Así, las bandas observadas para cada uno de los purificados de las variantes de la Pall NX-5 podrían corresponder a diferentes niveles de glicosilación alcanzados durante los cultivos celulares.

Para comprobar cualitativamente la presencia de glicoproteínas en los purificados de las clonas C1-pSINX5n-Pp, C1-pSINX5K174Q-Pp, C1-pSINX5L202E-Pp y C2-pSINX5K174Q/L202E-Pp, se usó el Kit de Detección de Glicoproteínas (Sigma-Aldrich®). En la Figura 22B se pueden observar teñidas en color púrpura las bandas de proteínas que poseen glicanos adosados a su superficie. Al comparar los perfiles de migración de los purificados (Carriles 3, 4, 5 y 6) mostrados en las Figuras 22A y 22B se comprueba que las bandas observadas corresponden a glicoproteínas. Así, se estarían obteniendo al menos dos glicofomas principales de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5, siendo este el primer reporte de expresión y caracterización de sacarosa isomerasas glicosiladas. En el carril 7 de la Figura 22B se observa un barrido de glicoproteínas, aun cuando en la Figura 22A no son identificables bandas al mismo peso molecular. Este comportamiento probablemente esté dado por la alta sensibilidad de la tinción de glicanos. Además, aunque *K. phaffii* X33 no transformada no excreta proteínas al caldo, como resultado de la muerte celular es posible que el sobrenadante presente *debris*, en el cual estarán presentes glicoproteínas de membrana



**Figura 22.** Identificación de las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX5 producida en *K. phaffii* X33 mediante SDS-PAGE. A). Tinción de proteínas purificadas en azul de Coomassie, carril 1: marcador de peso molecular PageRuler™ Plus (ThermoFisher), carril 2: lacasa comercial de *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich) (control positivo de glicosilación), carril 3: variante no mutada de la sacarosa isomerasa Pall NX-5, carril 4: sacarosa isomerasa Pall NX-5 K174Q, carril 5: sacarosa isomerasa Pall NX-5 L202E, carril 6: sacarosa isomerasa Pall NX-5 K174Q/L202E, carril 7: diálisis de proteínas totales excretadas por *K. phaffii* X33 no transformada (control negativo), carril 8: liticasa de *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich) (control negativo de glicosilación). B). Tinción de glicoproteínas en purificados, carril 1: marcador de peso molecular PageRuler™ Plus (ThermoFisher), carril 2: lacasa comercial de *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich) (control positivo de glicosilación), carril 3: variante no mutada de la sacarosa isomerasa Pall NX-5, carril 4: sacarosa isomerasa Pall NX-5 K174Q, carril 5: sacarosa isomerasa Pall NX-5 L202E, carril 6: sacarosa isomerasa Pall NX-5 K174Q/L202E, carril 7: diálisis de proteínas totales excretadas por *K. phaffii* X33 no transformada (control negativo), carril 8: liticasa de *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich) (control negativo de glicosilación).

## 9.5. Cuantificación de azúcares en las mezclas de reacción mediante HPLC

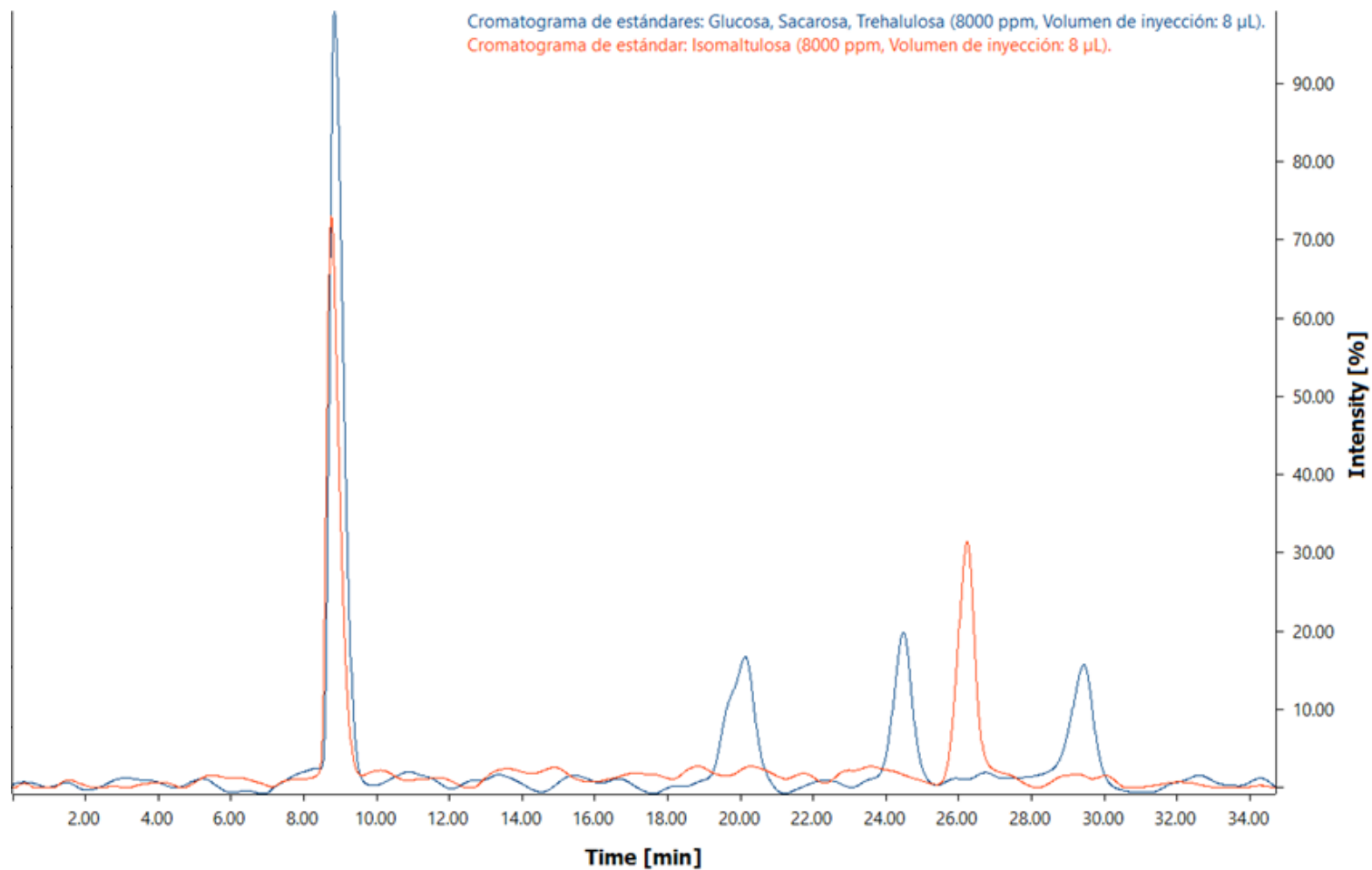
Las condiciones de ensayo descritas en la sección “8.16”, se establecieron partiendo del uso de estándares de sacarosa, glucosa, isomaltulosa y trehalulosa a concentraciones de  $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (8000 ppm), así como del análisis de la influencia de las variables: flujo, temperatura y composición de la fase móvil, sobre los tiempos de retención de los carbohidratos y la resolución observada en los cromatogramas resultantes de cada corrida. En la Figura 23 se muestran de forma conjunta los cromatogramas de los estándares, observándose que bajo las condiciones descritas en la sección “8.16” los cromatogramas de mezcla de reacción quedarían resueltos. Atendiendo a la relación polaridad de la fase estacionaria – polaridad de la fase móvil, así como a la polaridad de las moléculas analizadas (Crha *et al.*, 2020; Markosyan *et al.*, 2007) y a los tiempos de retención mostrados en sus cromatogramas individuales, los picos observados en la Figura 23 corresponden a: pico de inyección (t: 8.87 min, su presencia se debe a un cambio en la composición de la fase móvil), glucosa (t: 20.23 min), sacarosa (t: 24.46 min), isomaltulosa (t: 26.31 min) y trehalulosa (t: 29.30 min).

Una vez identificados los tiempos de retención de los estándares, se construyeron curvas que permitieron relacionar las áreas de los picos con concentraciones conocidas del analito en cuestión. En la Figura 24 se muestran dichas curvas, así como los modelos de regresión lineal que describen la correlación entre los parámetros analizados. Estos modelos fueron utilizados para determinar la concentración de los analitos en las mezclas de reacción. En la Figura 25 se muestran los cromatogramas de mezclas producto de la réplica “uno” de las reacciones enzimáticas incubadas a  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , mientras en la Figura 26 se muestra el cromatograma de la réplica uno del control negativo.

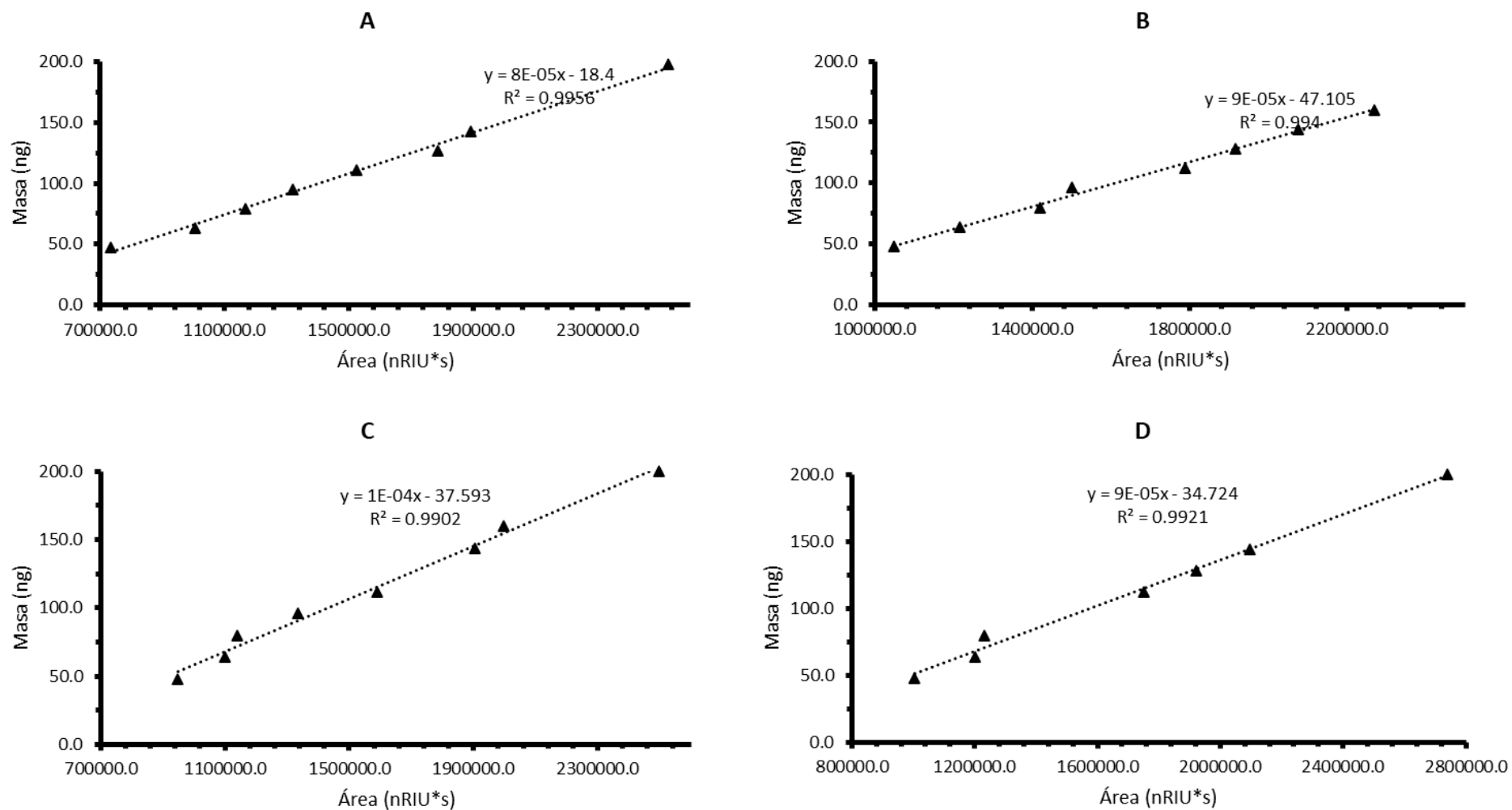


Al comparar los cromatogramas mostrados en las Figuras 23, 25 y 26 se pueden destacar los siguientes elementos:

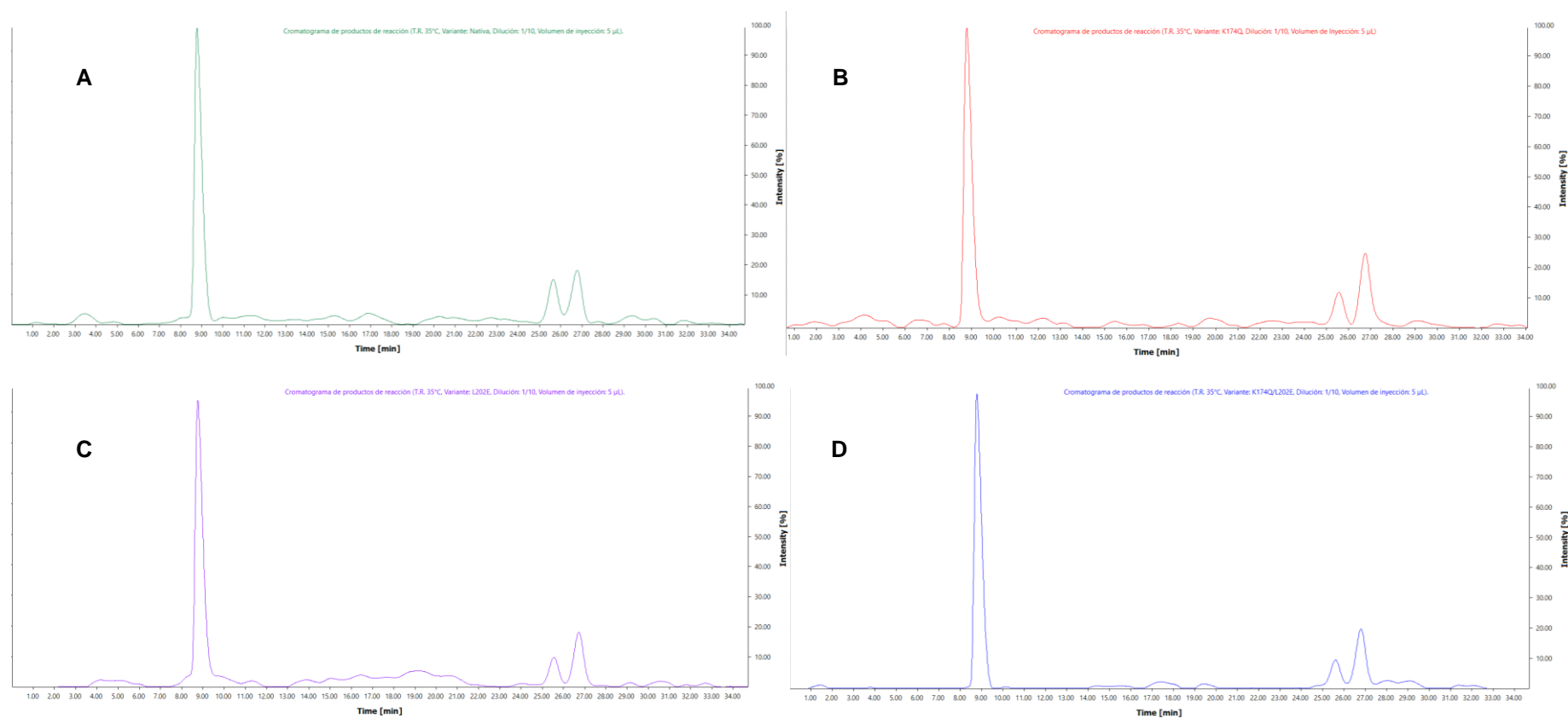
1. Se observaron cambios en los tiempos de retención de la sacarosa y la isomaltulosa de los cromatogramas de mezclas producto de reacción respecto al presentado por los estándares. Esto se puede atribuir a que los estándares fueron disueltos en agua tridestilada con pH de 7 y conductividad de  $0.9 \mu\text{S}$ , mientras las muestras fueron disueltas en tampón de ácido cítrico/fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0).
2. A diferencia del cromatograma del control negativo (Figura 26) donde solo se observa un pico de interés, en los cromatogramas de mezclas producto de reacción (Figura 25) es claramente visible la presencia de dos picos de interés, el primero de ellos correspondiente a la sacarosa no consumida durante las reacciones enzimáticas, mientras el segundo asociado a la isomaltulosa producida en este proceso. De esta manera, bajo las condiciones de reacción descritas en las secciones “8.12” y “8.13”, se observó actividad enzimática en cada una de las variantes de la Pall NX-5 analizadas en esta investigación. Las enzimas son macromoléculas complejas y en muchos casos pequeños cambios en la estructura primaria o el procesamiento postraducciona pueden conllevar a la pérdida de la conformación activa, tal como demuestran los reportes experimentales de Guo *et al.* (2021), Masakari *et al.* (2020) y Yin *et al.* (2019). De esta manera, es significativo el hecho de que cualitativamente se observe actividad enzimática luego de las mutaciones realizadas a la Pall NX-5 (K174Q, L202E, K174Q/L202E) y que estas, a diferencia de su contraparte silvestre, se encuentren glicosiladas.



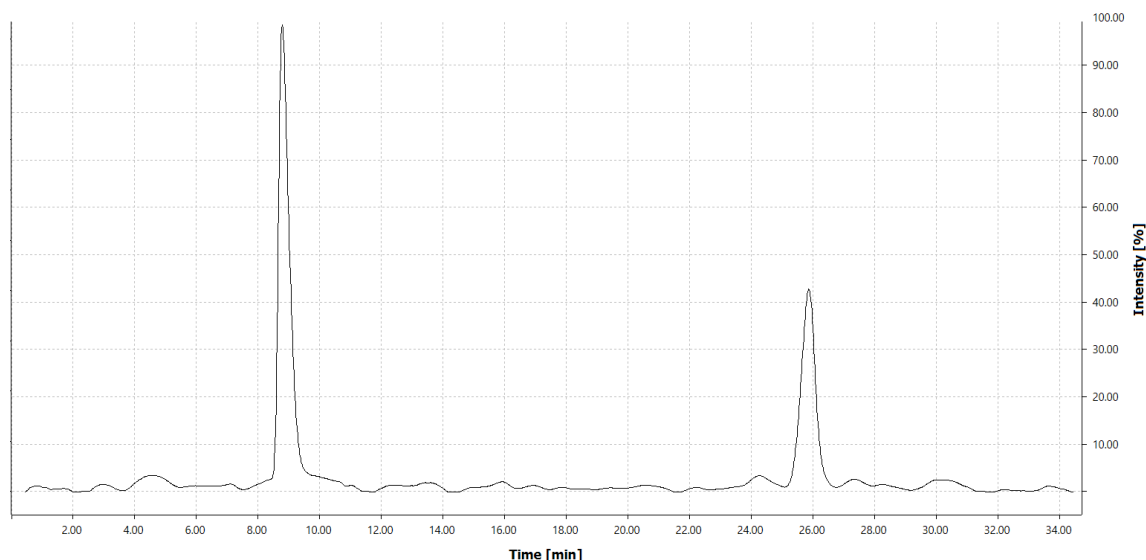
**Figura 23.** Cromatogramas combinados de los estándares de glucosa, sacarosa, isomaltulosa y trehalulosa.



**Figura 24.** Curvas de concentraciones conocidas de estándares contra las áreas de los picos. A, curva de sacarosa. B, curva de isomaltulosa. C, curva de trehalulosa. D, curva de glucosa.



**Figura 25.** Cromatogramas de mezclas producto de reacción. Las reacciones fueron incubadas por 15 min a 35 °C y detenidas hirviendo la mezcla en un baño de agua a 100 °C durante 5 min. A, cromatograma de la mezcla producto de reacción cuando se empleó la variante no mutada de la sacarosa isomerasa Pall NX-5. B, cromatograma de la mezcla producto de reacción cuando se empleó el mutante K174Q de la sacarosa isomerasa Pall NX-5. C, cromatograma de la mezcla producto de reacción cuando se empleó el mutante L202E de la sacarosa isomerasa Pall NX-5. D, cromatograma de la mezcla producto de reacción cuando se empleó el mutante K174Q/L202E de la sacarosa isomerasa Pall NX-5. En todos los casos las mezclas producto de reacción fueron diluidas 10 veces, mientras el volumen inyectado a la columna fue de 5 µL.

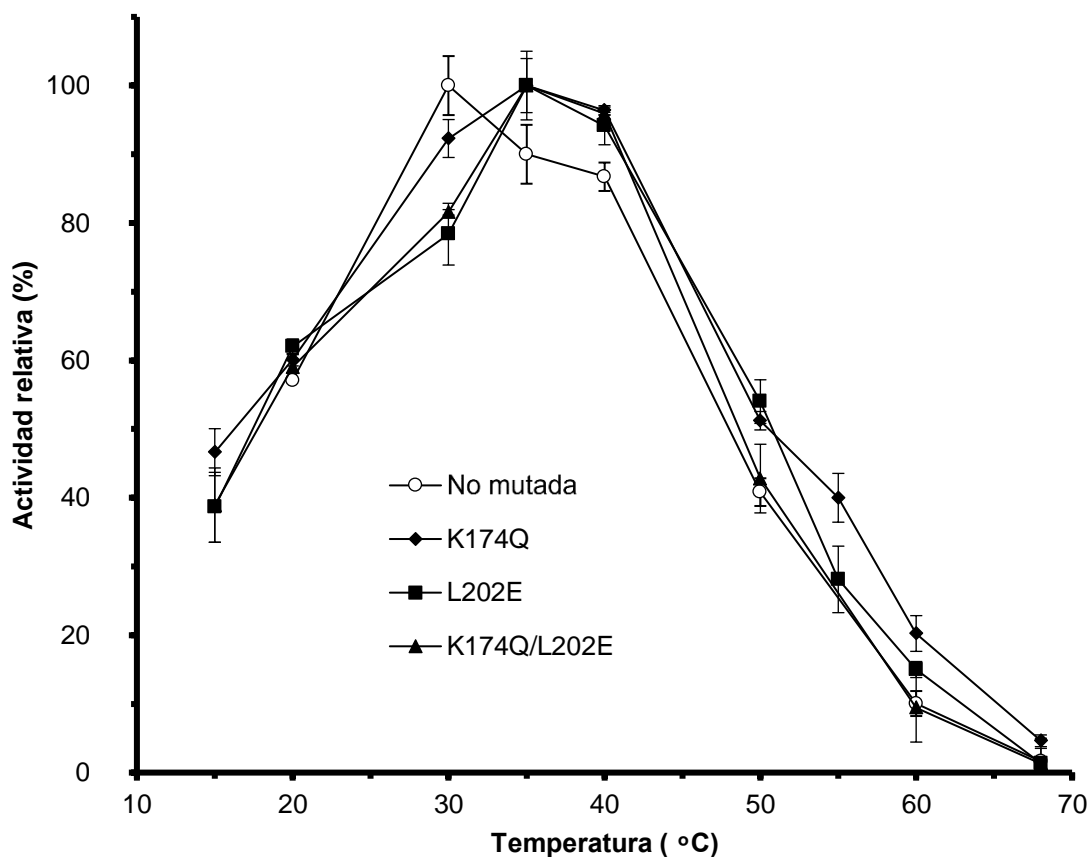


**Figura 26.** Cromatograma de la réplica uno del control negativo (sacarosa 292 mM) disuelto en tampón de ácido cítrico/fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0). La solución fue inicialmente incubada por 15 min a 35 °C y luego en un baño de agua a 100 °C durante 5 min. Para el análisis de la muestra en HPLC, esta fue inicialmente diluida 10 veces, mientras el volumen inyectado a la columna fue de 5  $\mu$ L.

### 9.6. Influencia de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de las variantes de la sacarosa isomerasa recombinante Pall NX-5

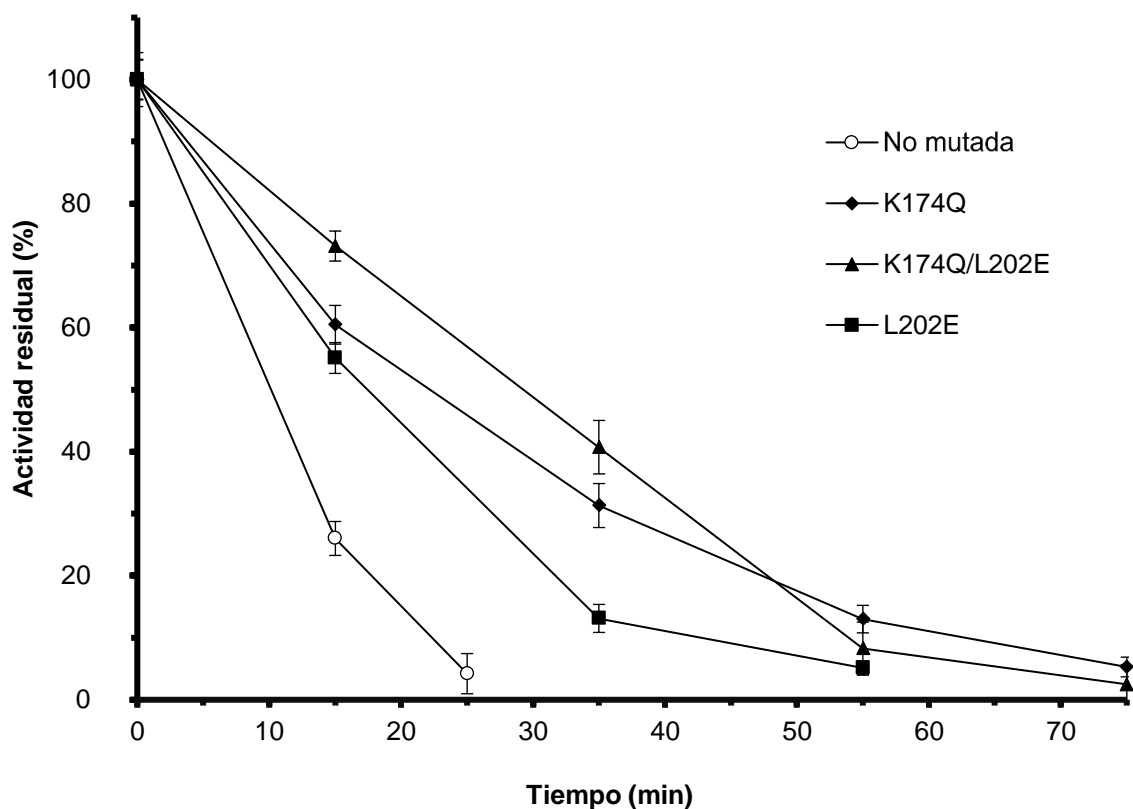
La influencia de la temperatura sobre la actividad isomerasa de las variantes de la Pall NX-5 se estudió en el intervalo de 15 a 68 °C (Figura 27). La variante no mutada de la Pall NX-5 mostró su actividad máxima a 30 °C, coincidiendo con sus contrapartes: silvestre (de *Erwinia rhapsontici* NX-5) (Ren *et al.*, 2011) y recombinante (de *E. coli* BL21(DE3)) (Li *et al.*, 2011). Así, la expresión glicosilada de la variante no mutada, al parecer, no tuvo influencia sobre la temperatura óptima observada. En este sentido, Hua *et al.* (2014), Han *et al.* (2014) y Petrescu *et al.* (2004) han documentado que la N-glicosilación de enzimas recombinantes expresadas en levaduras, puede no presentar efectos significativos sobre la actividad. Asimismo, Han *et al.* (2014) plantea que algunos sitios de N-glicosilación no son esenciales para el plegamiento o no pueden afectar la actividad enzimática debido a su distancia del sitio activo de la enzima recombinante; de esta manera, la presencia (o ausencia) de los glicanos tiene un efecto mínimo sobre la actividad enzimática.

Los mutantes K174Q, L202E y K174Q/L202E mostraron un incremento en la temperatura óptima de 5 °C (Temperatura óptima: 35 °C). Además, su actividad a 40 °C fue del 96% del óptimo observado, mientras la de la variante no mutada era solo del 87% de su óptimo. De esta manera, el efecto simple de las mutaciones realizadas sobre la isoforma Pall NX-5, o su combinación con la glicosilación de la molécula, resultó en la mejora de este parámetro indicador de la termoestabilidad. El perfeccionamiento logrado en el perfil de actividad frente a la temperatura (Figura 27) no solo es importante en el contexto de la isoforma Pall NX-5, ya que la mayoría de las sacarosa isomerasas presentan una temperatura óptima de entre 30 y 35 °C (Mu *et al.*, 2014; Zhan *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2019b; Zhang *et al.*, 2018).



**Figura 27.** Influencia de la temperatura sobre la actividad de las variantes no mutada y mutantes de la sacarosa isomerasa recombinante Pall NX-5 expresada en *K. phaffii* X33.

La termoestabilidad de las variantes de la Pall NX-5 se evaluó incubando las enzimas en tampón de ácido cítrico/fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0), a una temperatura de 40 °C. Luego se ensayaron sus actividades residuales a diferentes tiempos de incubación. Como se muestra en la Figura 28, las termoestabilidades de los mutantes fueron superiores a la mostrada por la enzima no mutada, siendo la variante K174Q/L202E la que mostró el mejor desempeño. A 40 °C y pH 6,0, la vida media de la variante no mutada fue de 10.1 min. Mientras que las vidas medias de las variantes K174Q, L202E y K174Q/L202E fueron 22.3 min, 17.5 min y 29.2 min, respectivamente, que son 2.21, 1.73 y 2.89 veces mayores que las de la variante no mutada. Tanto el incremento observado en la temperatura óptima de los mutantes (Figura 27) y tiempos de vida medio (Figura 28), confirman que la estrategia integradora trazada en esta investigación, para lograr la termoestabilización de la sacarosa isomerasa Pall NX-5, fue exitosa.



**Figura 28.** Progresión de la actividad isomerasa residual de las variantes de la Pall NX-5 incubadas a 40 °C.

Dos factores centrales que influyen en la estabilidad térmica de una proteína son el aumento de los enlaces de hidrógeno (Gong *et al.*, 2019; Masakari *et al.*, 2020; You *et al.*, 2019) y los puentes salinos (Wang *et al.*, 2020b). Por ello, previamente se analizó la posible aparición de estas interacciones y observamos que asociado a las sustituciones K174Q y L202E había un refuerzo de la red de enlaces. Probablemente, la optimización de la red de enlaces y su combinación con la rigidez proporcionada por la N-glicosilación sean las claves de la mejora conseguida en la termoestabilidad de la sacarosa isomerasa Pall NX-5. Además, con la sustitución L202E, se eliminó un residuo apolar, reemplazándolo con uno polar/cargado. Precisamente, tal como plantea Khan *et al.* (2019), los residuos cargados tienen mayor abundancia en las proteínas termófilas que en las mesófilas.

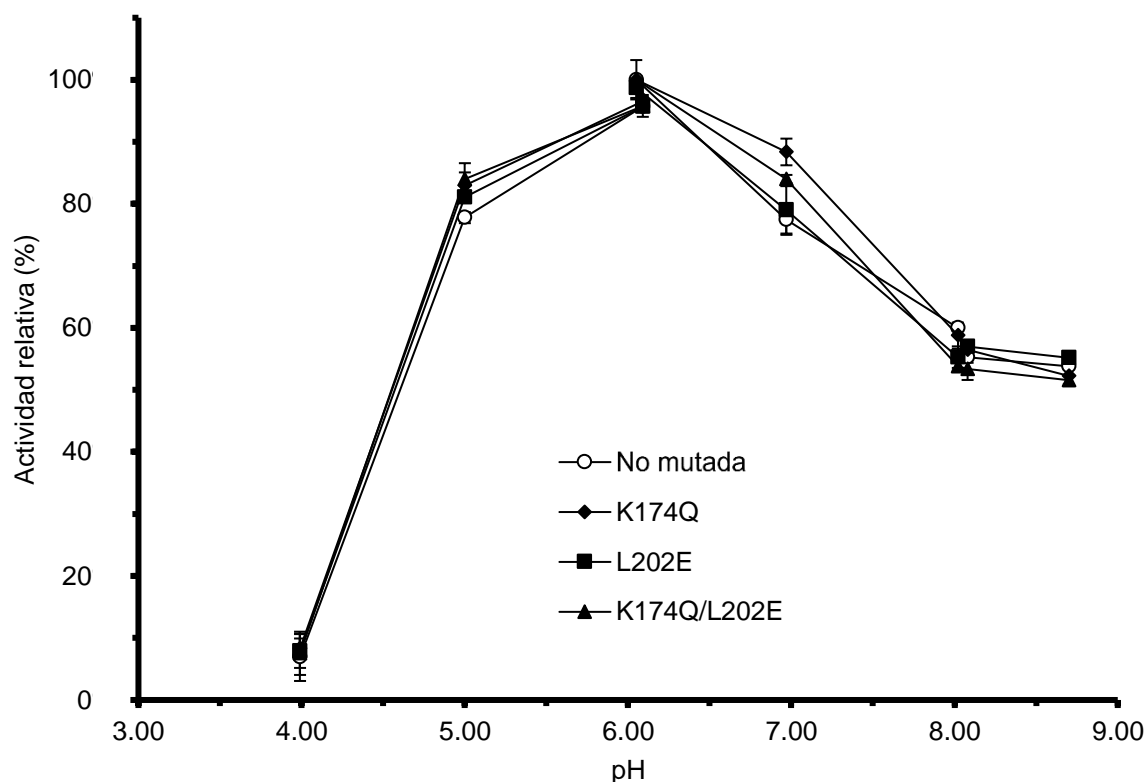
### **9.7. Influencia del pH sobre la actividad de las variantes de la sacarosa isomerasa recombinante Pall NX-5**

El estudio de la influencia del pH sobre la actividad de las variantes de la sacarosa isomerasa recombinante Pall NX-5 fue realizado para pH entre 4 y 9 (Figura 29). La variante no mutada de la Pall NX-5 mostró su actividad máxima a pH 6.0, coincidiendo con su contraparte silvestre expresada en *Erwinia rhapontici* NX-5 (Ren *et al.*, 2011). En general, los perfiles de actividad frente al pH de ambas variantes resultaron ser muy similares. Estos resultados indican que la glicosilación de la molécula no afectó significativamente el perfil de actividad frente al pH, cosa que también observó Han *et al.* (2020) durante la mejora de la estabilidad térmica de la endoglucanasa CTendo45 de *Chaetomium thermophilum*.

Tanto los mutantes como la variante no mutada mostraron el valor óptimo de pH a 6.0. Además, las sustituciones realizadas no afectaron sustancialmente el perfil de actividad frente al pH, el cual es muy similar entre las variantes analizadas. Un comportamiento análogo fue observado por Duan *et al.* (2016) durante la termoestabilización de la sacarosa isomerasa Pall AS9. De igual manera, Wang *et al.* (2020b) no observó cambios en el perfil de actividad enzimática frente al pH,



luego de realizar las sustituciones S<sup>142</sup>A, D<sup>217</sup>V, Q<sup>239</sup>F y S<sup>250</sup>Y, en la lipasa r27RCL de *Rhizopus chinensis*. Sin embargo, Wang *et al.* (2020b) si encontró diferencias al analizar la estabilidad de la variante de la lipasa r27RCL ante el pH. También Khan *et al.* (2019), durante la termoestabilización de la lipasa mesofílica de *Bacillus subtilis*, reportó cambios en el perfil de actividad enzimática frente al pH.



**Figura 29.** Influencia del pH sobre la actividad de las variantes de la sacarosa isomerasa recombinante Pall NX-5.

Muy pocas investigaciones abordan la mutagénesis dirigida al desplazamiento del pH óptimo de las enzimas. En general, las estrategias planteadas se centran en modificar las cargas superficiales de la molécula (Yang *et al.*, 1993), cambiar los valores de las constantes de disociación ácida de los residuos catalíticos (Dey *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019) y el llenado de cavidades (Nielsen *et al.*, 2000). De manera particular, Shi *et al.* (2022) reemplazó los aminoácidos cerca de los residuos catalíticos con el fin de modificar el pH óptimo de la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. Para ello tuvo en cuenta que en enzimas con catálisis ácido –

base, como las sacarosa isomerasas (Mu *et al.*, 2014), se requiere que los residuos del centro activo estén en un estado de protonación catalíticamente adecuado. Así, una posible explicación al comportamiento observado en la Figura 29, es el hecho de que las sustituciones realizadas (K<sup>174</sup>Q y L<sup>202</sup>E) se encuentran alejadas de los residuos catalíticos (Glu<sup>277</sup>, donante de protones y Asp<sup>223</sup>, nucleófilo), sin afectar su estado de protonación.

En la Figura 29 se observa que solo a pH superiores a 8 o inferiores a 5 ocurren pérdidas considerables de actividad. Este comportamiento, aunado a la mejora observada en la termoestabilidad, otorga a los mutantes de la Pall NX-5 una gran flexibilidad en lo que a aplicaciones industriales se refiere. Sea el caso en el contexto de un ingenio azucarero, donde las fluctuaciones operacionales demandan biocatalizadores flexibles, o en la mitigación del riesgo de contaminación microbiana a partir del ajuste del pH de operación de un reactor enzimático.

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

Los parámetros cinéticos de las variantes de la sacarosa isomerasa recombinante Pall NX-5 se midieron a 30 °C. Como se muestra en la Tabla VII, en comparación con el Pall NX-5 no mutada, los valores de  $K_m$  de los mutantes K174Q, L202E y K174Q/L202E disminuyeron en un 5.2%, 7.9% y 9.4%, respectivamente. Esto implica que, respecto a la variante no mutada, los mutantes presentan un aumento en la afinidad por el sustrato. Las variantes de Pall NX-5 analizadas en esta investigación mostraron valores de  $K_m$  en el mismo orden de magnitud que sus contrapartes: de tipo silvestre (Ren *et al.*, 2011) y recombinante (Li *et al.*, 2011). Además, con respecto al informe de Ren *et al.* (2011), la variante no mutada y los mutantes K174Q, L202E y K174Q/L202E aumentaron su actividad específica en un 14.4%, 25.3%, 20.3% y 20.4%, respectivamente. Finalmente, los mutantes mostraron constantes catalíticas ( $k_{cat}$ ) y eficiencias catalíticas ( $k_{cat}/K_m$ ) mejoradas. Así, la eficiencia catalítica de los mutantes aumentó hasta en un 16%.

**Tabla VII.** Evaluación y comparación de los parámetros cinéticos de las variantes de la Pall NX-5 con otras isoformas de sacarosa isomerasa.

Variante/Isoforma	Actividad específica (U/mg)	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1}mM^{-1}$ )	Referencias
No mutada Pall NX-5	483.8 ± 6.9	255.1 ± 9.6	564.5 ± 1.0	2.21 ± 0.13	Esta investigación
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	
Silvestre Pall NX-5	423	222	NR	NR	(Ren <i>et al.</i> , 2011)
Recombinante Pall NX-5	NR	257	NR	NR	(Li <i>et al.</i> , 2011)
Recombinante CBS 574.77	NR	32.4	42152.4*	1301	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
Recombinante UQ68J	562	40	71.6*	1.79	(Wu <i>et al.</i> , 2005)
Recombinante UQ14S	351	76	47.0*	0.62	(Wu <i>et al.</i> , 2005)
Recombinante LX3	328	54.6	14.7*	0.27	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
Recombinante AS9	957.5	30.1	992.8	33	(Duan <i>et al.</i> , 2016)
Recombinante Ejp617	118.87	69.28	NR	NR	(Zhang <i>et al.</i> , 2021a)

\*Calculado a partir de los datos proporcionados por los manuscritos y la relación  $k_{cat}/K_m$ .

NR: No reportado.

Como se puede observar en la Tabla VII, los mutantes diseñados presentan una catálisis optimizada con respecto tanto a la variante no mutada de la Pall NX-5 como a la de tipo silvestre expresada en *E. rhapontici* NX-5. Estos resultados demuestran que el enfoque integrador seguido, puede mejorar la termoestabilidad sin sacrificar la actividad catalítica. Reportes como los de Ren *et al.* (2020), Duan *et al.* (2016), Pang *et al.* (2020), Teng *et al.* (2019) y Ban *et al.* (2020) han expuesto que la actividad enzimática puede mejorar cuando se perfecciona la termoestabilidad. Teniendo en cuenta esto, trabajos como el de Liu *et al.* (2021) han centrado su atención en el incremento de la actividad enzimática usando estrategias de optimización de la estabilidad térmica. De forma particular, Duan *et al.* (2016) justificó el incremento de la actividad planteando que las sustituciones realizadas (E<sup>175</sup>N y K<sup>576</sup>D) fueron lejos del centro catalítico y de la región de isomerización. Así, las mutaciones pudieron haber causado que estas regiones fueran más compactas, produciendo un efecto positivo en los parámetros

cinéticos. Hipótesis que sería aplicable en esta investigación, ya que tanto las sustituciones realizadas en la Pall NX-5 (K<sup>174</sup>Q y L<sup>202</sup>E) como los sitios potenciales para N – glicosilación (<sup>530</sup>NNS<sup>532</sup> y <sup>573</sup>NNS<sup>575</sup>), se encuentran en la periferia de la molécula, alejados del sitio activo.

Como se muestra en la Tabla VIII, las isoformas de sacarosa isomerasas comparten homologías de secuencia y proximidades evolutivas considerablemente altas. Por ejemplo, las variantes de la sacarosa isomerasa Pall NX-5, analizadas en esta investigación, comparten entre 99.83 y 99.67% de identidad en sus secuencias de aminoácidos. Asimismo, la isoforma Pall NX-5 comparte un porcentaje de identidad de 71.33, 81.30 y 84.56% con las isoformas de *Pantoea dispersa* UQ68J (Wu *et al.*, 2005), *Serratia plymuthica* AS9 (Huntemann *et al.*, 2011) y *Protaminobacter rubrum* CBS 574,77 (Lee *et al.*, 2008), respectivamente. A pesar de las altas homologías que se muestran en la Tabla VIII y la naturaleza altamente conservada de las regiones catalíticamente importantes en la estructura de la molécula (Duan *et al.*, 2016; Jung *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2005), existen diferencias significativas entre los parámetros cinéticos que exhiben las isoformas de sacarosa isomerasas (Tabla VII). De esta forma, el número de residuos que varían entre sacarosa isomerasas tiene una influencia significativa en su comportamiento cinético, como lo confirma esta investigación. La simple sustitución de un residuo puede alterar los parámetros cinéticos del biocatalizador. Esta variación puede ser más o menos significativa según el número de residuos sustitutos, la naturaleza de los residuos sustitutos y la posición que ocupan estos residuos. Por ejemplo, aun cuando la isoforma Pall NX-5 K174Q/L202E comparte una identidad del 84.20% (92% de cobertura) con la isoforma recombinante CBS 574.77 (Lee *et al.*, 2008), la eficiencia catalítica de esta última es 506 veces mayor. Más extrema es la comparación entre las isoformas recombinantes AS9 (Duan *et al.*, 2016) y CBS 574.77 (Lee *et al.*, 2008); aun cuando comparten una identidad del 99.82% (Cobertura 93%), la eficiencia catalítica de este último es 40 veces mayor.

Las diferencias cinéticas entre las sacarosa isomerasas hacen que algunas isoformas sean más adecuadas para aplicaciones industriales. Así, más allá del aumento observado en la temperatura óptima y vida media de los mutantes K174Q, L202E y K174Q/L202E; también se mejoraron los parámetros cinéticos de estas variantes. Lo que, en conjunto, hace que estos mutantes sean más atractivos para el desarrollo de aplicaciones industriales en comparación con sus contrapartes: no mutada, de tipo silvestre (Ren *et al.*, 2011) y recombinante (Li *et al.*, 2011). Sin embargo, desde el punto de vista cinético, las variantes Pall NX-5 son inferiores a las isoformas recombinantes AS9 (Duan *et al.*, 2016) y CBS 574.77 (Lee *et al.*, 2008) (Tabla VII). Por ejemplo, los valores de  $K_m$  de las isoformas recombinantes AS9 (Duan *et al.*, 2016) y CBS 574.77 (Lee *et al.*, 2008) son aproximadamente 7 veces menores que el valor de  $K_m$  del mutante K174Q/L202E.  $K_m$  compara las tasas de unión y disociación sustrato-enzima. Por lo tanto, valores más pequeños de  $K_m$  sugieren una mayor afinidad enzima-sustrato (Bommarius *et al.*, 2013). Asimismo, las eficiencias catalíticas de las isoformas recombinantes AS9 (Duan *et al.*, 2016) y CBS 574.77 (Lee *et al.*, 2008) son entre 13 y 500 veces superiores a las mostradas por el mutante K174Q/L202E. Las eficiencias catalíticas más altas sugieren que la enzima es más eficiente para convertir un sustrato en producto (Chapman *et al.*, 2018). Por otro lado, los valores de  $K_m$  de las isoformas recombinantes UQ68J (Wu *et al.*, 2005), LX3 (Zhang *et al.*, 2002) y UQ14S (Wu *et al.*, 2005) son entre 3 y 6 veces inferiores al mostrado por el mutante K174Q/L202E. Sin embargo, las eficiencias catalíticas de estas isoformas son entre 1.4 y 9.5 veces inferiores a las mostradas por el mutante K174Q/L202E.

**Tabla VIII.** Análisis de identidad de secuencia de aminoácidos y distancias evolutivas entre isoformas de sacarosa isomerasas.

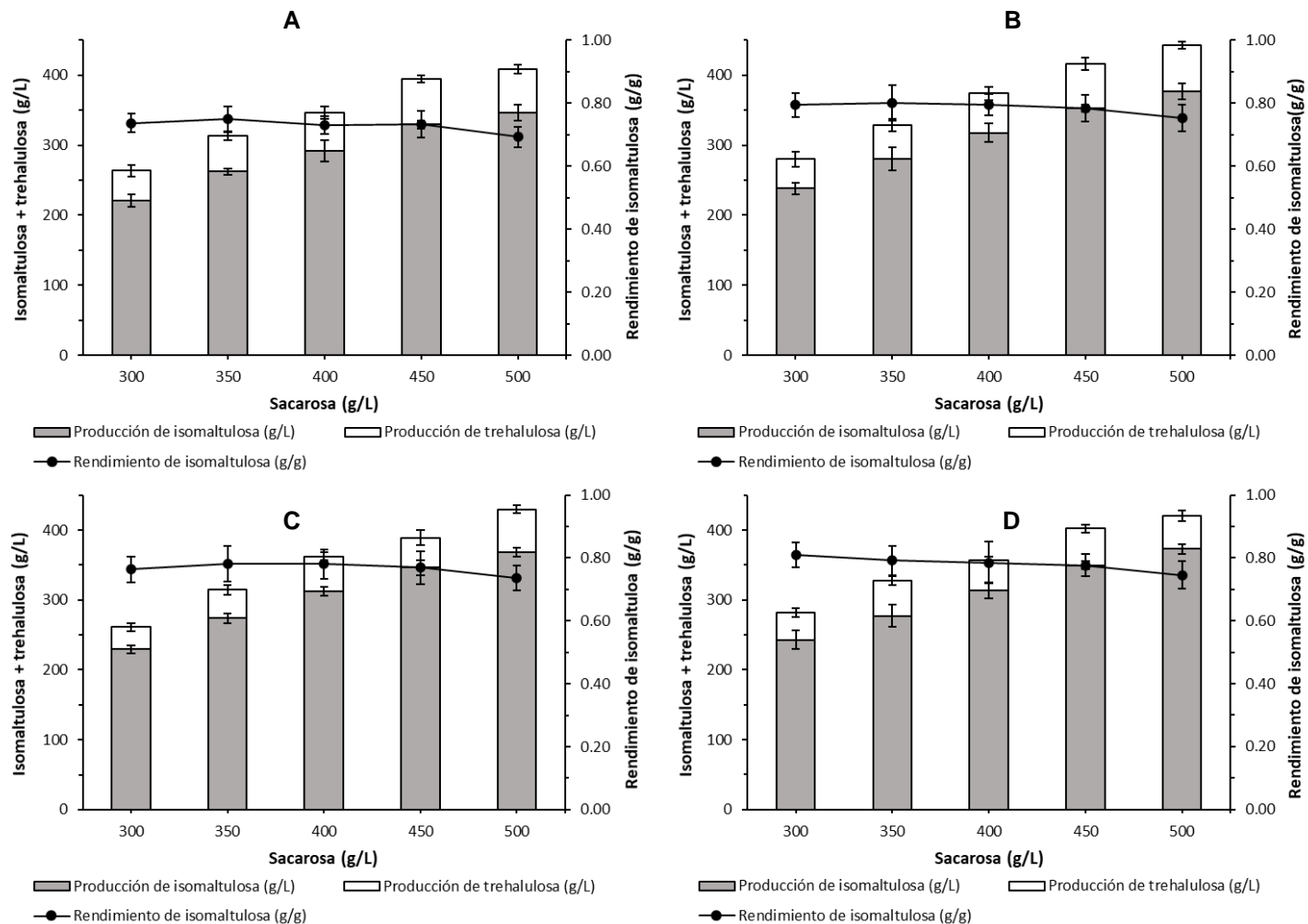
#	Variante/Isoforma	GenBank	Distancias evolutivas (abajo *) <sup>1</sup> / Porcentaje de identidad (arriba *) <sup>2</sup>									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Sacarosa isomerasa Pall NX-5	ADJ56407.2	*	99.83	99.83	99.67	84.56	71.33	74.16	73.68	81.30	74.92
2	Sacarosa isomerasa Pall NX-5 K174Q	-	0.0017	*	99.67	99.83	84.38	71.17	73.98	73.51	81.14	74.75
3	Sacarosa isomerasa Pall NX-5 L202E	-	0.0017	0.0033	*	99.83	84.38	71.17	73.98	73.51	81.14	74.75
4	Sacarosa isomerasa Pall NX-5 K174Q/L202E	-	0.0033	0.0033	0.0017	*	84.20	71.00	73.79	73.33	80.97	74.58
5	Sacarosa isomerasa CBS 574.77	3GBE_A	0.1695	0.1716	0.1716	0.1738	*	74.64	76.21	76.90	99.82	76.62
6	Sacarosa isomerasa UQ68J	AAP57083.1	0.3415	0.3439	0.3439	0.3462	0.2943	*	71.75	71.89	71.09	70.88
7	Sacarosa isomerasa UQ14S	AAP57085.1	0.2989	0.3014	0.3014	0.3039	0.2741	0.3320	*	99.26	76.02	73.05
8	Sacarosa isomerasa LX3	1M53_A	0.3126	0.3150	0.3150	0.3174	0.2687	0.3425	0.0075	*	75.22	73.26
9	Sacarosa isomerasa AS9	AEF45387.1	0.2087	0.2107	0.2107	0.2128	0.0018	0.3439	0.2766	0.2935	*	72.29
10	Sacarosa isomerasa Ejp617	ADP12651.1	0.2949	0.2972	0.2972	0.2994	0.2681	0.3486	0.3192	0.3319	0.3245	*

<sup>1</sup> Las distancias evolutivas se determinaron utilizando el software MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021).

<sup>2</sup> Las comparaciones de secuencias de aminoácidos se realizaron utilizando Blast<sup>®</sup> (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 9.9. Comparación de la producción de isomaltulosa entre las variantes de la Pall NX-5

Se emplearon concentraciones de sacarosa de 300 a 500 g·L<sup>-1</sup> para investigar su efecto sobre la actividad isomerasa y los rendimientos de producción de isomaltulosa usando las variantes de la Pall NX-5. Las condiciones de reacción se establecieron en función de los óptimos de temperatura y pH que mostraron los mutantes (35 °C y pH 6). Para todas las concentraciones de sacarosa probadas, los rendimientos de isomaltulosa se mantuvieron en valores promedios de 0.73 ± 0.04 g<sub>isomaltulosa</sub>·g<sup>-1</sup><sub>sacarosa</sub> (Pall NX-5 no mutada), 0.78 ± 0.04 g<sub>isomaltulosa</sub>·g<sup>-1</sup><sub>sacarosa</sub> (Pall NX-5 K174Q), 0.77 ± 0.05 g<sub>isomaltulosa</sub>·g<sup>-1</sup><sub>sacarosa</sub> (Pall NX-5 L202E) y 0.78 ± 0.05 g<sub>isomaltulosa</sub>·g<sup>-1</sup><sub>sacarosa</sub> (Pall NX-5 K174Q/L202E). De esta manera, los mutantes K174Q, L202E y K174Q/L202E produjeron un 7.5%, un 5.4% y un 7.1% más de isomaltulosa que la variante no mutada, respectivamente (Figura 30). Estos resultados ratifican que los mutantes K174Q, L202E y K174Q/L202E son mejores opciones para aplicaciones industriales que la variante no mutada de la Pall NX-5. El análisis de ANOVA de un solo factor mostró que la concentración de sacarosa no tuvo una influencia estadísticamente significativa sobre el rendimiento de isomaltulosa. Sin embargo, en cada una de las variantes de la Pall NX-5 se observó, como tendencia, una reducción en el rendimiento cuando la concentración de sacarosa fue de 500 g·L<sup>-1</sup>. En este sentido, Li *et al.* (2017), Zhang *et al.* (2021a) y Zhang *et al.* (2019b) plantearon que una mayor concentración de sustrato podría resultar en un menor rendimiento del producto debido a la mayor viscosidad de la mezcla de reacción, lo que afectaría la transferencia de masa y la eficiencia catalítica de la enzima.



**Figura 30.** Comparación de la producción de isomaltulosa por la enzima no mutada y sus variantes frente a la concentración de sacarosa. A, efectos de la concentración de sacarosa en la producción de isomaltulosa por la sacarosa isomerasa Pall NX-5 no mutada. B, efectos de la concentración de sacarosa en la producción de isomaltulosa por la sacarosa isomerasa Pall NX-5 K174Q. C, efectos de la concentración de sacarosa en la producción de isomaltulosa por la sacarosa isomerasa Pall NX-5 L202E. D, efectos de la concentración de sacarosa en la producción de isomaltulosa por la sacarosa isomerasa Pall NX-5 K174Q/L202E.



Los rendimientos de isomaltulosa obtenidos, resultaron comparables al rendimiento del 80.5 y 78.4% reportados por (Zhang *et al.*, 2021a) para la isoforma recombinante de *Erwinia* sp. Ejp617, luego de 180 min de reacción usando la enzima libre. Asimismo, rendimientos similares (78.4 – 76.3%) fueron obtenidos por Duan *et al.* (2016) para la isoforma recombinante de *Serratia plymuthica* AS9, luego de 480 min de reacción usando la enzima libre. También resulta comparable el rendimiento, de hasta un 7%, obtenido por Kawaguti *et al.* (2010b) a partir del uso de células inmovilizadas de *Erwinia* sp. D12. De manera particular, Li *et al.* (2011) evaluó los rendimientos de isomaltulosa de la isoforma silvestre de la Pall NX-5 y recombinante usando células inmovilizadas de *E. rhapontici* NX-5 y *E. coli* BL21(DE3), respectivamente. Bajo esta estrategia experimental el rendimiento obtenido por Li *et al.* (2011) es del 87%, el cual es un 11% superior al mayor rendimiento obtenido en esta investigación. Por su parte, Zhan *et al.* (2020) optimizó la biotransformación de sacarosa a isomaltulosa usando la isoforma Pall NX-5 anclada a esporas de *Bacillus subtilis* 168. De esta manera Zhan *et al.* (2020) reportó un rendimiento del 92% en la producción de isomaltulosa, el valor máximo que ha sido reportado hasta el momento para la isoforma Pall NX-5. En el contexto del uso de sacarosa isomerasas inmovilizadas, ya sea ancladas a la superficie de células o atrapadas en alginato, Li *et al.* (2017) y Zhang *et al.* (2019b) reportan rendimientos de isomaltulosa para la isoforma de *Pantoea dispersa* UQ68J de 0.93 y 0.96 g<sub>isomaltulosa</sub>·g<sup>-1</sup><sub>sacarosa</sub>, respectivamente. Precisamente, estos valores corresponden a los máximos que han sido reportados hasta el momento para cualquier isoforma de sacarosa isomerasa.

En cuanto a la proporción de trehalulosa en la mezcla final de las reacciones, se observó que en promedio estas fueron del 14%. Dicho valor es comparable al 15% de trehalulosa reportado por Li *et al.* (2011) luego de la acción enzimática de la isoforma Pall NX-5. En sentido general, la proporción de azúcares en la mezcla final de las reacciones varía según la isoforma de la enzima y las condiciones de reacción (Mu *et al.*, 2014). De esta manera la proporción de isomaltulosa puede variar entre el 63 y el 90% (Cho *et al.*, 2007; Tsuyuki *et al.*, 1992), mientras la de

trehalulosa usualmente varía entre el 4 y el 30% (Tsuyuki *et al.*, 1992) (Wu *et al.*, 2005), aunque las sacarosa isomerasas de *A. radiobacter* MX-232 (Nagai-Miyata *et al.*, 1993) y *P. mesoacidophila* MX-45 (Miyata *et al.*, 1992) producen hasta un 88% de trehalulosa.

## **9.10. Propuesta de un proceso de producción de isomaltulosa**

### **9.10.1. Propuesta de un mutante para aplicaciones industriales**

Desde el punto de vista cinético y de la termoestabilidad, los mutantes diseñados son opciones más adecuadas para aplicaciones industriales que sus contrapartes: no mutada, silvestre (Ren *et al.*, 2011) y recombinante (Li *et al.*, 2011). El incremento de la temperatura sin afectar dramáticamente la actividad de la sacarosa isomerasa durante la producción de isomaltulosa, permitirá el decremento de la viscosidad de la mezcla de reacción, mayor solubilidad de la sacarosa, e incremento en la tasa de transferencia de masa, así como la disminución del riesgo de contaminación microbiana (Singh *et al.*, 2015; Turner *et al.*, 2007), elementos que harán más eficaz y eficiente la operación de un reactor enzimático. Entre las variantes diseñadas, el mutante K174Q mostró el perfil más robusto de actividad frente a la temperatura (Figura 27) y la mayor tasa de producción de isomaltulosa (Figura 30). Asimismo, la vida media y la eficiencia catalítica del mutante K174Q son comparables al mayor valor obtenido (Tabla VII). Así, de las variantes diseñadas, el mutante K174Q sería la mejor opción para una aplicación industrial. Precisamente, la sacarosa isomerasa Pall NX-5 K174Q fue la variante seleccionada durante la simulación de la producción de isomaltulosa.

### **9.10.2. Diseño y evaluación del proceso con SuperPro Designer®**

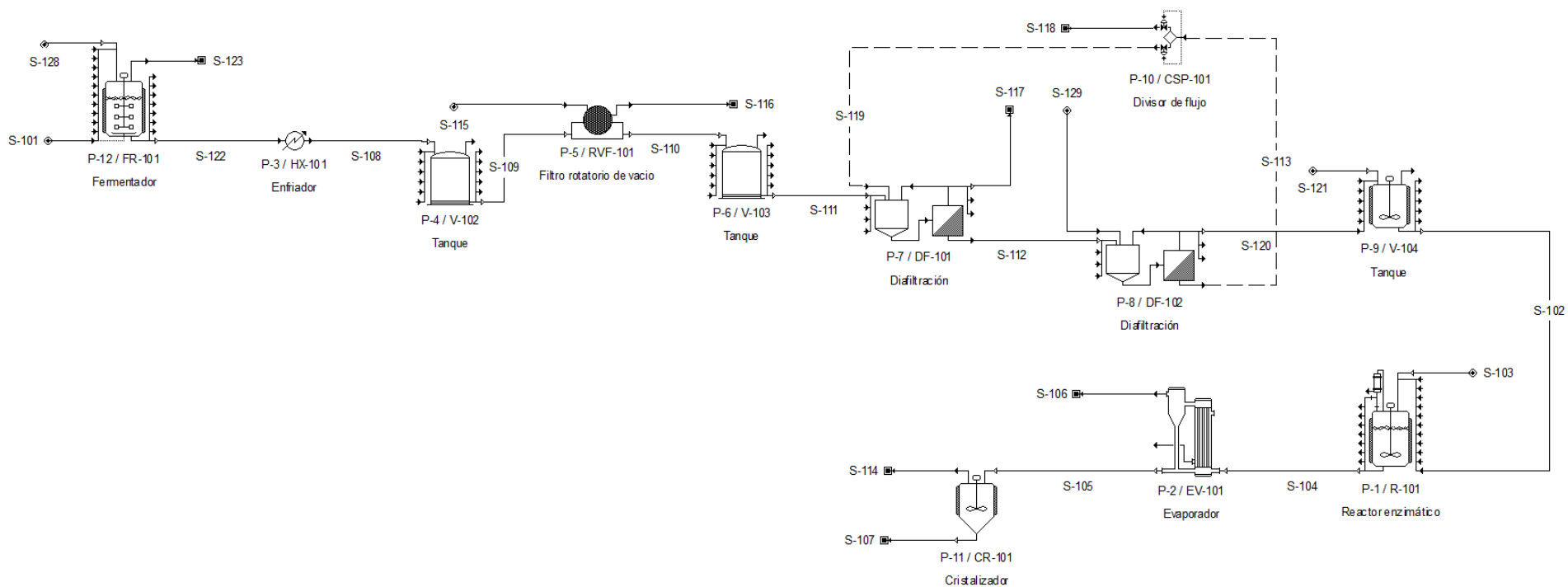
En la Figura 31 se muestra el diagrama de flujo del proceso de producción de isomaltulosa (caso base), el cual incluye los equipos principales y operaciones unitarias necesarias para la operación general. Al resolver los balances de materia y energía, se obtuvo que, partiendo de un volumen efectivo de 30 L en el

fermentador de producción, se obtendrán  $24 \text{ kg}\cdot\text{batch}^{-1}$  de mezcla de azúcares (79% isomaltulosa, 14% trehalulosa y 7% sacarosa).

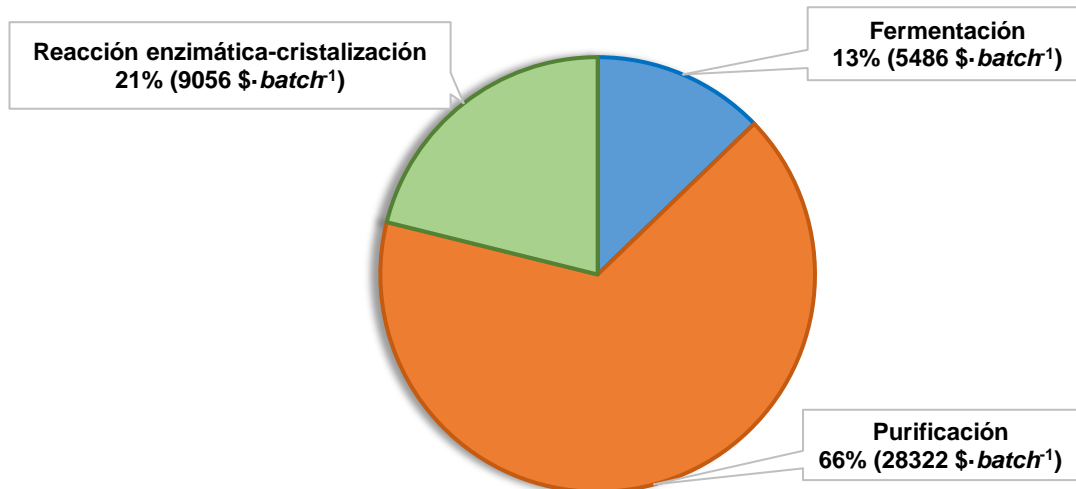
Con un costo de producción de isomaltulosa que ascendería a  $1779 \text{ \$}\cdot\text{kg}^{-1}_{\text{isomaltulosa}}$ , frente a un costo de mercado de  $600 \text{ \$}\cdot\text{kg}^{-1}_{\text{isomaltulosa}}$  (<https://nutrivida.mx/>, consultado 18/09/2023), el proceso “caso base” propuesto no es rentable. No obstante, el análisis económico indica que el costo de obtener la sacarosa isomerasa Pall NX-5 K174Q representa el 79% del costo total de producir isomaltulosa (Figura 32). De esta manera, mejorar la eficiencia en el uso de la enzima pudiera incidir dramáticamente en los costos de producción. La estrategia propuesta contempla una etapa de reacción enzimática, la cual tiene lugar en un reactor de tipo tanque agitado operado en modo discontinuo, por lo que la enzima es usada de manera soluble y cada *batch* requiere una nueva carga del biocatalizador. Una alternativa que permitiría dar solución a este problema es operar en modo continuo con un reactor de lecho empacado, en este caso la enzima se encontraría inmovilizada en el soporte sólido que constituiría el empaque.

La inmovilización enzimática ha estado a la vanguardia de la biocatálisis aplicada, ya que facilita la reutilización del catalizador, simplifica el procesamiento del producto y potencialmente aumenta la estabilidad de la enzima (Rodrigues *et al.*, 2013). Asimismo, la inmovilización enzimática ha abierto importantes oportunidades para realizar la biocatálisis en modo continuo (Romero-Fernández *et al.*, 2020). En este sentido, los sistemas de flujo continuo ofrecen ventajas de transferencia de masa, control térmico, procesamiento presurizado, menor variación de los parámetros de operación, automatización, purificación en línea y la reducción de tiempos muertos (Britton *et al.*, 2018). La operación continua con enzimas inmovilizadas se ha desarrollado usando dos enfoques principales; las enzimas se inmovilizan en la pared del reactor (es decir, reactor revestido de pared) o en partículas (material soporte), que luego se empaquetan en un tubo (es decir, reactor de lecho empacado) (Lindeque *et al.*, 2019).

### "Proceso de producción de isomaltulosa, caso base"



**Figura 31.** Diagrama de flujo del proceso de producción de isomaltulosa, "caso base". Las letras "S" hacen referencia a corrientes. Las letras "P" indican operaciones unitarias. Los círculos señalan corrientes de entrada al sistema. Los cuadrados señalan corrientes que salen del sistema. El proceso inicia con la carga de los componentes del medio de cultivo a través de la línea S-101, mientras a través de la línea S-128 se inyecta aire de manera continua al fermentador. La línea S-123 indica la salida del CO<sub>2</sub> producto de la respiración celular y los gases inertes. Una vez terminada la etapa de producción de sacarosa isomerasa Pall NX-5 K174Q en el fermentador FR-101, el sobrenadante es enfriado a 12 °C en el enfriador HX-101 y seguidamente almacenado en el tanque V-102. Las células presentes en el sobrenadante son removidas mediante el filtro rotatorio RVF-101. El sobrenadante filtrado (línea S-110) es almacenado en el tanque V-103. Se utilizan dos filtros de flujo cruzado, un microfiltro (DF-101) y un ultrafiltro (DF-102), para purificar y concentrar la solución enzimática. El microfiltro funciona como un filtro de pulido que elimina las células residuales y los restos de células que no elimina el filtro de vacío giratorio. Esto se hace mediante el uso de una membrana filtrante cuyos poros son más pequeños que los de las células individuales, pero más grandes que las proteínas (normalmente 0.22 µm a 0.45 µm). El retenido del microfiltro (línea S-117) que contiene las impurezas retenidas por la membrana se dirige al tratamiento de residuos. El permeado del microfiltro (línea S-112) que contiene la enzima y los solutos sin reaccionar se bombea al ultrafiltro. La membrana de ultrafiltración retiene la enzima, pero permite el paso del agua y de impurezas de moléculas pequeñas. Una fracción de la corriente de filtrado del ultrafiltro se utiliza como diluyente en el microfiltro, líneas S-120 y S-119. En el tanque V-104 el glicerol es añadido (línea S-121) como agente estabilizante en la formulación. La reacción enzimática tiene lugar en el reactor R-101, la carga de la sacarosa ocurre a través de la línea S-103 para una concentración final de sacarosa de 420 g·L<sup>-1</sup>. El agua presente en la mezcla de azúcares es removida en un 90% mediante el evaporador EV-101. La cristalización de los azúcares presentes en el jarabe de la línea S-105 ocurre en el cristizador CR-101. Las líneas S-106 y S-114, corresponden a la salida de vapor de agua.



**Figura 32.** Costos por etapas del proceso de producción de isomaltulosa.

Numerosas estrategias han sido empleadas para la inmovilización enzimática, tales son los casos de la adsorción a materiales insolubles (Tomotani *et al.*, 2006), el atrapamiento en geles poliméricos (Curulli *et al.*, 2006), la encapsulación en membranas (Patel *et al.*, 2006), la reticulación con reactivos bifuncionales (Smiddy *et al.*, 2006) y el enlace covalente a portadores insolubles (Gao *et al.*, 2006). Específicamente, entre las sacarosa isomerasas los métodos de inmovilización empleados han incluido la reticulación (Wang *et al.*, 2019) el atrapamiento (Contesini *et al.*, 2012) y la adsorción (Contesini *et al.*, 2013). Específicamente, Wang *et al.* (2019) evaluó la estabilidad y reutilización de la sacarosa isomerasa Pall LX3, luego de su inmovilización mediante reticulación con glutaraldehído. Los resultados mostraron que la actividad enzimática residual del inmovilizado fue del 80% después de 12 ciclos de reutilización. Por su parte, Wu *et al.* (2015) enfocó su investigación en inmovilizar la sacarosa isomerasa Pall NX-5 en dióxido de titanio mesoporoso funcionalizado con  $\epsilon$ -poli-L-lisina. La Pall NX-5 inmovilizada mostró una excelente estabilidad operativa, con una vida media de hasta 114 h de reacción continua, mientras en operación discontinua la actividad se mantuvo en alrededor del 95% después de 16 ciclos. Así, las características de la variante Pall NX-5 K174Q aunadas a una estrategia de inmovilización y reacción adecuada, permitirían la reutilización del biocatalizador y, por lo tanto, la reducción de los

costos asociados a la operación (Choi *et al.*, 2015; Cicerone *et al.*, 2015; Kazlauskas, 2018), incidiendo así en el estigma de los costos al trabajar con enzimas (Wu *et al.*, 2020).

Adicionalmente a la inmovilización y al modo de operación del reactor enzimático, otra alternativa para mejorar la eficiencia del uso de la enzima recae en las características del biocatalizador utilizado. Como se discutió en la sección "9.8", a pesar de que los mutantes diseñados de la Pall NX-5 son mejores opciones que sus contrapartes de tipo silvestre (Ren *et al.*, 2011) y recombinante (Li *et al.*, 2011); isoformas de sacarosa isomerasas como la CBS 574.77 (Lee *et al.*, 2008), muestran mejor desempeño cinético (Tabla VII). De esta manera, termoestabilizar otras isoformas de sacarosa isomerasas es conveniente para la producción de isomaltulosa.

A un cuando la termoestabilidad de las sacarosa isomerasas es un limitante y que múltiples reportes han examinado a profundidad su relación estructura función (Ravaud *et al.*, 2007, 2009; Xu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2003), las investigaciones enfocadas al mejoramiento de la estabilidad térmica de sacarosa isomerasas usando ingeniería de proteínas son muy escasas. Así, las características de enzimas GH13 termoestables, como la  $\alpha$ -amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* B4-423 (Wu *et al.*, 2018), hacen de estas un nicho, aun inexplorado, para el diseño de sacarosa isomerasas con características novedosas. Téngase en consideración que la familia GH13 presenta su estructura y mecanismo altamente conservado entre sus miembros. De esta manera, tanto los modelos de homología (basados en secuencias), como el diseño basado en estructuras, pudieran ser una alternativa en la detección de "puntos calientes" que afectan la termoestabilidad. Estos enfoques de diseño racional, seguidos de un análisis estructural *in silico*, facilitarían el diseño de sacarosa isomerasas mutantes y quiméricas con una red de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas potenciadas. Por ejemplo, Cui *et al.* (2022) empleó el diseño basado en secuencias para mejorar la actividad específica y la termoestabilidad de la  $\alpha$ -amilasa BLA de *Bacillus licheniformis*. Con

este enfoque Cui *et al.* (2022) diseñaron el mutante Q<sup>360</sup>C el cual mostró una actividad residual 1.27 veces más alta que la variante silvestre, después de 30 min de incubación a 70 °C. Este resultado sugiere que un enfoque basado en el alineamiento múltiple de secuencia es viable en la termoestabilización de otras enzimas de la familia GH13, como las sacarosa isomerasas.

Tampoco el truncamiento ha sido implementado en la termoestabilización de sacarosa isomerasas. No obstante, en algunos miembros de la familia GH13 se ha seguido este enfoque, tal es el caso de la  $\alpha$ -amilasa alcalina (Amy703) de *Bacillus pseudofirmus* 703. Esta enzima fue truncada en el dominio N-terminal por Lu *et al.* (2016), quienes desarrollaron el mutante N-Amy. Dicho mutante mostró una  $T_{op}$  de 50 °C, 10 °C más elevada que la de Amy703. De esta forma, una potencial termoestabilización de las sacarosa isomerasas al truncar segmentos del dominio B (rico en bucles) resulta muy interesante a futuro. Pero más allá de esto, realizar actividades de ingeniería de proteínas en el dominio B podría ayudar a discernir la función de este dentro de las sacarosa isomerasas. En este sentido, trabajos como los de Feller *et al.* (2021) y Rhimi *et al.* (2023) han usado el truncamiento de segmentos con bucles flexibles en enzimas GH13, para elucidar su papel en la tolerancia a inhibidores y el mejoramiento de la actividad enzimática.

La ciclación es una estrategia para mejorar la entropía del estado plegado de una proteína. A grandes rasgos, la ciclación busca conectar los extremos N y C de la cadena aminoacídica de una proteína. Usualmente, las regiones N y C-terminales suelen ser las partes más flexibles de la columna vertebral de la proteína (Wang *et al.*, 2016). En el contexto de la familia GH13 la ciclación enzimática ha sido desarrollada con éxito, tal es el caso de la investigación desarrollada por Chen *et al.* (2021) para la termoestabilización de la trehalosa sintasa (TreS) de *Thermomonospora curvata*. En su estudio, Chen *et al.* (2021) observó que en el caso de la TreS, la ciclación condujo a un aumento mucho mayor de la termoestabilidad que el logrado mediante mutagénesis dirigida. Cabe señalar que, hasta la fecha, los acercamientos de termoestabilización de sacarosa isomerasas

han utilizado como enfoque esencial la mutagénesis dirigida al sitio, por lo que sería interesante evaluar el efecto de un enfoque basado en ciclación. No obstante, se debe apuntar que en ingeniería de proteínas no existen estrategias universales. La introducción de inteínas puede desestabilizar una proteína debido a restricciones estéricas en la conformación plegada, lo que limita la aplicación de la ciclación de proteínas (Xu *et al.*, 2020a).

Más allá de la ingeniería de proteínas, las estrategias basadas en modificaciones químicas, también permiten la mejora de la estabilidad de las enzimas (Ismaya *et al.*, 2013). Así por ejemplo, la PEGylación ha sido utilizada en la mejora de la estabilidad de la  $\alpha$ -amilasa de *Saccharomycopsis fibuligera* (Ismaya *et al.*, 2013), permitiendo incrementar en 5 °C la  $T_{op}$  de trabajo de la enzima. Srivastava (1991) y Klibanov (1983) plantean que los polisacáridos unidos a las enzimas durante la conjugación, proporcionan rigidez e hidratación al mejorar su estabilidad. En este sentido, Villalonga *et al.* (1999) conjugó la  $\alpha$ -amilasa pancreática porcina (EC 3.2.1.1) con carboximetilcelulosa. Como resultado la termoestabilidad de la  $\alpha$ -amilasa conjugada mejoró significativamente. Mientras la enzima nativa quedaba inactiva a 55°C, el conjugado mostraba una pérdida completa de actividad a partir de los 70 °C. Según señala Villalonga *et al.* (1999), el conjugado mostró mayor resistencia a la acción de agentes desnaturizantes como la urea y el dodecilsulfato de sodio. Siendo notable el hecho de que este tipo de mejoras no se consiguen usualmente con las técnicas tradicionales de ingeniería de proteínas. A pesar de ello, hasta la fecha ninguna estrategia basada en la modificación química ha sido empleada en la termoestabilización de sacarosa isomerasas.



## X. CONCLUSIONES

1. La estrategia integradora diseñada fue exitosa y su ejecución no comprometió la actividad catalítica de la sacarosa isomerasa Pall NX-5.
2. Desde el punto de vista cinético y de la termoestabilidad, las sacarosa isomerasas Pall NX-5 K174Q, Pall NX-5 L202E y Pall NX-5 K174Q/L202E son opciones más adecuadas para aplicaciones industriales que sus contrapartes: no mutada (esta investigación), de tipo silvestre (de *Erwinia rhapontici* NX-5) y recombinantes (de *Escherichia coli* BL21(DE3)).
3. Entre las variantes diseñadas de la sacarosa isomerasa Pall NX-5, el mutante K174Q mostró el perfil más robusto de actividad frente a la temperatura y la mayor tasa de producción de isomaltulosa; asimismo, la vida media y la eficiencia catalítica del mutante K174Q son comparables a las del doble mutante. Por esta razón, el mutante K174Q es la mejor opción para una aplicación industrial.
4. La producción de isomaltulosa a escala piloto con el proceso diseñado (caso base) no es económicamente viable; sin embargo, alternativas como la inmovilización enzimática, operación continua en el reactor enzimático o el uso de variantes termoestables de isoformas de sacarosa isomerasas con mejor desempeño cinético, podrían incidir positivamente en los costos de producción.

## XI. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la influencia de la N-glicosilación de la sacarosa isomerasa Pall NX-5 sobre la cinética y termoestabilidad de la molécula, mediante estrategias de deglicosilación usando Peptido:N-glicosidasa F (PNGasa F) o la expresión de la enzima en hospederos procariontes.
2. Evaluar estrategias alternativas de termoestabilización como: los modelos de homología, el truncamiento, la ciclación, la quimerización y la PEGylación, que han dado resultados positivos en enzimas GH13 y constituyen un nicho aun inexplorado entre las sacarosa isomerasas.
3. Inmovilizar las variantes mejoradas de la sacarosa isomerasa Pall NX-5, u otra isoforma termoestable de esta enzima, como una estrategia que potencialmente permitirá una mejora adicional en la estabilidad y la vida útil de la molécula, así como la disminución de los costos durante la producción de isomaltulosa.
4. Evaluar económicamente el impacto de la inmovilización enzimática, operación continua en el reactor enzimático y el uso de variantes termoestables de isoformas de sacarosa isomerasas con mejor desempeño cinético, sobre la producción de isomaltulosa usando como punto de partida el caso base.

## XII. REFERENCIAS

- A.D.A. (2017). Standards of medical care in diabetes—2017 abridged for primary care providers. *Clinical diabetes: a publication of the American Diabetes Association*, 35(1), 5.
- A.D.A. (2019). Standards of medical care in diabetes—2019 abridged for primary care providers. *Clinical Diabetes*, 37(1), 11-34.
- Achten, J., Jentjens, R. L., Brouns, F., y Jeukendrup, A. E. (2007). Exogenous oxidation of isomaltulose is lower than that of sucrose during exercise in men. *The Journal of nutrition*, 137(5), 1143-1148.
- Adney, W. S., Jeoh, T., Beckham, G. T., Chou, Y.-C., *et al.* (2009). Probing the role of N-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis. *Cellulose*, 16(4), 699-709.
- Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S., y Molinari, M. (2010). N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends in biochemical sciences*, 35(2), 74-82.
- Ali, M., Ishqi, H. M., y Husain, Q. (2020). Enzyme engineering: Reshaping the biocatalytic functions. 117(6), 1877-1894.
- Alnur, A., Sakinah, M., Mustafa, A.-B., Kamarudin, H., *et al.* (2013). Simulation of xylitol production: a review. 7(5), 366-372.
- Aroonual, A., Nihira, T., Seki, T., y Panbangred, W. (2007). Role of several key residues in the catalytic activity of sucrose isomerase from *Klebsiella pneumoniae* NK33-98-8. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1221-1227.
- Athimulam, A., Kumaresan, S., Foo, D., Sarmidi, M., *et al.* (2006). Modelling and optimization of *Eurycoma longifolia* water extract production. 84(2), 139-149.
- Auiewiriyankul, W., Saburi, W., Kato, K., Yao, M., *et al.* (2018). Function and structure of GH 13\_31  $\alpha$ -glucosidase with high  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucosidic linkage specificity and transglucosylation activity. *FEBS letters*, 592(13), 2268-2281.

- Azúcar, C. N. (2020). Reporte mensual del mercado de azúcar. Retrieved from [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/536746/Reporte\\_Mercados\\_004\\_202001.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/536746/Reporte_Mercados_004_202001.pdf)
- Ban, X., Wang, T., Fan, W., Li, C., *et al.* (2023). Thermostability and catalytic ability enhancements of 1, 4- $\alpha$ -glucan branching enzyme by introducing salt bridges at flexible amino acid sites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 224, 1276-1282.
- Ban, X., Wu, J., Kaustubh, B., Lahiri, P., *et al.* (2020). Additional salt bridges improve the thermostability of 1, 4- $\alpha$ -glucan branching enzyme. *Food chemistry*, 316, 126348.
- Barrero, J. J., Casler, J. C., Valero, F., Ferrer, P., *et al.* (2018). An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1-13.
- Basheer, S. M., y Chellappan, S. (2017). Enzyme engineering. In *Bioresources and bioprocess in biotechnology* (pp. 151-168): Springer.
- Bashirova, A., Pramanik, S., Volkov, P., Rozhkova, A., *et al.* (2019). Disulfide bond engineering of an endoglucanase from *Penicillium verruculosum* to improve its thermostability. 20(7), 1602.
- Basu, S., Yoffe, P., Hills, N., y Lustig, R. H. (2013). The relationship of sugar to population-level diabetes prevalence: an econometric analysis of repeated cross-sectional data. *PLoS One*, 8(2), e57873.
- Beldarraín, A., Acosta, N., Montesinos, R., Mata, M., *et al.* (2000). Characterization of *Mucor pusillus* rennin expressed in *Pichia pastoris*: enzymic, spectroscopic and calorimetric studies. *Biotechnology and applied biochemistry*, 31(2), 77-84.
- Bendl, J., Stourac, J., Sebestova, E., Vavra, O., *et al.* (2016). HotSpot Wizard 2.0: automated design of site-specific mutations and smart libraries in protein engineering. *Nucleic acids research*, 44(W1), W479-W487.
- Benítez-Cortés, I., Pérez-Martínez, A., Barrios-Rodríguez, M. A., Rodríguez-Machado, A., *et al.* (2018). Simulación de una planta de producción de

- aceite de moringa empleando el simulador de procesos Superpro Designer. *Tecnología Química*, 38(2), 236-247.
- Benoit, I., Asther, M., Sulzenbacher, G., Record, E., *et al.* (2006). Respective importance of protein folding and glycosylation in the thermal stability of recombinant feruloyl esterase A. *FEBS letters*, 580(25), 5815-5821.
- Bi, J., Chen, S., Zhao, X., Nie, Y., *et al.* (2020). Computation-aided engineering of starch-debranching pullulanase from *Bacillus thermoleovorans* for enhanced thermostability. *104*(17), 7551-7562.
- Bian, F., Yue, S., Peng, Z., Zhang, X., *et al.* (2015). A comprehensive alanine-scanning mutagenesis study reveals roles for salt bridges in the structure and activity of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *10*(3), e0121108.
- Bimboim, H. C., y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *7*(6), 1513-1523.
- Börnke, F., Hajirezaei, M., y Sonnewald, U. (2001). Cloning and characterization of the gene cluster for palatinose metabolism from the phytopathogenic bacterium *Erwinia rhapontici*. *Journal of bacteriology*, 183(8), 2425-2430.
- Böttcher, D., y Bornscheuer, U. T. (2010). Protein engineering of microbial enzymes. *Current opinion in microbiology*, 13(3), 274-282.
- Bretthauer, R. K., y Castellino, F. J. (1999). Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnology and applied biochemistry*, 30(3), 193-200.
- Britton, J., Majumdar, S., y Weiss, G. A. (2018). Continuous flow biocatalysis. *47*(15), 5891-5918.
- Brown, S. H., Sjøholm, C., y Kelly, R. M. (1993). Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophilic eubacterium, *Thermotoga maritima*. *Biotechnology and bioengineering*, 41(9), 878-886.
- Castillo-Aragón, M. (2017). *Conversión enzimática de sacarosa en isomaltulosa mediante la expresión de sacarosa isomerasa en Pichia pastoris*. (Maestro

- Maestría en Ciencias en Biotecnología), Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua.
- Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., y Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current opinion in biotechnology*, 13(4), 329-332.
- Cereghino, J. L., y Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*, 24(1), 45-66.
- Cha, J., Jung, J., Park, S., Cho, M., *et al.* (2009). Molecular cloning and functional characterization of a sucrose isomerase (isomaltulose synthase) gene from *Enterobacter* sp. FMB-1. *Journal of applied microbiology*, 107(4), 1119-1130.
- Chakravorty, D., Khan, M. F., y Patra, S. (2017). Multifactorial level of extremostability of proteins: can they be exploited for protein engineering? , 21(3), 419-444.
- Chapman, J., Ismail, A. E., y Dinu, C. Z. (2018). Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238.
- Cheetham, P. (1984). The extraction and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici*. *Biochemical Journal*, 220(1), 213-220.
- Chen, A., Li, Y., Nie, J., McNeil, B., *et al.* (2015). Protein engineering of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase for enhanced thermostability using in silico data driven rational design methods. *Enzyme and Microbial Technology*, 78, 74-83.
- Chen, C., Su, L., Xu, F., Xia, Y., *et al.* (2019). Improved thermostability of maltooligosyltrehalose synthase from *Arthrobacter ramosus* by directed evolution and site-directed mutagenesis. 67(19), 5587-5595.

- Chen, K., y Arnold, F. (1991). Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. *9*(11), 1073-1077.
- Chen, L., Qu, Z., Yu, W., Zheng, L., *et al.* (2023). Comparative genomic and transcriptome analysis of *Bacillus velezensis* CL-4 fermented corn germ meal. *AMB Express*, *13*(1), 1-12.
- Chen, Y., Zhao, Y., Zhou, X., Liu, N., *et al.* (2021). Improving the thermostability of trehalose synthase from *Thermomonospora curvata* by covalent cyclization using peptide tags and investigation of the underlying molecular mechanism. *168*, 13-21.
- Cheng, L., Mu, W., Zhang, T., y Jiang, B. (2010). An L-arabinose isomerase from *Acidothermus cellulolyticus* ATCC 43068: cloning, expression, purification, and characterization. *Applied microbiology and biotechnology*, *86*(4), 1089-1097.
- Chicco, A., D'Alessandro, M. a. E., Karabatas, L., Pastorale, C., *et al.* (2003). Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *The Journal of nutrition*, *133*(1), 127-133.
- Cho, M.-H., Park, S.-E., Lim, J. K., Kim, J.-S., *et al.* (2007). Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food. *Biotechnology letters*, *29*, 453-458.
- Choi, J.-M., Han, S.-S., y Kim, H.-S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *33*(7), 1443-1454.
- Cicerone, M., Giri, J., Shaked, Z. e., y Roberts, C. (2015). Protein stability-an underappreciated but critical need for drug delivery systems. *93*, 1.
- Ciofalo, V., Barton, N., Kreps, J., Coats, I., *et al.* (2006). Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *45*(1), 1-8.

- Cirino, P. C., Mayer, K. M., y Umeno, D. (2003). Generating mutant libraries using error-prone PCR. In *Directed evolution library creation* (pp. 3-9): Springer.
- Cockburn, D. W., Cerqueira, F. M., Bahr, C., y Koropatkin, N. M. (2020). The structures of the GH13\_36 amylases from *Eubacterium rectale* and *Ruminococcus bromii* reveal subsite architectures that favor maltose production. *Amylase*, 4(1), 24-44.
- Colley, K. J., Varki, A., y Kinoshita, T. (2015). *Cellular Organization of Glycosylation* (3rd ed.): Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Contesini, F. J., de Oliveira Carvalho, P., Grosso, C. R. F., y Sato, H. H. (2013). Single-step purification, characterization and immobilization of a sucrose isomerase from *Erwinia* sp. 2(4), 322-327.
- Contesini, F. J., Ibarguren, C., Grosso, C. R. F., de Oliveira Carvalho, P., *et al.* (2012). Immobilization of glucosyltransferase from *Erwinia* sp. using two different techniques. 158(3), 137-143.
- Córdova-Villalobos, J. Á., Barriguete-Meléndez, J. A., Lara-Esqueda, A., Barquera, S., *et al.* (2008). Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud pública de México*, 50(5), 419-427.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., y Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular biotechnology*, 16(1), 23-52.
- Cregg, J. M., y Russell, K. A. (1998). Transformation. In *Pichia protocols* (pp. 27-39): Springer.
- Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., *et al.* (2009). Expression in the yeast *Pichia pastoris*. In *Methods in enzymology* (Vol. 463, pp. 169-189): Elsevier.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., y Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/technology*, 11(8), 905.



- Crha, T., y Pazourek, J. (2020). Rapid HPLC method for determination of isomaltulose in the presence of glucose, sucrose, and maltodextrins in dietary supplements. *Foods*, 9(9), 1164.
- Cui, X., Yuan, X., Li, S., Hu, X., *et al.* (2022). Simultaneously improving the specific activity and thermostability of  $\alpha$ -amylase BLA by rational design. *Bioprocess and biosystems engineering*, 45(11), 1839-1848.
- Curulli, A., Cusma, A., Kaciulis, S., Padeletti, G., *et al.* (2006). Immobilization of GOD and HRP enzymes on nanostructured substrates. *Surface and interface analysis*, 38(4), 478-481.
- Daly, R., y Hearn, M. T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 18(2), 119-138.
- Damasceno, L. M., Huang, C.-J., y Batt, C. (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. 93(1), 31-39.
- Dávila-Cervantes, C. A., Agudelo-Botero, M., y Gloria-Hernández, L. E. (2011). Diabetes en México y Colombia: Análisis de la tendencia de años de vida perdidos, 1998-2007. *Revista de Salud Pública*, 13, 560-571.
- De Castro, E., Sigrist, C. J., Gattiker, A., Bulliard, V., *et al.* (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic acids research*, 34(suppl\_2), W362-W365.
- Dębski, J., Wysłouch-Cieszyńska, A., Dadlez, M., Grzelak, K., *et al.* (2004). Positions of disulfide bonds and N-glycosylation site in juvenile hormone binding protein. *Archives of biochemistry and biophysics*, 421(2), 260-266.
- Dey, P., y Roy, A. (2018). Molecular structure and catalytic mechanism of fungal family G acidophilic xylanases. *3 Biotech*, 8(2), 1-13.
- Diabetes, F. I. d. (2019). Atlas de la diabetes de la FID. In: FID Brussels.
- Diabetes, U. (2010). Diabetes in the UK 2010: key statistics on diabetes. *London: Diabetes UK*.

- Dotsenko, A. S., Gusakov, A. V., Volkov, P. V., Rozhkova, A. M., *et al.* (2016). N-linked glycosylation of recombinant cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Penicillium verruculosum* and its effect on the enzyme activity. *Biotechnology and bioengineering*, 113(2), 283-291.
- Dotsenko, A. S., Rozhkova, A. M., Zorov, I. N., y Sinitsyn, A. (2020). Protein surface engineering of endoglucanase *Penicillium verruculosum* for improvement in thermostability and stability in the presence of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid. 296, 122370.
- Duan, X., Cheng, S., Ai, Y., y Wu, J. (2016). Enhancing the thermostability of *Serratia plymuthica* sucrose isomerase using B-factor-directed mutagenesis. *PLoS One*, 11(2), e0149208.
- Eggleston, G., y Grisham, M. (2003). *Oligosaccharides in cane and their formation on cane deterioration*. Paper presented at the ACS symposium series.
- Eijsink, V. G., Gåseidnes, S., Borchert, T. V., y van den Burg, B. (2005). Directed evolution of enzyme stability. *Biomolecular engineering*, 22(1-3), 21-30.
- Epidemiología, D. G. d. (2019). Anuario de Morbilidad de la Dirección General de Epidemiología.
- Ernst, S., Garro, O. A., Winkler, S., Venkataraman, G., *et al.* (1997). Process simulation for recombinant protein production: cost estimation and sensitivity analysis for heparinase I expressed in *Escherichia coli*. 53(6), 575-582.
- Estell, D. A., Graycar, T. P., y Wells, J. A. (1985). Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. 260(11), 6518-6521.
- Fágáin, C. Ó. (1995). Understanding and increasing protein stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1252(1), 1-14.
- Farnoosh, G., Khajeh, K., Mohammadi, M., Hassanpour, K., *et al.* (2020a). Catalytic and structural effects of flexible loop deletion in organophosphorus hydrolase enzyme: A thermostability improvement mechanism. 45, 1-10.

- Farnoosh, G., Khajeh, K., Mohammadi, M., Hassanpour, K., *et al.* (2020b). Catalytic and structural effects of flexible loop deletion in organophosphorus hydrolase enzyme: A thermostability improvement mechanism. *45*(1), 1-10.
- Federación Mexicana de Diabetes, A. C. (2018). Principales causas de mortalidad en Mexico. Retrieved from <http://fmdiabetes.org/principales-causas-mortalidad-mexico-2/>
- Feller, G., Bonneau, M., y Da Lage, J.-L. (2021). Amyrel, a novel glucose-forming  $\alpha$ -amylase from *Drosophila* with 4- $\alpha$ -glucanotransferase activity by disproportionation and hydrolysis of maltooligosaccharides. *31*(9), 1134-1144.
- Fernández, A. S., Chávez, L. R. G., Bautista, N. V., Cortés, V. H. S., *et al.* (2017). Impacto de la sustitución del azúcar de caña por edulcorantes de alta intensidad en México.
- Franceus, J., y Desmet, T. (2020). Sucrose phosphorylase and related enzymes in glycoside hydrolase family 13: discovery, application and engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 2526.
- Gao, B., Wang, X., y Shen, Y. (2006). Studies on characters of immobilizing penicillin G acylase on a novel composite support PEI/SiO<sub>2</sub>. *Biochemical Engineering Journal*, *28*(2), 140-147.
- García Pérez, A. (2016). *Evaluación de cambios en el proceso de producción del Nimotuzumab con ayuda del SuperPro Designer*. Universidad Tecnológica de La Habana,
- Gavel, Y., y Heijne, G. v. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Engineering, Design and Selection*, *3*(5), 433-442.
- Gong, B., Burnina, I., Lynaugh, H., y Li, H. (2014). O-linked glycosylation analysis of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor produced in glycoengineered *Pichia pastoris* by liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, *945*, 135-140.

- Gong, X.-M., Qin, Z., Li, F.-L., Zeng, B.-B., *et al.* (2019). Development of an engineered ketoreductase with simultaneously improved thermostability and activity for making a bulky atorvastatin precursor. *9*(1), 147-153.
- Gray, K. A., Zhao, L., y Emptage, M. (2006). *Bioethanol*. *10*(2), 141-146.
- Guariguata, L., Whiting, D., Weil, C., y Unwin, N. (2011). The International Diabetes Federation diabetes atlas methodology for estimating global and national prevalence of diabetes in adults. *Diabetes research and clinical practice*, *94*(3), 322-332.
- Guo, C., Ni, Y., Biewenga, L., Pijning, T., *et al.* (2021). Using Mutability Landscapes To Guide Enzyme Thermostabilization. *ChemBioChem*, *22*(1), 170-175.
- Guo, D., Li, M., Jiang, M., Cong, G., *et al.* (2022). Enhanced Extracellular Production and Characterization of Sucrose Isomerase in *Bacillus subtilis* with Optimized Signal Peptides. *Foods*, *11*(16), 2468.
- Häberer, D., Thibault, L., Langhans, W., y Geary, N. (2009). Beneficial effects on glucose metabolism of chronic feeding of isomaltulose versus sucrose in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *54*(1), 75-82.
- Haltiwanger, R. S., y Lowe, J. B. (2004). Role of glycosylation in development. *Annual review of biochemistry*, *73*(1), 491-537.
- Han, C., Wang, Q., Sun, Y., Yang, R., *et al.* (2020). Improvement of the catalytic activity and thermostability of a hyperthermostable endoglucanase by optimizing N-glycosylation sites. *13*(1), 1-11.
- Han, M., Wang, W., Jiang, G., Wang, X., *et al.* (2014). Enhanced expression of recombinant elastase in *Pichia pastoris* through addition of N-glycosylation sites to the propeptide. *Biotechnology letters*, *36*(12), 2467-2471.
- Han, N., Ma, Y., Mu, Y., Tang, X., *et al.* (2019a). Enhancing thermal tolerance of a fungal GH11 xylanase guided by B-factor analysis and multiple sequence alignment. *131*, 109422.
- Han, S.-R., Kim, B., Chi, Y. M., Kang, S., *et al.* (2019b). Complete genome sequencing of *Shigella* sp. PAMC 28760: Identification of CAZyme genes

- and analysis of their potential role in glycogen metabolism for cold survival adaptation. *Microbial Pathogenesis*, 137, 103759.
- Hang, I., Lin, C.-w., Grant, O. C., Fleurkens, S., *et al.* (2015). Analysis of site-specific N-glycan remodeling in the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Glycobiology*, 25(12), 1335-1349.
- He, J., Tang, F., Chen, D., Yu, B., *et al.* (2019). Design, expression and functional characterization of a thermostable xylanase from *Trichoderma reesei*. 14(1), e0210548.
- Helenius, A., y Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry*, 73(1), 1019-1049.
- Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J. P., y Reynoso-Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus en México: El estado de la epidemia. *Salud pública de México*, 55, s129-s136.
- Hoisington, D., Khairallah, M., y Gonzalez-de-Leon, D. (1998). CIMMYT applied molecular genetics laboratory. In: Mexico DF: CIMMYT.
- Hong, F., Meinander, N. Q., y Jönsson, L. J. (2002). Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and bioengineering*, 79(4), 438-449.
- Hu, X., Yuan, X., He, N., Zhuang, T. Z., *et al.* (2019). Expression of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase in *Pichia pastoris* without antibiotics-resistant gene and effects of glycosylation on the enzymic thermostability. 3 *Biotech*, 9(11), 1-9.
- Hua, L., Gao, X., Yang, X., Wan, D., *et al.* (2014). Highly efficient production of peptides: N-glycosidase F for N-glycomics analysis. *Protein Expression and Purification*, 97, 17-22.
- Huang, J.-W., Cheng, Y.-S., Ko, T.-P., Lin, C.-Y., *et al.* (2012). Rational design to improve thermostability and specific activity of the truncated *Fibrobacter succinogenes* 1, 3-1, 4- $\beta$ -D-glucanase. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(1), 111-121.

- Huang, J., Hsu, L., y Su, Y. (1998). Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(1-2), 22-27.
- Huang, L., Shan, M., Ma, J., Li, Y., et al. (2019). Directed evolution of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* to enhance its acid-stable performance. *Biologia*, 74, 1363-1372.
- Huang, Y., Ogurtsova, K., Makaroff, L., Cavan, D., et al. (2017). *IDF Diabetes Atlas Estimates for the Global Diabetes Prevalence of Adults Aged 18 to 99 Years*. Paper presented at the DIABETES.
- Hugot, E. (1963). *Manual para ingenieros azucareros*. Retrieved from
- Humphrey, W. S. (2006). *Systems of systems: Scaling up the development process*: Carnegie Mellon University, Software Engineering Institute.
- Huntemann, M., Lu, M., Nolan, M., Lapidus, A., et al. (2011). Complete genome sequence of the thermophilic sulfur-reducer *Hippea maritima* type strain (MH2T). *Standards in genomic sciences*, 4(3), 303-311.
- Igarashi, K., Ozawa, T., Ikawa-Kitayama, K., Hayashi, Y., et al. (1999). Thermostabilization by proline substitution in an alkaline, liquefying  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-1378. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 63(9), 1535-1540.
- Iglesias-Figueroa, B. F. (2019). *Efecto anticancerígeno de lactoferrina humana recombinante expresada en Pichia pastoris sobre células de cáncer de seno*. (Tesis de Doctorado), Universidad Autónoma de Chihuahua,
- INEGI (2021). [Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes].
- Ismaya, W. T., Hasan, K., Kardi, I., Zainuri, A., et al. (2013). Chemical modification of *Saccharomycopsis fibuligera* R64  $\alpha$ -amylase to improve its stability against thermal, chelator, and proteolytic inactivation. 170, 44-57.
- Janeček, Š. (2002). How many conserved sequence regions are there in the  $\alpha$ -amylase family. *Biologia*, 57(Suppl 11), 29-41.
- Janeček, Š., Kuchtová, A., y Petrovičová, S. (2015). A novel GH13 subfamily of  $\alpha$ -amylases with a pair of tryptophans in the helix  $\alpha$ 3 of the catalytic TIM-

- barrel, the LPDlx signature in the conserved sequence region V and a conserved aromatic motif at the C-terminus. *Biología*, *70*, 1284-1294.
- Janeček, Š., Svensson, B., y MacGregor, E. A. (2014).  $\alpha$ -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and molecular life sciences*, *71*, 1149-1170.
- Janeček, Š., y Zámocká, B. (2020). A new GH13 subfamily represented by the  $\alpha$ -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles*, *24*, 207-217.
- Janíčková, Z., y Janeček, Š. (2020). Fungal  $\alpha$ -amylases from three GH13 subfamilies: their sequence-structural features and evolutionary relationships. *International Journal of Biological Macromolecules*, *159*, 763-772.
- Jiang, T., Chen, L., Jia, S., Chen, L., *et al.* (2008). High-level expression and production of human lactoferrin in *Pichia pastoris*. *88*(2), 173-181.
- Joao, H. C., Scragg, I. G., y Dwek, R. A. (1992). Effects of glycosylation on protein conformation and amide proton exchange rates in RNase B. *FEBS letters*, *307*(3), 343-346.
- Jonker, D., Lina, B., y Kozianowski, G. (2002). 13-Week oral toxicity study with isomaltulose (Palatinose®) in rats. *Food and Chemical Toxicology*, *40*(10), 1383-1389.
- Jornada, L. (2019). En México, el 85% rebasa consumo de azúcar recomendado por OMS. *La Jornada*. Retrieved from <https://www.jornada.com.mx/ultimas/sociedad/2019/04/07/en-mexico-el-85-rebasa-consumo-de-azucar-recomendado-por-oms-6597.html>
- Jung, J.-H., Kim, M.-J., Jeong, W.-S., Seo, D.-H., *et al.* (2017). Characterization of divergent pseudo-sucrose isomerase from *Azotobacter vinelandii*: Deciphering the absence of sucrose isomerase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *483*(1), 115-121.
- Katla, S., Yoganand, K., Hingane, S., Kumar, C. R., *et al.* (2019). Novel glycosylated human interferon alpha 2b expressed in glycoengineered

- Pichia pastoris* and its biological activity: N-linked glycoengineering approach. *Enzyme and Microbial Technology*, 128, 49-58.
- Kaur, G. J., Kumar, D., Orsat, V., y Singh, A. (2022). Techno-Economic Analysis of the Multiple-Pass Ultrasonication with Mechanical Homogenization (MPUMH) Processing of Processed Carrot Discards to Puree. 12(1), 157.
- Kawaguti. (2007). Palatinose production by free and Ca-alginate gel immobilized cells of *Erwinia* sp. *Biochemical Engineering Journal*, 36(3), 202-208.
- Kawaguti, H. Y., Celestino, É. M., Moraes, A. L., Yim, D. K., *et al.* (2010a). Characterization of a glucosyltransferase from *Erwinia* sp. D12 and the conversion of sucrose into isomaltulose by immobilized cells. *Biochemical Engineering Journal*, 48(2), 211-217.
- Kawaguti, H. Y., y Harumi, H. (2010b). Effect of concentration and substrate flow rate on isomaltulose production from sucrose by *Erwinia* sp. cells immobilized in calcium-alginate using packed bed reactor. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162, 89-102.
- Kawai, K., Okuda, Y., y Yamashita, K. (1985). Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. *Endocrinologia japonica*, 32(6), 933-936.
- Kawai, K., Yoshikawa, H., Murayama, Y., Okuda, Y., *et al.* (1989). Usefulness of palatinose as a caloric sweetener for diabetic patients. *Hormone and metabolic research*, 21(06), 338-340.
- Kazlauskas, R. (2018). Engineering more stable proteins. 47(24), 9026-9045.
- Kazlauskas, R. J., y Bornscheuer, U. (2009). Finding better protein engineering strategies. 5(8), 526-529.
- Khan, M. F., Kundu, D., Hazra, C., y Patra, S. (2019). A strategic approach of enzyme engineering by attribute ranking and enzyme immobilization on zinc oxide nanoparticles to attain thermostability in mesophilic *Bacillus subtilis* lipase for detergent formulation. 136, 66-82.



- Kim, H., Sang, B.-I., Tsapekos, P., Angelidaki, I., *et al.* (2023). Techno-Economic Analysis of Succinic Acid Production from Sugar-Rich Wastewater. *16*(7), 3227.
- Kim, T., Joo, J. C., y Yoo, Y. (2012). Hydrophobic interaction network analysis for thermostabilization of a mesophilic xylanase. *161*(1), 49-59.
- Klibanov, A. (1983). Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *219*(4585), 722-727.
- Knauer, R., y Lehle, L. (1999). The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1426*(2), 259-273.
- König, D., Theis, S., Kozianowski, G., y Berg, A. (2012). Postprandial substrate use in overweight subjects with the metabolic syndrome after isomaltulose (Palatinose™) ingestion. *Nutrition*, *28*(6), 651-656.
- Krüger, D. M., Rathi, P. C., Pflieger, C., y Gohlke, H. (2013). CNA web server: rigidity theory-based thermal unfolding simulations of proteins for linking structure,(thermo-) stability, and function. *41*(W1), W340-W348.
- Kumar, S., Ma, B., Tsai, C. J., y Nussinov, R. (2000). Electrostatic strengths of salt bridges in thermophilic and mesophilic glutamate dehydrogenase monomers. *38*(4), 368-383.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *227*(5259), 680-685.
- Lee, G.-Y., Jung, J.-H., Seo, D.-H., Hansin, J., *et al.* (2011). Isomaltulose production via yeast surface display of sucrose isomerase from *Enterobacter* sp. FMB-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, *102*(19), 9179-9184.
- Lee, H. C., Kim, J. H., Kim, S. Y., y Lee, J. K. (2008). Isomaltulose production by modification of the fructose-binding site on the basis of the predicted structure of sucrose isomerase from *Protaminobacter rubrum*. *Applied and environmental microbiology*, *74*(16), 5183-5194.

- Li, G., Chen, Y., Fang, X., Su, F., *et al.* (2018a). Identification of a hot-spot to enhance *Candida rugosa* lipase thermostability by rational design methods. *8*(4), 1948-1957.
- Li, G., Fang, X., Su, F., Chen, Y., *et al.* (2018b). Enhancing the thermostability of *Rhizomucor miehei* lipase with a limited screening library by rational-design point mutations and disulfide bonds. *84*(2).
- Li, L., Wang, H., Cheng, H., y Deng, Z. (2017). Isomaltulose production by yeast surface display of sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* on *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Functional Foods*, *32*, 208-217.
- Li, Q., Jiang, T., Liu, R., Feng, X., *et al.* (2019). Tuning the pH profile of  $\beta$ -glucuronidase by rational site-directed mutagenesis for efficient transformation of glycyrrhizin. *Applied microbiology and biotechnology*, *103*(12), 4813-4823.
- Li, S., Cai, H., y Qing, Y. (2011). Cloning and characterization of a sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5 for isomaltulose hyperproduction. *Applied biochemistry and biotechnology*, *163*(1), 52-63.
- Li, Z., Wang, M., Wang, F., Gu, Z., *et al.* (2007).  $\gamma$ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, *77*(2), 245.
- Lin, M.-G., Chi, M.-C., Naveen, V., Li, Y.-C., *et al.* (2016). *Bacillus licheniformis* trehalose-6-phosphate hydrolase structures suggest keys to substrate specificity. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, *72*(1), 59-70.
- Lina, B., Jonker, D., y Kozianowski, G. (2002). Isomaltulose (Palatinose®): a review of biological and toxicological studies. *Food and Chemical Toxicology*, *40*(10), 1375-1381.
- Lina, B., Smits-Van Prooijs, A., y Waalkens-Berendsen, D. (1997). Embryotoxicity/teratogenicity study with isomaltulose (Palatinose®) in rats. *Food and Chemical Toxicology*, *35*(3), 309-314.

- Lindeque, R. M., y Woodley, J. (2019). Reactor selection for effective continuous biocatalytic production of pharmaceuticals. *9*(3), 262.
- Lipski, A., Watzlawick, H., Ravaud, S., Robert, X., *et al.* (2013). Mutations inducing an active-site aperture in *Rhizobium* sp. sucrose isomerase confer hydrolytic activity. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *69*(2), 298-307.
- Liu, B., Qu, G., Li, J. K., Fan, W., *et al.* (2019). Conformational Dynamics-Guided Loop Engineering of an Alcohol Dehydrogenase: Capture, Turnover and Enantioselective Transformation of Difficult-to-Reduce Ketones. *361*(13), 3182-3190.
- Liu, L., Yu, H., Du, K., Wang, Z., *et al.* (2018). Enhanced trypsin thermostability in *Pichia pastoris* through truncating the flexible region. *17*(1), 1-10.
- Liu, L., Yu, S., y Zhao, W. (2021). A Novel Sucrose Isomerase Producing Isomaltulose from *Raoultella terrigena*. *Applied Sciences*, *11*(12), 5521.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., *et al.* (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, *42*(D1), D490-D495.
- Lõoke, M., Kristjuhan, K., y Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *50*(5), 325-328.
- Lu, Z., Wang, Q., Jiang, S., Zhang, G., *et al.* (2016). Truncation of the unique N-terminal domain improved the thermos-stability and specific activity of alkaline  $\alpha$ -amylase Amy703. *6*(1), 22465.
- Lutz, S. (2010). Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design. *21*(6), 734-743.
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., y Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, *22*(4), 249-270.
- Maenpuen, S., Pongsupasa, V., Pensook, W., Anuwat, P., *et al.* (2020). Creating Flavin Reductase Variants with Thermostable and Solvent-Tolerant Properties by Rational-Design Engineering.

- Maksimainen, M., Hakulinen, N., Kallio, J. M., Timoharju, T., *et al.* (2011). Crystal structures of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -galactosidase reveal conformational changes in the active site. *Journal of structural biology*, 174(1), 156-163.
- Marengo, M., Pezzilli, D., Gianquinto, E., Fissore, A., *et al.* (2022). Evaluation of *Porcine* and *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -Amylases as Possible Model for the Human Enzyme. *Processes*, 10(4), 780.
- Markosyan, A., Abelyan, L., Adamyan, M., Ekazhev, Z., *et al.* (2007). Production of fructooligosaccharide syrup from sucrose in combination with palatinose and trehalose. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(4), 383-389.
- Masakari, Y., Hara, C., Araki, Y., Gomi, K., *et al.* (2020). Improvement in the thermal stability of *Mucor prainii*-derived FAD-dependent glucose dehydrogenase via protein chimerization. 132, 109387.
- Mathers, C. D., y Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*, 3(11), e442.
- McCarthy, A. A., Morris, D. D., Bergquist, P. L., y Baker, E. (2000). Structure of XynB, a highly thermostable  $\beta$ -1, 4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B. 1, at 1.8 Å resolution. 56(11), 1367-1375.
- Medina, C., Tolentino-Mayo, L., Lopez-Ridaura, R., y Barquera, S. (2017). Evidence of increasing sedentarism in Mexico City during the last decade: Sitting time prevalence, trends, and associations with obesity and diabetes. *PLoS One*, 12(12).
- Menéndez-Arias, L., y Argosf, P. (1989). Engineering protein thermal stability: sequence statistics point to residue substitutions in  $\alpha$ -helices. *Journal of molecular biology*, 206(2), 397-406.
- Merino, A. (2014). *Transformación genética de caña de azúcar con un gen sintético que codifica para la sacarosa isomerasa*. (Licenciatura), Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México.
- Miyata, Y., Sugitani, T., Tsuyuki, K.-i., Ebashi, T., *et al.* (1992). Isolation and characterization of *Pseudomonas mesoacidophila* producing trehalulose. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(10), 1680-1681.

- Modarres, H. P., Mofrad, M., y Sanati-Nezhad, A. (2016). Protein thermostability engineering. *6*(116), 115252-115270.
- Møller, M. S., Fredslund, F., Majumder, A., Nakai, H., *et al.* (2012). Enzymology and structure of the GH13\_31 glucan 1, 6- $\alpha$ -glucosidase that confers isomaltooligosaccharide utilization in the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Journal of bacteriology*, *194*(16), 4249-4259.
- Moore, J. C., Jin, H.-M., Kuchner, O., y Arnold, F. (1997). Strategies for the in vitro evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences. *272*(3), 336-347.
- Mu, W., Li, W., Wang, X., Zhang, T., *et al.* (2014). Current studies on sucrose isomerase and biological isomaltulose production using sucrose isomerase. *Applied microbiology and biotechnology*, *98*(15), 6569-6582.
- Mu, W., Wang, X., Xue, Q., Jiang, B., *et al.* (2012). Characterization of a thermostable glucose isomerase with an acidic pH optimum from *Acidothermus cellulolyticus*. *Food research international*, *47*(2), 364-367.
- Mularski, J., Pawlak-Kruczek, H., y Modlinski, N. (2020). A review of recent studies of the CFD modelling of coal gasification in entrained flow gasifiers, covering devolatilization, gas-phase reactions, surface reactions, models and kinetics. *271*, 117620.
- Nagae, M., y Yamaguchi, Y. (2012). Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(7), 8398-8429.
- Nagai-Miyata, Y., Tsuyuki, K.-i., Sugitani, T., Ebashi, T., *et al.* (1993). Isolation and characterization of a trehalulose-producing strain of *Agrobacterium*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *57*(12), 2049-2053.
- Nestl, B. M., y Hauer, B. (2014). Engineering of flexible loops in enzymes. In: ACS Publications.
- Nielsen, J. E., y Borchert, T. V. (2000). Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1543*(2), 253-274.

- O'Brien-Nabors, L. (2016). *Alternative sweeteners*: CRC Press.
- O.M.S. (2020). Diabetes. Retrieved from [https://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/es/](https://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/)
- Pack, S. P., y Yoo, Y. J. (2004). Protein thermostability: structure-based difference of amino acid between thermophilic and mesophilic proteins. *Journal of Biotechnology*, 111(3), 269-277.
- Packer, M. S., y Liu, D. (2015). Methods for the directed evolution of proteins. 16(7), 379-394.
- Pagliassotti, M. J., Kang, J., Thresher, J. S., Sung, C. K., et al. (2002). Elevated basal PI 3-kinase activity and reduced insulin signaling in sucrose-induced hepatic insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 282(1), E170-E176.
- Pang, B., Zhou, L., Cui, W., Liu, Z., et al. (2020). Improvement of the Thermostability and Activity of Pullulanase from *Anoxybacillus* sp. WB42. 1-13.
- Parthasarathy, S., y Murthy, M. (2000). Protein thermal stability: insights from atomic displacement parameters (B values). *Protein engineering*, 13(1), 9-13.
- Patel, A. C., Li, S., Yuan, J.-M., y Wei, Y. (2006). In situ encapsulation of horseradish peroxidase in electrospun porous silica fibers for potential biosensor applications. *Nano letters*, 6(5), 1042-1046.
- Patel, A. K., Singhania, R. R., Sim, S. J., y Pandey, A. (2019). Thermostable cellulases: current status and perspectives. *Bioresource technology*, 279, 385-392.
- Pauling, L. (1960). *The Nature of the Chemical Bond* (Vol. 260): Cornell university press Ithaca, NY.
- Peng, M., Maier, M., Esch, J., Schug, A., et al. (2019). Direct coupling analysis improves the identification of beneficial amino acid mutations for the functional thermostabilization of a delicate decarboxylase. 400(11), 1519-1527.

- Petrescu, A.-J., Milac, A.-L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A., *et al.* (2004). Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology*, *14*(2), 103-114.
- Petrides, D., Carmichael, D., Siletti, C., y Koulouris, A. (2014). Biopharmaceutical process optimization with simulation and scheduling tools. *Bioengineering*, *1*(4), 154-187.
- Petrides, D. P., Koulouris, A., y Lagonikos, P. (2002). The role of process simulation in pharmaceutical process development and product commercialization. *Pharmaceutical Engineering*, *22*(1), 56-65.
- Phan-Thien, Y. (2011). BioMASS v2. 0: A new tool for bioprocess simulation.
- Plaza-Vinuesa, L., Hernandez-Hernandez, O., Moreno, F. J., de Las Rivas, B., *et al.* (2019). Unravelling the diversity of glycoside hydrolase family 13  $\alpha$ -amylases from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial Cell Factories*, *18*, 1-11.
- Pongpamorn, P., Watthaisong, P., Pimviriyakul, P., Jaruwat, A., *et al.* (2019). Identification of a hotspot residue for improving the thermostability of a flavin-dependent monooxygenase. *20*(24), 3020-3031.
- Pública, I. N. d. S. (1993). Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas Retrieved from <https://datos.gob.mx/busca/dataset/encuesta-nacional-de-enfermedades-cronicas-1993-enec93>
- Pública, I. N. d. S. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.
- Querol, E., Perez-Pons, J. A., y Mozo-Villarias, A. (1996). Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *9*(3), 265-271.
- Ravaud, S., Robert, X., Watzlawick, H., Haser, R., *et al.* (2007). Trehalulose synthase native and carbohydrate complexed structures provide insights into sucrose isomerization. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(38), 28126-28136.
- Ravaud, S., Robert, X., Watzlawick, H., Haser, R., *et al.* (2009). Structural determinants of product specificity of sucrose isomerases. *FEBS letters*, *583*(12), 1964-1968.

- Ravaud, S., Watzlawick, H., Haser, R., Mattes, R., *et al.* (2005). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the trehalulose synthase MutB from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 61(1), 100-103.
- Ravaud, S., Watzlawick, H., Haser, R., Mattes, R., *et al.* (2006). Overexpression, purification, crystallization and preliminary diffraction studies of the *Protaminobacter rubrum* sucrose isomerase SmuA. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 62(1), 74-76.
- Ren, B., Li, S., Xu, H., Feng, X.-h., *et al.* (2011). Purification and characterization of a highly selective sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5. *Bioprocess and biosystems engineering*, 34(5), 629-637.
- Ren, X., Wang, J., Li, Y., Wang, F., *et al.* (2019). Computational and enzymatic analyses unveil the catalytic mechanism of thermostable trehalose synthase and suggest strategies for improved bioconversion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(29), 8177-8185.
- Ren, Y., Luo, H., Huang, H., Hakulinen, N., *et al.* (2020). Improving the catalytic performance of Proteinase K from *Parengyodontium album* for use in feather degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 1586-1595.
- Rhimi, M., Da Lage, J.-L., Haser, R., Feller, G., *et al.* (2023). Structural and Functional Characterization of *Drosophila melanogaster*  $\alpha$ -Amylase. 28(14), 5327.
- Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., *et al.* (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. 42(15), 6290-6307.
- Rodríguez-Bolaños, R., Reynales-Shigematsu, L. M., Jiménez-Ruiz, J. A., Juárez-Márquezy, S. A., *et al.* (2010). Costos directos de atención médica en



- pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en México: análisis de microcosteo. *Revista panamericana de salud pública*, 28, 412-420.
- Romero-Fernández, M., y Paradisi, F. (2020). Protein immobilization technology for flow biocatalysis. *55*, 1-8.
- Ryu, K.-S., Lee, J.-O., Kwon, T. H., Choi, H.-H., *et al.* (2009). The presence of monoglucosylated N196-glycan is important for the structural stability of storage protein, arylphorin. *Biochemical Journal*, 421(1), 87-96.
- Samanta, S. (2022). Structural and Catalytical Features of Different Amylases and their Potential Applications. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 15(2).
- Sardiña-Peña, A. J. (2019). *Inmovilización de sacarosa isomerasa recombinante para la conversión a isomaltulosa*. (Maestro Maestría en Ciencias en Biotecnología), Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua.
- Sarian, F. D., Janeček, Š., Pijning, T., Nurachman, Z., *et al.* (2017). A new group of glycoside hydrolase family 13  $\alpha$ -amylases with an aberrant catalytic triad. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Schiweck, H., Munir, M., Rapp, K. M., Schneider, B., *et al.* (1991). New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. *Carbohydrates as organic raw materials*, 1, 57-94.
- Sentko A, B. J. (2011). *Isomaltulose*. In: O'Brien-Nabors L (ed) *Alternative sweeteners*: CRC Press.
- Sharma, A., Gupta, G., Ahmad, T., Mansoor, S., *et al.* (2019). Enzyme Engineering: Current trends and future perspectives. 1-34.
- Sheldon, R. A., y Pereira, P. C. (2017). Biocatalysis engineering: the big picture. *46*(10), 2678-2691.
- Shental-Bechor, D., y Levy, Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(24), 8256-8261.
- Shi, X., Wu, D., Xu, Y., y Yu, X. (2022). Engineering the optimum pH of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* for efficient hydrolysis of lactose. *Journal of Dairy Science*, 105(6), 4772-4782.

- Siddiqui, I., y Furgala, B. (1967). Isolation and characterization of oligosaccharides from honey. Part I. Disaccharides. *Journal of Apicultural Research*, 6(3), 139-145.
- Singh, S., y Bajaj, B. K. (2015). Medium optimization for enhanced production of protease with industrially desirable attributes from *Bacillus subtilis* K-1. 202(8), 1051-1060.
- Singsun, N., Kanongnuch, C., Leksawasdi, N., y Pratanaphon, R. (2016). Utilization of waste glycerol as a carbon source for *Pichia pastoris* cultivation. *Food and Applied Bioscience Journal*, 4(1), 41-51.
- Sissons, C., Anderson, S., Wong, L., Coleman, M., et al. (2007). Microbiota of plaque microcosm biofilms: effect of three times daily sucrose pulses in different simulated oral environments. *Caries research*, 41(5), 413-422.
- Smiddy, M., Martin, J.-E., Kelly, A., De Kruif, C., et al. (2006). Stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1906-1914.
- Solá, R. J., y Griebenow, K. (2009). Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98(4), 1223-1245.
- Sriprapundh, D., Vieille, C., y Zeikus, J. G. (2000). Molecular determinants of xylose isomerase thermal stability and activity: analysis of thermozymes by site-directed mutagenesis. *Protein engineering*, 13(4), 259-265.
- Srivastava, R. (1991). Studies on stabilization of amylase by covalent coupling to soluble polysaccharides. 13(2), 164-170.
- Stam, M. R., Danchin, E. G., Rancurel, C., Coutinho, P. M., et al. (2006). Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of  $\alpha$ -amylase-related proteins. *Protein Engineering, Design and Selection*, 19(12), 555-562.
- Steiner, K., y Schwab, H. (2012). Recent advances in rational approaches for enzyme engineering. 2(3), e201209010.

- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28(6), 1102-1104.
- Sumer-Bayraktar, Z., Kolarich, D., Campbell, M. P., Ali, S., *et al.* (2011). N-glycans modulate the function of human corticosteroid-binding globulin. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(8).
- Suzuki, Y. (1989). A general principle of increasing protein thermostability. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 65(6), 146-148.
- Suzuki, Y., Oishi, K., Nakano, H., y Nagayama, T. (1987). A strong correlation between the increase in number of proline residues and the rise in thermostability of five *Bacillus oligo-1*, 6-glucosidases. *Applied microbiology and biotechnology*, 26(6), 546-551.
- Tamura, K., Stecher, G., y Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
- Tanghe, M., Danneels, B., Camattari, A., Glieder, A., *et al.* (2015). Recombinant expression of *Trichoderma reesei* Cel61A in *Pichia pastoris*: optimizing yield and N-terminal processing. 57(11-12), 1010-1017.
- Taraş, S., y Woinaroschy, A. (2011). Multi-objective optimization of pyruvic acid bioprocess with a Matlab-Superpro Designer interface. *UPB Sci Bull Ser B*, 73(3), 37-48.
- Teng, C., Jiang, Y., Xu, Y., Li, Q., *et al.* (2019). Improving the thermostability and catalytic efficiency of GH11 xylanase PjxA by adding disulfide bridges. 128, 354-362.
- Tizei, P. A., Csibra, E., Torres, L., y Pinheiro, V. (2016). Selection platforms for directed evolution in synthetic biology. 44(4), 1165-1175.
- Tomotani, E. J., y Vitolo, M. (2006). Catalytic performance of invertase immobilized by adsorption on anionic exchange resin. *Process Biochemistry*, 41(6), 1325-1331.

- Tompa, D. R., Gromiha, M. M., y Saraboji, K. (2016). Contribution of main chain and side chain atoms and their locations to the stability of thermophilic proteins. *64*, 85-93.
- Transmisibles, O. M. d. E. N. (2016). Últimas cifras de diabetes en México – ENSANUT MC. Retrieved from <http://oment.uanl.mx/ultimas-cifras-de-diabetes-en-mexico-ensanut-mc-2016/>
- Trimble, R. B., Lubowski, C., Hauer III, C. R., Stack, R., *et al.* (2004). Characterization of N-and O-linked glycosylation of recombinant human bile salt–stimulated lipase secreted by *Pichia pastoris*. *Glycobiology*, *14*(3), 265-274.
- Tsuyuki, K. i., Sugitani, T., Miyata, Y., Ebashi, T., *et al.* (1992). Isolation and characterization of isomaltulose-and trehalulose-producing bacteria from Thailand soil. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *38*(5), 483-490.
- Turner, P., Mamo, G., y Karlsson, E. (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *6*(1), 9.
- van Can, J. G., van Loon, L. J., Brouns, F., y Blaak, E. E. (2012). Reduced glycaemic and insulinaemic responses following trehalose and isomaltulose ingestion: implications for postprandial substrate use in impaired glucose-tolerant subjects. *British Journal of Nutrition*, *108*(7), 1210-1217.
- Varki, A., Cummings, R. D., Aebi, M., Packer, N. H., *et al.* (2015). Symbol nomenclature for graphical representations of glycans. *Glycobiology*, *25*(12), 1323-1324.
- Veronese, T., y Perlot, P. (1998). Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site. *441*(3), 348-352.
- Véronèse, T., y Perlot, P. (1998). Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. *Enzyme and Microbial Technology*, *24*(5-6), 263-269.

- Vicente, A. I., Viña-Gonzalez, J., Mateljak, I., Monza, E., *et al.* (2020). Enhancing thermostability by modifying flexible surface loops in an evolved high-redox potential laccase. *66*(3), e16747.
- Villalonga, R., Gómez, L., Ramírez, H. L., y Villalonga, M. L. (1999). Stabilization of  $\alpha$ -amylase by chemical modification with carboxymethylcellulose. *74*(7), 635-638.
- Villiger, T. K., Scibona, E., Stettler, M., Broly, H., *et al.* (2016). Controlling the time evolution of mAb N-linked glycosylation-Part II: Model-based predictions. *Biotechnology progress*, *32*(5), 1135-1148.
- Wang, B., Zhang, Y., Li, X., y Li, R. (2019). Comparison of immobilization methods of sucrose isomerase Pall with embedding and crosslinking. *37*(1), 36-40.
- Wang, H., Chen, L., Qu, Z., Yin, Y., *et al.* (2020a). Modeling of multi-scale transport phenomena in shale gas production—a critical review. *262*, 114575.
- Wang, J., Wang, Y., Wang, X., Zhang, D., *et al.* (2016). Enhanced thermal stability of lichenase from *Bacillus subtilis* 168 by SpyTag/SpyCatcher-mediated spontaneous cyclization. *9*, 1-9.
- Wang, R., Wang, S., Xu, Y., y Yu, X. (2020b). Enhancing the thermostability of *Rhizopus chinensis* lipase by rational design and MD simulations.
- Wang, Z., Guo, C., Liu, L., y Huang, H. (2018). Effects of N-glycosylation on the biochemical properties of recombinant bEKL expressed in *Pichia pastoris*. *114*, 40-47.
- Warren, G. L., y Petsko, G. A. (1995). Composition analysis of  $\alpha$ -helices in thermophilic organisms. *Protein Engineering, Design and Selection*, *8*(9), 905-913.
- Watanabe, R., Arimura, Y., Ishii, Y., y Kirimura, K. (2020). Crystal structure of  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme XgtA from *Xanthomonas campestris* WU-9701. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *526*(3), 580-585.
- Watzlawick, H., y Mattes, R. (2009). Gene cloning, protein characterization, and alteration of product selectivity for the trehalulose hydrolase and trehalulose

- synthase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(22), 7026-7036.
- White, C., Kempf, N., y Komives, E. (1994). Expression of highly disulfide-bonded proteins in *Pichia pastoris*. *Structure*, 2(11), 1003-1005.
- Wu, L., y Birch, R. (2004). Characterization of *Pantoea dispersa* UQ68J: producer of a highly efficient sucrose isomerase for isomaltulose biosynthesis. *Journal of applied microbiology*, 97(1), 93-103.
- Wu, L., y Birch, R. G. (2005). Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(3), 1581-1590.
- Wu, L., Liu, Y., Chi, B., Xu, Z., et al. (2015). An innovative method for immobilizing sucrose isomerase on  $\epsilon$ -poly-L-lysine modified mesoporous TiO<sub>2</sub>. 187, 182-188.
- Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J. C., Baldenius, K., et al. (2020). Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications.
- Wu, X., Wang, Y., Chen, X., y Chen, J. (2018). Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423. 109, 329-337.
- Wylie-Rosett, J., Segal-Isaacson, C., y Segal-Isaacson, A. (2004). Carbohydrates and increases in obesity: does the type of carbohydrate make a difference? *Obesity research*, 12(S11), 124S-129S.
- Xie, Y., An, J., Yang, G., Wu, G., et al. (2014). Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site. *Journal of Biological Chemistry*, 289(11), 7994-8006.
- Xu, Z., Cen, Y.-K., Zou, S.-P., Xue, Y.-P., et al. (2020a). Recent advances in the improvement of enzyme thermostability by structure modification. 40(1), 83-98.
- Xu, Z., Li, S., Li, J., Li, Y., et al. (2013). The structural basis of *Erwinia rhapontici* isomaltulose synthase. *PLoS One*, 8(9), e74788.

- Xu, Z., Xue, Y.-P., Zou, S.-P., y Zheng, Y.-G. (2020b). Enzyme engineering strategies to confer thermostability. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals* (pp. 67-89): Elsevier.
- Xue, H., Zhou, J., You, C., Huang, Q., *et al.* (2012). Amino acid substitutions in the N-terminus, cord and  $\alpha$ -helix domains improved the thermostability of a family 11 xylanase XynR8. *39*(9), 1279-1288.
- Yang, A.-S., y Honig, B. (1993). On the pH dependence of protein stability. *Journal of molecular biology*, *231*(2), 459-474.
- Yang, W., Su, L., Wang, L., Wu, J., *et al.* (2022). Alpha-glucanotransferase from the glycoside hydrolase family synthesizes  $\alpha$  (1–6)-linked products from starch: Features and synthesis pathways of the products. *Trends in Food Science & Technology*.
- Yin, B., Hui, Q., Kashif, M., Yu, R., *et al.* (2019). Simultaneous Enhancement of Thermostability and Catalytic Activity of a Metagenome-Derived  $\beta$ -Glucosidase Using Directed Evolution for the Biosynthesis of Butyl Glucoside. *20*(24), 6224.
- You, S., Xie, C., Ma, R., Huang, H.-q., *et al.* (2019). Improvement in catalytic activity and thermostability of a GH10 xylanase and its synergistic degradation of biomass with cellulase. *12*(1), 1-15.
- Zhan, Y., Zhu, P., Liang, J., Xu, Z., *et al.* (2020). Economical production of isomaltulose from agricultural residues in a system with sucrose isomerase displayed on *Bacillus subtilis* spores. *Bioprocess and biosystems engineering*, *43*(1), 75-84.
- Zhang, D., Li, N., Lok, S.-M., Zhang, L.-H., *et al.* (2003). Isomaltulose synthase (Pall) of *Klebsiella* sp. LX3: crystal structure and implication of mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(37), 35428-35434.
- Zhang, D., Li, X., y Zhang, L.-H. (2002). Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp. strain LX3: gene cloning and characterization and engineering of thermostability. *Applied and environmental microbiology*, *68*(6), 2676-2682.

- Zhang, F., Cheng, F., Jia, D.-X., Gu, Y.-H., *et al.* (2021a). Characterization of a recombinant sucrose isomerase and its application to enzymatic production of isomaltulose. *Biotechnology letters*, 43, 261-269.
- Zhang, H., Sang, J., Zhang, Y., Sun, T., *et al.* (2019a). Rational design of a *Yarrowia lipolytica* derived lipase for improved thermostability. 137, 1190-1198.
- Zhang, H., Zhai, W., Lin, L., Wang, P., *et al.* (2021b). In Silico Rational Design and Protein Engineering of Disulfide Bridges of an  $\alpha$ -Amylase from *Geobacillus* sp. to Improve Thermostability. *Starch-Stärke*, 73(9-10), 2000274.
- Zhang, J., Shi, H., Xu, L., Zhu, X., *et al.* (2015). Site-directed mutagenesis of a hyperthermophilic endoglucanase Cel12B from *Thermotoga maritima* based on rational design. 10(7), e0133824.
- Zhang, P., Wang, Z.-P., Liu, S., Wang, Y.-L., *et al.* (2019b). Overexpression of secreted sucrose isomerase in *Yarrowia lipolytica* and its application in isomaltulose production after immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 97-103.
- Zhang, P., Wang, Z.-P., Sheng, J., Zheng, Y., *et al.* (2018). High and efficient isomaltulose production using an engineered *Yarrowia lipolytica* strain. *Bioresource technology*, 265, 577-580.
- Zheng, F., Vermaas, J. V., Zheng, J., Wang, Y., *et al.* (2019a). Activity and thermostability of GH5 endoglucanase chimeras from mesophilic and thermophilic parents. 85(5).
- Zheng, Y.-Z., Zhou, Y., Deng, G., Guo, R., *et al.* (2020). A combination of FTIR and DFT to study the microscopic structure and hydrogen-bonding interaction properties of the BMIM BF<sub>4</sub> and water. 226, 117624.
- Zheng, Y., Wang, Z., Ji, X., y Sheng, J. (2019b). Display of a sucrose isomerase on the cell surface of *Yarrowia lipolytica* for synthesis of isomaltulose from sugar cane by-products. 3 *Biotech*, 9, 1-7.





- Zhou, C., Xue, Y., y Ma, Y. (2015). Evaluation and directed evolution for thermostability improvement of a GH 13 thermostable  $\alpha$ -glucosidase from *Thermus thermophilus* TC11. *BMC biotechnology*, 15, 1-11.
- Zou, S., Huang, S., Kaleem, I., y Li, C. (2013). N-Glycosylation enhances functional and structural stability of recombinant  $\beta$ -glucuronidase expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 164(1), 75-81.



# Thermostability improvement of sucrose isomerase PalI NX-5: a comprehensive strategy

A. J. Sardiña-Peña · L. Ballinas-Casarrubias · T. S. Siqueiros-Cendón ·  
E. A. Espinoza-Sánchez · N. R. Flores-Holguín · B. F. Iglesias-Figueroa ·  
Q. Rascón-Cruz 

Received: 14 September 2022 / Revised: 29 March 2023 / Accepted: 27 April 2023  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2023

## Abstract

**Objective** To increase the thermal stability of sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5, we designed a comprehensive strategy that combines different thermostabilizing elements.

**Results** We identified 19 high B value amino acid residues for site-directed mutagenesis. An in silico evaluation of the influence of post-translational modifications on the thermostability was also carried out. The sucrose isomerase variants were expressed in *Pichia pastoris* X33. Thus, for the first time, we report

the expression and characterization of glycosylated sucrose isomerases. The designed mutants K174Q, L202E and K174Q/L202E, showed an increase in their optimal temperature of 5 °C, while their half-lives increased 2.21, 1.73 and 2.89 times, respectively. The mutants showed an increase in activity of 20.3% up to 25.3%. The  $K_m$  values for the K174Q, L202E, and K174Q/L202E mutants decreased by 5.1%, 7.9%, and 9.4%, respectively; furthermore, the catalytic efficiency increased by up to 16%.

**Conclusions** With the comprehensive strategy followed, we successfully obtain engineered mutants more suitable for industrial applications than their counterparts: native (this research) and wild-type from *E. rhapontici* NX-5, without compromising the catalytic activity of the molecule.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10529-023-03388-6>.

A. J. Sardiña-Peña · T. S. Siqueiros-Cendón ·  
E. A. Espinoza-Sánchez · B. F. Iglesias-Figueroa ·  
Q. Rascón-Cruz (✉)  
Laboratorio de Biotecnología I, Facultad de Ciencias  
Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua,  
Circuito Universitarios s/n Nuevo Campus Universitario,  
C. P. 31125 Chihuahua, México  
e-mail: [qrascon@uach.mx](mailto:qrascon@uach.mx)

L. Ballinas-Casarrubias  
Laboratorio de Química Analítica III, Facultad de  
Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua,  
Circuito Universitarios s/n Nuevo Campus Universitario,  
C. P. 31125 Chihuahua, México

N. R. Flores-Holguín  
Laboratorio Virtual NANOCOSMOS, Departamento de  
Medio Ambiente y Energía, Centro de Investigación en  
Materiales Avanzados, Chihuahua, México

**Keywords** Isomaltulose · Protein engineering ·  
Sucrose isomerase · Thermostability

## Introduction

A diet rich in sugars is closely related to the appearance of insulin resistance (type II diabetes) (Chicco et al. 2003; Pagliassotti et al. 2002; Wylie-Rosett et al. 2004). An alternative to sucrose is one of its isomers, isomaltulose. This molecule has the same total caloric value as sucrose but is slowly digested. This feature leads to a low glycemic response and guarantees a prolonged supply of glucose. For this reason,

isomaltulose has become a promising nutrient for diabetics and athletes (de Groot et al. 2020; Rubio-Arreaez et al. 2017; Sokołowska et al. 2022).

Isomaltulose exists in extremely small quantities in nature and is difficult to synthesize chemically (Kawaguti 2007). As a consequence, the enzyme sucrose isomerase (EC 5.4.99.11) has been identified as a commercially attractive way for isomaltulose production (Lee et al. 2011). In addition to isomaltulose, the catalytic action of sucrose isomerases derives and cleaves the sucrose molecule into trehalulose, glucose, and fructose (Huang et al. 1998; Véronèse et al. 1999). In this process, the ratio of products will depend on the bacterial strain producing the enzyme and the reaction conditions (Aroonual et al. 2007; Cha et al. 2009; Duan et al. 2016; Ravaud et al. 2009; Salvucci et al. 2003; Wu et al. 2005).

Among the microbial enzymes capable of producing isomaltulose that have been purified and characterized so far are the native isoforms of *Erwinia rhapontici* NX-5 (Ren et al. 2011), *Erwinia* sp. D12 (Kawaguti et al. 2010a), *Serratia plymuthica* ATCC15928 (Véronèse et al. 1999), as well as the recombinant forms of *E. rhapontici* DSM 4484 (Börnke et al. 2001), *E. rhapontici* NX-5 (Li et al. 2011), *Enterobacter* sp. FMB-1 (Cha et al. 2009), *Klebsiella planticola* UQ14S (Wu et al. 2005), *Erwinia rhapontici* WAC2928 (Wu et al. 2005), and *Pantoea dispersa* UQ68J (Li et al. 2011). Despite the variety of sucrose isomerases that have been identified, all their isoforms are mesophilic enzymes. The low activity and stability of sucrose isomerases at temperatures above 40 °C is the bottleneck for its industrial application (Mu et al. 2014).

Biotechnological research to increase the thermostability of enzymes has become an important field in industrial applications (Fágáin 1995). Numerous strategies have been developed to enhance the thermostability of proteins (Eijsink et al. 2005; Pack et al. 2004). Nevertheless, there is no universal procedure to achieve protein thermostabilization. Despite this, the success of the thermostabilization process is usually associated with increasing the rigidity of the protein structure (Xu et al. 2020). Some factors that can increase rigidity are: the appearance of new hydrogen interactions (Gong et al. 2018; Han et al. 2019; You et al. 2019), disulfide bridges (Bashirova et al. 2019; He et al. 2019; Teng et al. 2019), salt bridges (Vicente et al. 2020; Wang et al. 2020), shortening

loops (Qiao et al. 2020), electrostatic surfaces optimization (Dotsenko et al. 2020), greater solvation in specific regions of the protein, better packaging of the molecule (Zheng et al. 2019) and glycosylation (Han et al. 2020; He et al. 2019).

A method designed for identifying hot spots, to strength rigidity is the B factor methodology (Han et al. 2019; He et al. 2019; Parthasarathy et al. 2000). The B factor profile of a protein represents the diffusion of atomic electron densities around its equilibrium positions due to thermal movement and positional disorder (Yuan et al. 2003). As a result, the B values provide information on the flexibility of amino acid residues and protein stability (Reetz et al. 2006). However, B factor profile analysis requires crystallographic information of the target protein. However, this might seem a limitation; today, more than 700,000 proteins have a reported crystal structure in NCBI. In Protein Data Bank, there are 25 structures of sucrose isomerase isoforms with or without interacted chemicals, including the enzymes from *E. rhapontici* NX-5 (Xu et al. 2013).

In this study, a comprehensive strategy focused on combining different principles that contribute to thermostability was followed. The residues to be mutated in the sucrose isomerase PalI NX-5 were identified based on B factors analysis, the prediction of hydrogen bond formation, and molecular docking at the active site. In addition, the potential presence of post-translational modifications influencing target protein thermostability was evaluated *in silico*. Based on this, engineered variants of the sucrose isomerase PalI NX-5 were expressed in *Pichia pastoris* X33, being this research the first report of expression and characterization of glycosylated sucrose isomerases. The engineered mutants showed enhanced thermostability and catalysis.

## Materials and methods

### Design and construction of mutants

The sucrose isomerase PalI NX-5 structure was modeled using the Swiss-Model software (<https://swissmodel.expasy.org/>) and the 4hox crystal structure (Xu et al. 2013). Using the B-FITTER software, the B values of the 600 amino acid residues that make up the enzyme were obtained, from which the average B

value of the molecule was calculated. Then, the amino acid residues whose B factor was between 2.5 and 3.5 times the mean of the protein value were selected. The selection of more rigid amino acids was carried out using the ROSETTA DESIGN server (<http://rosetta.tadesign.med.unc.edu>). Each selected residue was replaced by the remaining 19 biological amino acids. Using PyMOL software, the appearance of potential interactions, involving mutant residues or their neighborhood, was analyzed. The AutoDockTools-1.5.6 and AutoDock Vina softwares were used to verify the conservation of the enzyme–substrate interaction, and thus the potential affinity of the mutant molecules towards the substrate. Default docking parameters were used, and point charges were initially assigned according to the AutoDock semi-empirical force field. The mutants with the most promising (in silico) properties were obtained by site-directed mutagenesis using as a starting point the native protein. The possible presence of post-translational modifications influencing target protein thermostability was evaluated using Prosite (<https://prosite.expasy.org/>) (De Castro et al. 2006).

#### Strains, vectors, and materials

The optimized nucleotide sequences of the *pall* gene variants were obtained using the primary structures of the PalI NX-5 sucrose isomerase and designed mutants. For this, the Reverse Translate tool of the Sequence Manipulation Suite (<https://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>) (Stothard 2000) and the use codons of *Pichia pastoris* were utilized. To eliminate unwanted restriction sites, the native and mutant sequences of the *pall* NX-5 gene were first subjected to silent point mutations. These genes were flanked by restriction sites for EcoRI (5' end) and SalI (3' end), then synthesized and cloned into the yeast expression vector pPICZ $\alpha$  A (Invitrogen®), generating the plasmids pSINX5n (containing the native gene), pSINX5-L202E (containing the gene encoding the L202E mutant), pSINX5-K174Q (containing the gene encoding the K174Q mutant), and pSINX5-L202E-K174Q (containing the gene encoding the double mutant). For the constructs pSINX5n, pSINX5-L202, pSINX5-K174Q and pSINX5-L202E-K174Q, the expression of the genes of interest is under the control of the AOX1 gene promoter (Alcohol oxidase 1). In addition, the constructs

contain a selectable marker gene that confers resistance to zeocin, a *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$  factor signal peptide that allows protein secretion into the medium, a bacterial origin of replication, and a coding sequence for a six-histidine tag.

Plasmids were propagated in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , for which chemically competent *E. coli* DH5 $\alpha$  cells (Invitrogen®, Carlsbad CA, USA) were prepared and transformed by heat shock following the protocol reported by Hoisington et al. (1998). A total 12 putative clones were verified by restriction enzyme analysis of DNA using EcoRI (Thermo Scientific™) and SalI (Thermo Scientific™) enzymes. After characterization, a selected clone from each plasmid was linearized with SacI (Thermo Scientific™). 500 ng of linearized DNA were used to transform electrocompetent *P. pastoris* X33 cells (provided by CIAD, Cd. Cuauhtémoc, Chih. México) for recombinant expression of native and mutant PalI NX-5. For the preparation of electrocompetent cells of *P. pastoris* X33, the protocol reported by Cregg et al. (1998) was followed. Transformation was achieved using a BioRad MicroPulser (BioRad, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's instructions. After 3 days of incubation in the presence of the selection marker (200  $\mu\text{g zeocin ml}^{-1}$ ), zeocin-resistant clones were isolated for analysis.

#### Culture conditions and purification of sucrose isomerase variants

*E. coli* DH5 $\alpha$  was cultured at 37 °C in Luria–Bertani (LB) broth (10 g tryptone  $\text{l}^{-1}$ , 5 g yeast extract  $\text{l}^{-1}$ , 10 g NaCl  $\text{l}^{-1}$ ) and LB plates (15 g agar  $\text{l}^{-1}$ ) supplemented with zeocin (25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) as the selective marker. *P. pastoris* X33 was cultured at 30 °C and 250 rpm on YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) broth and YPD plates (20 g agar  $\text{l}^{-1}$ ) supplemented with zeocin (200  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) as the selective marker. Induction of expression of sucrose isomerase PalI NX-5 variants was performed as proposed by Jiang et al. (2008) using BMMY media (PBS 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pH 6.5, 1% yeast extract (Sigma-Aldrich®), 2% peptone (Sigma-Aldrich®), 1.34% YNB (Sigma-Aldrich®), 400  $\mu\text{g biotin l}^{-1}$  (Sigma-Aldrich®) and 0.5% methanol (Sigma-Aldrich®)).

Solid ammonium sulfate was added to the yeast culture supernatants to 60% saturation. The samples were incubated with shaking (100 rpm) for 2 h

at 4 °C. The active precipitate was collected by centrifugation at 10,000×g for 30 min and dissolved in 1X PBS (pH 7.4). The samples were dialyzed against 1X PBS pH 7.4 for 24 h. After dialysis, the protein extracts were purified using a high affinity Ni-loaded resin (GenScript®). The purification process was carried out following the native purification strategy proposed in the manufacturer's instructions (High Affinity Ni-Charged Resin FF, Protocol Version: 01, Cat No: L00666) to obtain purified PalI NX-5 sucrose isomerase variants. Additionally, following a batch approach, the dialyzed protein extracts were incubated with the resin (Extract/Resin ratio: 2.5/1) for a period of 12 h at 4 °C and 100 rpm. The flow through the column was given by the action of gravity.

### SDS-PAGE and protein assay

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using 12% (w/v) acrylamide gel as described by Laemmli (1970). Protein bands were visualized by Coomassie brilliant blue R-250 staining. For carbohydrate staining, the Glycoprotein Detection Kit (Sigma-Aldrich®) was used. The molecular weight marker PageRuler™ Plus (ThermoFisher) (10–250 kDa) was used to estimate the molecular weight of the sucrose isomerase PalI NX-5 variants. Protein concentration was determined by the Lowry method with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich®) as the standard.

### Characterization of sucrose isomerase PalI NX-5 variants

#### *Sucrose isomerase activity assay*

The activity of sucrose isomerase was measured at 30 °C in 50 mM citric acid/sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing sucrose at a final concentration of 292 mM. Specifically, 100 µl diluted enzyme solution was mixed with 400 µl of an assay solution and incubated for 15 min. The reaction was stopped by boiling the mixture in a 100 °C water bath for 5 min (Zhang et al. 2002). Afterward, the sucrose, isomaltulose, trehalulose, glucose, and fructose contents of the assay mixture were quantified using a HPLC system equipped with a refractive index detector, as described below. One unit of sucrose isomerase activity was defined as the amount of

enzyme that produced 1 µmol of isomaltulose or trehalulose per min under the conditions described above.

#### *Effects of pH and temperature on enzyme activity*

To determine the optimal pH for enzyme activity, assays were carried out in 50 mM buffers containing citric acid/sodium phosphate (pH 4.0 to 6.0), sodium phosphate (pH 6.0 to 8.0), or glycine/NaOH (pH 8.0 to 9.0). The optimal temperature was determined between 15 °C and 70 °C in 50 mM citric acid/sodium phosphate buffer (pH 6.0), using 292 mM sucrose as the substrate.

To test enzyme stability, the purified enzyme was incubated at 40 °C. Aliquots were removed at different incubation times, and the residual activity was measured at 30 °C in the same buffer using 292 mM sucrose as substrate. The initial activity before incubation was taken as 100%. All enzymatic assays were performed in triplicate, and the results are expressed as the mean ± standard deviation.

#### *Measurement of kinetic parameters*

To determine the kinetic parameters, sucrose isomerase was measured by incubating the purified enzyme with different sucrose concentrations (110, 120, 135, 146, 190, 234, 292, 438, 584, 730, 876 y 1010 mM) under standard assay conditions. The Km and Vmax values were determined by Michaelis–Menten plots. All kinetic parameters presented in this study were determined in triplicate, and the results are expressed as the mean ± standard deviation.

#### *Effect of sucrose concentration on isomaltulose production*

The reactions were incubated for 10 h at 35 °C in 50 mM citric acid/sodium phosphate buffer (pH 6.0). Sucrose concentrations of 300, 350, 400, 450 and 500 g·l<sup>-1</sup> were evaluated. 80 U of sucrose isomerase were used per gram of sucrose. The reactions were stopped by boiling the mixture in a 100 °C water bath for 5 min (Zhang et al. 2002). Yield was expressed in  $\frac{\text{g}_{\text{isomaltulose}}}{\text{g}_{\text{sucrose}}}$ .

## HPLC analysis

The analysis of the sucrose, isomaltulose, trehalulose and glucose contents of the reaction mixture was carried out with an Agilent 1100 high-performance liquid chromatography (HPLC) system. Chromatographic separation was achieved at a flow rate of  $0.8 \text{ ml min}^{-1}$ , temperature:  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , mobile phase: acetonitrile/water (71:29) using the Zorbax NH2 analytical  $4.6 \times 250 \text{ mm } 5 \text{ }\mu\text{m}$  Agilent® column. A refractive index detector was used.

## Results and discussion

### Design of sucrose isomerase PalI NX-5 mutants

#### *Identification of potential residues to be substituted*

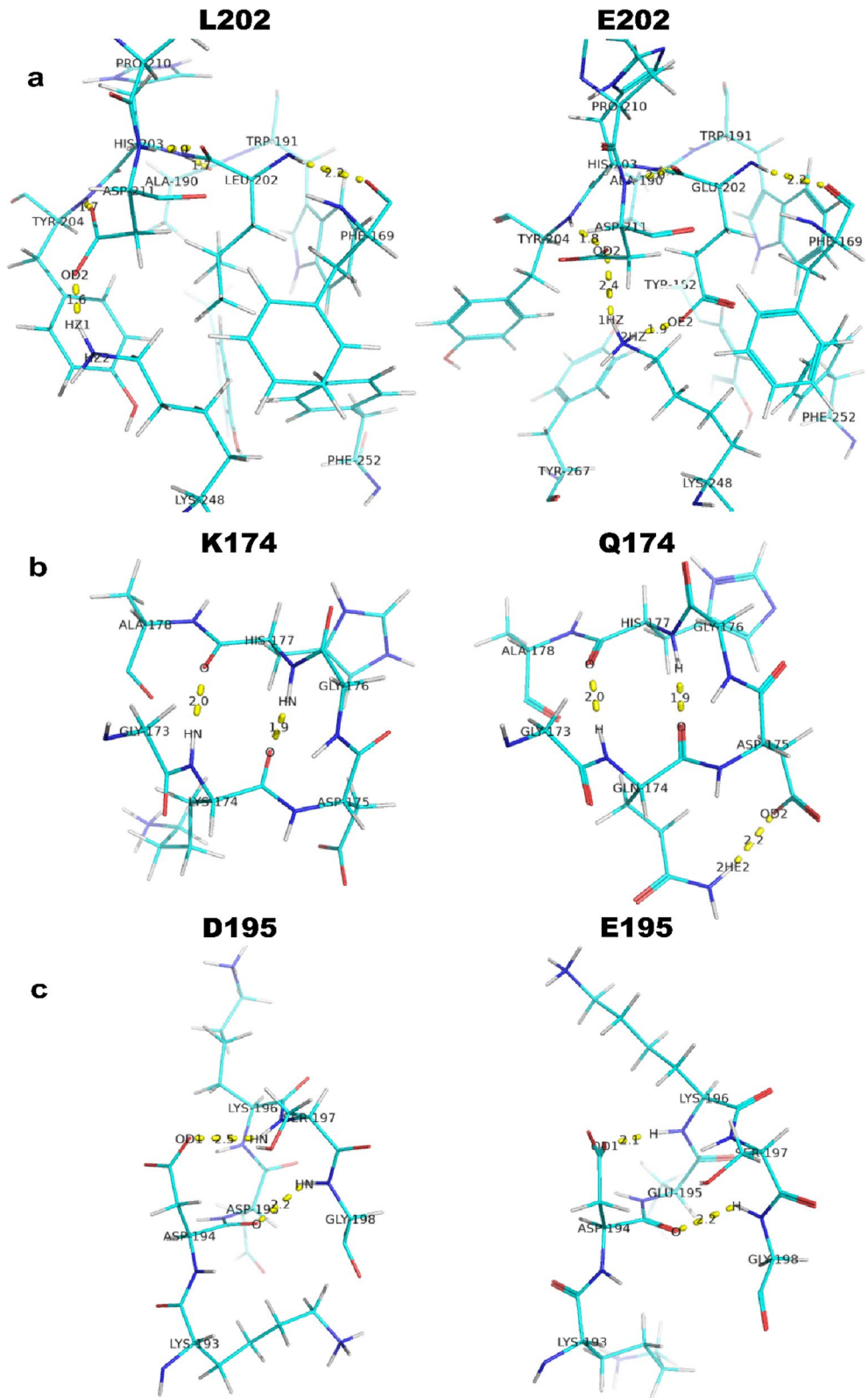
There is no universal procedure for the thermostabilization of an enzyme. However, in this research, we follow a comprehensive strategy that combines different principles contributing to thermostability. For this, the B factor profile of the crystalline structures 4hox, 4how and 4hoz (Xu et al. 2013) of the sucrose isomerase PalI NX-5 was analyzed. Thus, 19 amino acid residues with B values between 2.5 and 3.5 times the average of the molecule (average B factor: 16.5) were identified (Supplementary Table 1). Using the ROSETTA DESIGN software, these residues were subjected to individual substitutions. It has been observed that the prevalence of hydrogen bond networks in mesophilic enzymes is lower than in thermophilic ones (Tompa et al. 2016). In addition, the hydrogen bond is the most referenced physicochemical interaction to explain the increase in thermostability (Querol et al. 1996). For this reason, the appearance of potential interactions involving the mutant residues, or their neighborhood, was analyzed in silico. Only in the substitutions Leu202Glu, Lys174Gln, and Asp195Glu new interactions or reinforcement of the existing ones were observed.

As shown in Fig. 1a, when Glu occupied position 202, a new interaction between Glu202 and Lys248 is predicted. A restructuring of the hydrogen bond network is also observed in the vicinity of Asp211, which now interacts with Ala190 instead of Tyr204. The readjustment observed in the hydrogen bonds network could imply an increase in the thermal

stability of the molecule since, in addition to the appearance of a new interaction (Glu202–Lys248), the network now encompasses more distant residues belonging to elements different from the side-chain. When comparing the neighborhood of the Lys174 and Gln174 residues (Fig. 1b), no changes were observed in the interaction distances with the His177 residue. However, a new interaction between Asp175 and Gln174 was predicted. For the Asp195Glu substitution (Fig. 1c), a repositioning of the Asp194–Ser197 hydrogen bond was observed, settling between Asp 194 and Lys 196. Associated with this restructuring, a reduction in the interaction distance was predicted, going from 2.5 to 2.1 Å. Precisely, Zheng et al. (2020) reported that for the occurrence of hydrogen bonds, the distance between the proton acceptor and the hydrogen atom must be less than the sum of the Van der Waals atomic radii of the two atoms in question; in the case of the oxygen-hydrogen combination, this distance is 2.5 Å (Pauling 1960). Thus, the reduction in the distance of the hydrogen bond would imply a strengthening of this interaction.

Two elements that are interesting up to this point are: first that the substitutions for which interactions were observed do not correspond to the residues that presented the highest values of B factor, such as Asp175 and His177, confirming that the thermal stability is achieved through cooperative optimization of several factors rather than predominant interaction. Second, of the three substitutions where new interactions were observed in the neighborhood, one corresponds to Gln, a residue on which the protein statistics of Khan et al. (2019) indicate a poor prevalence in thermophilic molecules, while Warren et al. (1995) reported that the presence of Gln in helices of thermostable proteins is greater than in mesophilic proteins. Given this ambiguity, the practical evaluation will be conclusive.

The conservation of the enzyme–substrate interaction was verified in silico in the mutants Leu202Glu, Lys174Gln, Asp195Glu, and their combinations. In molecular docking analysis at the catalytic site, glucose was used instead of sucrose. It was taken into account that Véronèse et al. (1999) showed that glucose is a competitive inhibitor of sucrose; and that Véronèse et al. (1998) previously deduced the glycosyl binding of sucrose to the active site, assuming that free glucose binds to the enzyme at the same site and in the same way. The highest affinities (Viewed as



◀**Fig. 1** Appearance of potential interactions involving mutant residues or their neighborhood. **a** Residue arrangement and possible interactions in the vicinity of the Leu202 (native) and the Glu202 (mutant). **b** Residue arrangement and possible interactions in the vicinity of the Lys174 (native) and residue Gln174 (mutant). **c** Residue arrangement and possible interactions in the vicinity of the Asp195 (native) and residue Glu195 (mutant)

(Energy < 0) enzyme-glucose were predicted for the L202E, L202E/K174Q, K174Q/D195E, and L202E/D195E variants (Table 1). These variants presented interaction energies that were 6% higher than the native enzyme; the highest increase observed among the 1440 configurations analyzed. Based on the in silico data shown in Table 1, the mutants selected for recombinant expression and subsequent evaluation were the L202E, L202E/K174Q, and K174Q variants. Figure 2 shows the predicted interactions between D-glucose and the three variants L202E, L202E/K174Q, and K174Q, including the native enzyme. We were able to identify interactions between glucose and residues R325, D241, E295, D369, and H368. Zhang et al. (2003) have previously reported the catalytic function of these residues. These results suggest the potential conservation of the enzyme–substrate interaction.

#### Potential N-glycosylation of sucrose isomerase variants

Through Prosite (<https://prosite.expasy.org/>) (De Castro et al. 2006), we evaluated the potential presence of post-translational modifications that influence thermostability. Three potential sites to be N-glycosylated were identified in the sucrose isomerase PalI NX-5 variants. The first of these sites is found at position 144NHT146, including the catalytic residue H145, just inside the catalytic pocket. Taking into account that in the “endoplasmic reticulum—Golgi apparatus” pathway, the previously assembled glycans are added to the growing polypeptide chain (Colley et al. 2015), it would be expected that the glycosylation of residue N144 leads to obtaining of a glycoform with a non-functional tertiary structure. However, if the recombinant expression of sucrose isomerase PalI NX-5 were mediated by the  $\alpha$  factor secretion signal from *Saccharomyces cerevisiae*, the translocation to the endoplasmic reticulum would be post-translational

(Barrero et al. 2018), so the protein it would fold in the cytosol, and residue N144 would not be available to be glycosylated. The remaining two potential N-glycosylation sites (530NNS532 and 573NNS575) are located on the surface of the C-terminal domain of the molecule. Fortunately, the position of these consensus sequences for glycosylation is very close to hot spots of high B value. Specifically, the potential site 530NNS532 is located in ten residues from the 541GAE543 hot spot, while the site 573NNS575 is within the high B factor segment from residue E553 to residue R587.

Reports such as those by Colley et al. (2015), Katla et al. (2019), Benoit et al. (2006) and (Zou et al. 2013) agree that the presence of glycosylation in a protein constitutes, in a general sense, a contribution to the stability of the molecule, whether thermal, against pH, presence of proteases or stress physiological. Specifically, Benoit et al. (2006) isolated a feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* (naturally glycosylated), which is more thermostable than its non-glycosylated counterpart expressed in *E. coli*. On the other hand, Zou et al. (2013) observed that the structural and functional stability of  $\beta$ -glucuronidase from *Penicillium purpurogenum* was improved after its glycosylated expression in *P. pastoris* GS115 compared to its wild-type counterpart. However, as evidenced in the works of Han et al. (2020) y Hu et al. (2019), the effect of this post-translational modification is very complex and not always predictable or beneficial.

It has been observed that the stabilization caused by glycosylation is closely associated with the entropy and with the positions of the glycosylation sites in the protein (Helenius et al. 2004; Shental-Bechor et al. 2008). Glycans bound to flexible regions, in general, would confine the conformational space and stimulate protein entropy reduction, thus improving conformational stability at high temperatures (Adney et al. 2009; Dotsenko et al. 2016). Taking this context into account, it is possible to hypothesize that, since residues N530 and N573 are found in loop segments with high B factor, the addition of glycans to these positions will have a positive effect on stability compared to what we would expect for the wild-type variant of *E. rhapontici* NX-5 (not glycosylated), and even complement the substitutions made at positions K174Q and L202E.



**Table 1** Interaction energies at the catalytic site of sucrose isomerase PalI NX-5 variants and the D-glucose molecule. Default docking parameters were used, and point charges were initially assigned according to the AutoDock semi-empirical force field

Variant	Affinity (kcal/mol)	Condition
Native	-6.3	Seed: 11, state: 1
L202E	-6.7	Seed: 1, state: 1
K174Q	-6.5	Seed: 7, state: 1
D195E	-6.3	Seed: 11, state: 2
L202E/K174Q	-6.7	Seed: 17, state: 1
K174Q/D195E	-6.7	Seed: 10, state: 1
L202E/D195E	-6.7	Seed: 10, state: 1
K174Q/L202E/D195E	-6.3	Seed: 1, state: 1

### Site-directed mutagenesis and expression vectors

We started from the amino acid sequences of the four variants of sucrose isomerase PalI NX-5 (native, L202E, K174Q, and L202E/K174Q) previously analyzed. Using the Sequence Manipulation Suite software (Stothard 2000), the reverse translation of each of these sequences was carried out, for which the usage codons of *P. pastoris* were used. The variants of the *palI* NX-5 gene were inserted into the genomic integration vector pPICZ $\alpha$  A (INVITROGEN<sup>®</sup>), thus obtaining the constructions pSINX5n, pSINX5-L202E, pSINX5-K174Q and pSINX5-L202E-K174Q (Supplementary Fig. 1). These constructions were used for the transformation of *P. pastoris* X33 and consequently enabling the glycosylation of the variants of the sucrose isomerase PalI NX-5.

### Expression analysis of sucrose isomerase PalI NX-5 variants

*P. pastoris* X33 colonies transformed with the pSINX5n, pSINX5-L202E, pSINX5-K174Q, and pSINX5-L202E-K174Q constructs were cultured in a protein induction medium (see “Materials and methods”), the supernatant was collected, dialyzed and purified using a high-affinity Ni-Charged Resin (GenScript<sup>®</sup>). In terms of yield, once the culture and purification stages were completed,  $2.48 \pm 0.17$  mg of the purified enzymes were recovered per 100 ml culture. Aliquots of purified sucrose isomerase PalI NX-5 variants were analyzed by SDS-PAGE. After Coomassie

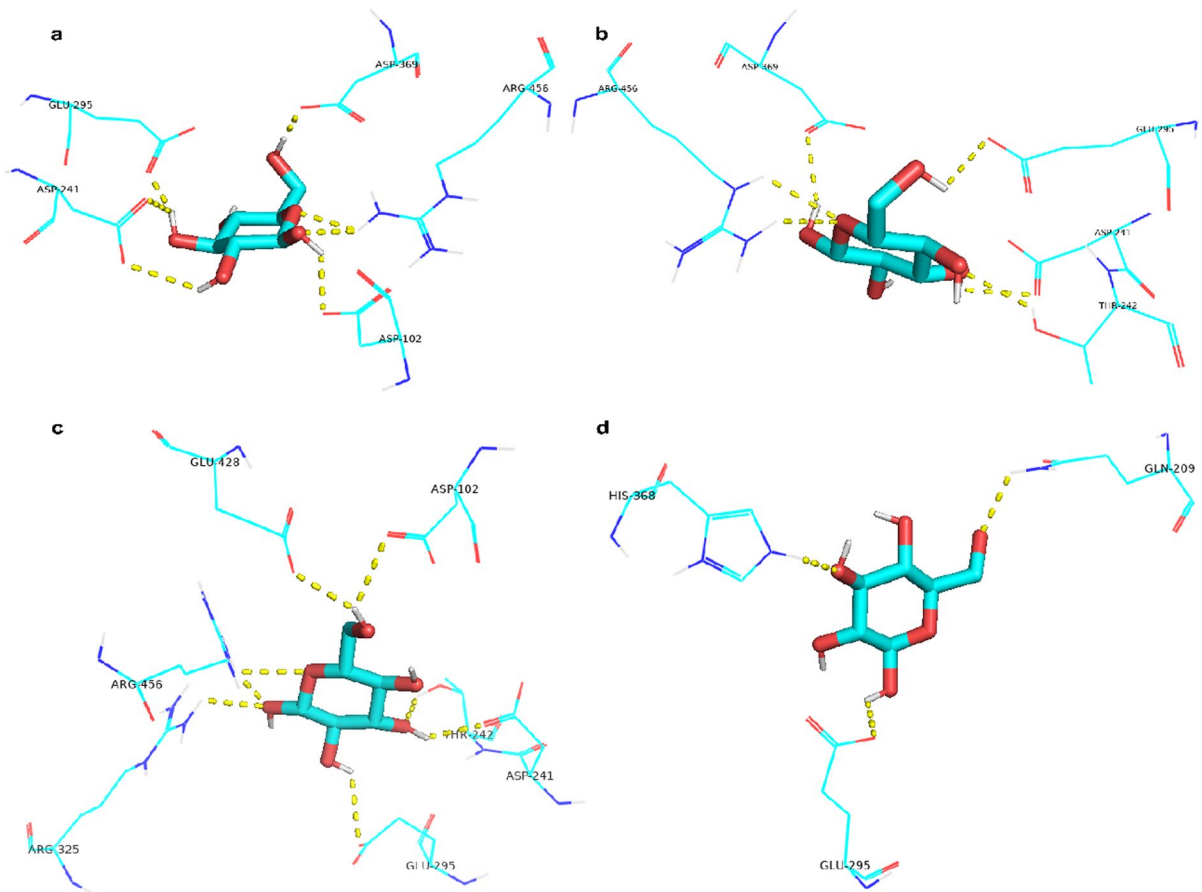
blue staining, the presence of bands at approximately 70 kDa was confirmed (Fig. 3a, lanes 3, 4, 5, and 6), close to the molecular weight predicted by Protein Calculator v3.4 (<http://protcalc.sourceforge.net/>). Interestingly, at least two bands were observed in the purified sucrose isomerase PalI NX-5 (Fig. 3a, lanes 3, 4, 5, and 6). One hypothesis for this behavior could be the capacity of *P. pastoris* to glycosylate secreted proteins. Thus, the bands observed for each of the purified PalI NX-5 variants could correspond to different levels of glycosylation reached during cell cultures.

To qualitatively verify the presence of glycoproteins in the purified samples, the Glycoprotein Detection Kit (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) was used. In Fig. 3b, the protein bands with glycans attached to their surface can be seen stained in purple. When comparing the migration profiles of the purified ones (Lanes 3, 4, 5, and 6) shown in Fig. 3a, b, it is verified that the observed bands correspond to glycoproteins. Thus, at least two main glycoforms of the sucrose isomerase PalI NX-5 variants would be obtained, this being the first report of expression and characterization of glycosylated sucrose isomerases.

### Influence of temperature on the activity and stability of recombinant sucrose isomerase PalI NX-5 variants

The influence of temperature on the isomerase activity of PalI NX-5 variants was studied in the range of 15 to 68 °C (Fig. 4a). The native variant of PalI NX-5 showed its maximum activity at 30 °C, coinciding with its counterparts: wild-type (from *E. rhapsontici* NX-5) (Ren et al. 2011) and recombinant (from *E. coli* BL21(DE3)) (Li et al. 2011). Thus, the glycosylated expression of the native variant apparently had no influence on the optimum temperature observed. In this sense, Hua et al. (2014), Han et al. (2014b) and Petrescu et al. (2004) have documented that N-glycosylation of recombinant enzymes expressed in yeast may not have significant effects on activity. Likewise, Han et al. (2014a) reported that some N-glycosylation sites are not essential for folding or cannot affect enzymatic activity due to their distance from the active site of the recombinant enzyme; thus, the presence (or absence) of the glycans has a minimal effect on enzyme activity.

The K174Q, L202E, and K174Q/L202E mutants showed an increase in the optimal temperature of

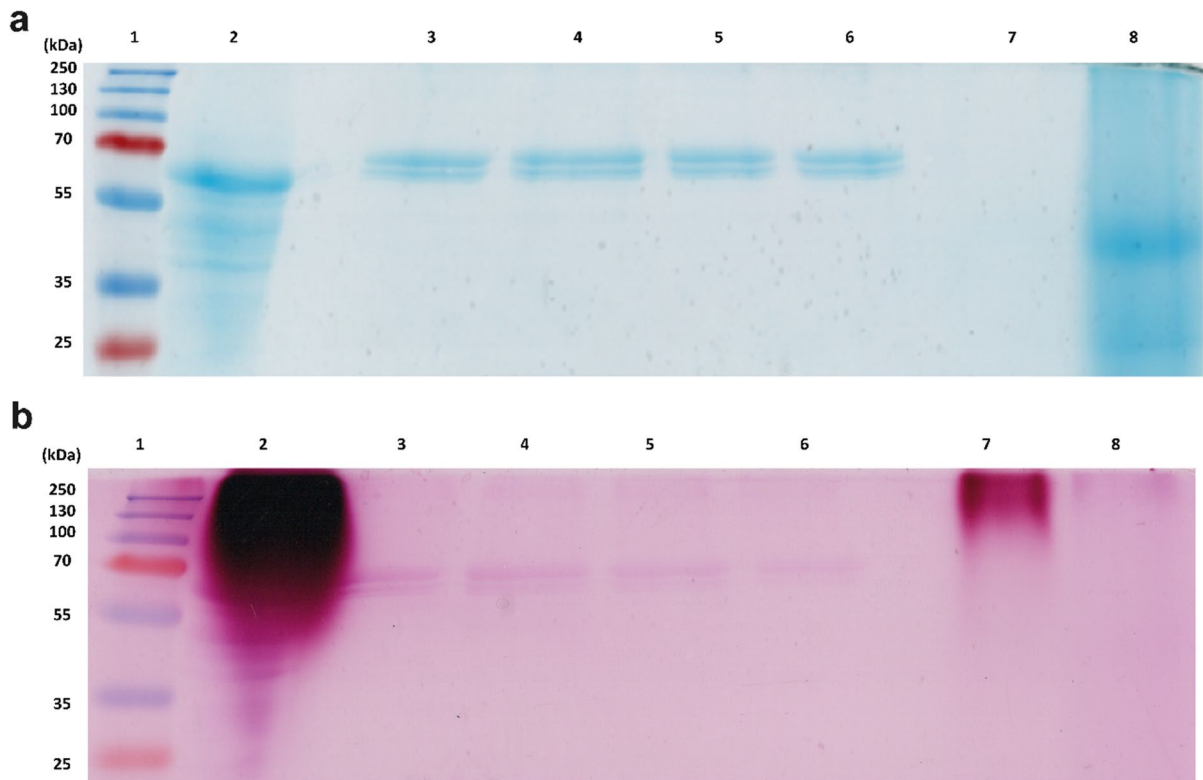


**Fig. 2** Arrangement of amino acid residues in the active site of Palli NX-5 sucrose isomerase variants and their predicted interactions with the D-glucose molecule (competitive inhibitor of sucrose). **a** Glucose-native enzyme interaction, seed: 11, state: 1, interaction energy  $-6.3$  kcal/mol. **b** Glucose-NX-5 Palli L202E interaction, seed: 1, state: 1, interaction energy  $-6.7$  kcal/mol. **c** Glucose-NX-5 Palli K174Q interaction, seed:

7, state: 1, interaction energy  $-6.5$  kcal/mol. **d** Glucose-NX-5 Palli K174Q/L202E interaction, seed: 17, state: 1, interaction energy  $-6.7$  kcal/mol. We identify interactions between glucose and residues R325, D241, E295, D369 and H368. Zhang et al. (2003) reported the catalytic role of His145, Asp241, Glu295, Asp369 and His368 residues, and the 325RLDRD329 motif in the sucrose isomerase from *Klebsiella sp.* LX3

$5$  °C (Optimal temperature:  $35$  °C). Furthermore, its relative activity at  $40$  °C was 96% of the observed optimum, while that of the native variant was only 87% of its optimum. Thus, the simple effect of the mutations made on the Palli NX-5 isoform, or its combination with the glycosylation of the molecule, resulted in the improvement of this indicator parameter of thermostability. The improvements achieved in the activity profile versus temperature (Fig. 4a) are not only important in the context of the Palli NX-5 isoform since most sucrose isomerases have a temperature optimum between  $30$  and  $35$  °C (Mu et al. 2014; Zhan et al. 2020; Zhang et al. 2019, 2018).

The thermostability of the Palli NX-5 variants was evaluated by incubating the enzymes in 50 mM sodium phosphate/citric acid buffer (pH 6.0), at a temperature of  $40$  °C. Their residual activities were then tested at different incubation times. As shown in Fig. 4b, the thermostabilities of the mutants were higher than that shown by the native enzyme, with the K174Q/L202E variant showing the best performance. At  $40$  °C and pH 6.0, the half-life of the native variant was 10.1 min. In comparison, the half-lives of the K174Q, L202E, and K174Q/L202E variants were 22.3 min, 17.5 min, and 29.2 min, respectively, which are 2.21, 1.73, and 2.89 times higher than those of the native variant. Both the increase observed in the



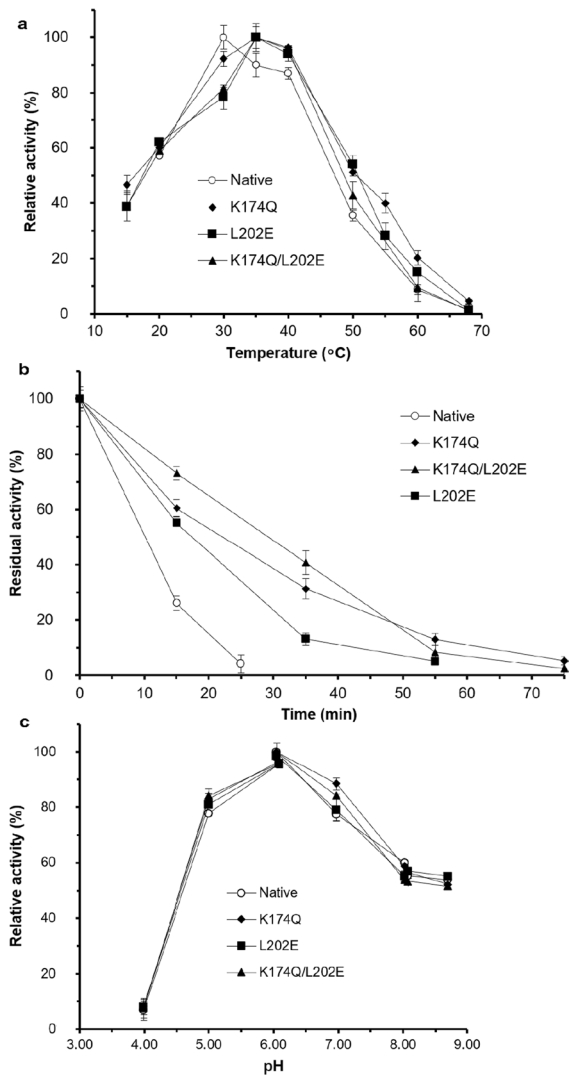
**Fig. 3** Identification of the variants of the sucrose isomerase PalI NX5 produced in *Pichia pastoris* X33 by SDS-PAGE. **a** Coomassie blue staining of purified proteins, lane 1: PageRuler™Plus molecular weight marker (ThermoFisher), lane 2: commercial laccase from *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich®) (glycosylation positive control), lane 3: sucrose isomerase PalI NX-5 native, lane 4: sucrose isomerase PalI NX-5 K174Q, lane 5: sucrose isomerase PalI NX-5 L202E, lane 6: sucrose isomerase PalI NX-5 K174Q/L202E, lane 7: dialysis of total proteins excreted by non-transformed *Pichia pastoris* X33 (negative control), lane 8: lyticase from *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich®) (glycosylation negative con-

trol). **b** Glycoprotein staining of purified proteins, lane 1: PageRuler™Plus molecular weight marker (ThermoFisher), lane 2: commercial laccase from *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich®) (glycosylation positive control), lane 3: sucrose isomerase PalI NX-5 native, lane 4: sucrose isomerase PalI NX-5 K174Q, lane 5: sucrose isomerase PalI NX-5 L202E, lane 6: sucrose isomerase PalI NX-5 K174Q/L202E, lane 7: dialysis of total proteins excreted by non-transformed *Pichia pastoris* X33 (negative control), lane 8: lyticase from *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich®) (glycosylation negative control)

optimal temperature of the mutants (Fig. 4a) and half-life times (Fig. 4b) confirm that the comprehensive strategy outlined in this research to achieve thermostabilization of sucrose isomerase PalI NX-5 was successful.

Two central factors that influence the thermal stability of a protein are the increase of hydrogen bonds (Bi et al. 2020; Masakari et al. 2020; You et al. 2019) and salt bridges (Bian et al. 2015). For this reason, we analyzed the possible appearance of these interactions and observed that associated with the K174Q and L202E substitutions was a reinforcement of the bonds network. Probably, the optimization of the bonds

network and its combination with the rigidity provided by N-glycosylation are the keys to the improvement achieved in the thermostability of sucrose isomerase PalI NX-5. Furthermore, with the L202E substitution, we removed an apolar residue, replacing it with a polar/charged one. Khan et al. (2019), when analyzing the relative abundance of amino acids in proteins, observed that charged residues (Charged residues > Glu > Basic residues, abundance) had the highest abundance in thermophilic proteins than in mesophilic ones. In this sense, Chakravorty et al. (2017) state that charged amino acids are involved in the appearance of ionic interactions and



**Fig. 4** Characterization of sucrose isomerase Palli NX-5 variants. **a** Influence of temperature on the activity of native and mutant variants of the recombinant sucrose isomerase Palli NX-5. **b** Progression of residual isomerase activity of Palli NX-5 variants incubated at 40 °C. **c** Influence of pH on the activity of native and mutant variants of the recombinant sucrose isomerase Palli NX-5

the formation of salt bridges, hence their positive contribution to thermostability. Also, Wang et al. (2020) confirmed the role of salt bridges in enhancing the thermal stability of the r27RCL enzyme from *Rhizopus chinensis*; precisely, the appearance of a new salt bridge between residues Glu292 and His171 of the mutant m31 was one of the factors that conditioned the improvement of the parameters indicating

thermostability. Likewise, Vicente et al. (2020), after implementing the Ser264Lys substitution, refer to the appearance of a new salt bridge (with the Asp205 residue) as a stabilizing interaction in a laccase variant with high redox potential from white rot fungi.

#### Influence of pH on the activity of recombinant sucrose isomerase Palli NX-5 variants

The study of the influence of pH on the activity of recombinant sucrose isomerase Palli NX-5 variants was carried out for pH between 4 and 9 (Fig. 4c). The native Palli NX-5 variant showed its maximum activity at pH 6.0, which was consistent with its wild-type counterpart expressed in *E. rhapsodica* NX-5 (Ren et al. 2011). In general, the activity profiles vs. pH of native and wild-type Palli NX-5 were found to be very similar. These results indicate that glycosylation of the molecule did not significantly affect the activity profile against pH, which was also observed by Han et al. (2020) during the improvement of the thermal stability of the endoglucanase CTendo45 from *Chaetomium thermophilum*.

The mutants and the native variant showed an optimal pH value of 6.0. In addition, the substitutions made did not substantially affect the activity profile against pH. Analogous behavior was observed by Duan et al. (2016) during the thermostabilization of sucrose isomerase Palli AS9. Similarly, Wang et al. (2020) did not observe changes in the profile of enzymatic activity against pH after making the substitutions S142A, D217V, Q239F, and S250Y, in the lipase r27RCL from *Rhizopus chinensis*. However, Wang et al. (2020) found differences when analyzing the stability of the r27RCL lipase variant against pH. Also Khan et al. (2019), during the thermostabilization of the mesophilic lipase of *Bacillus subtilis*, reported changes in the enzymatic activity profile against pH.

Few research addresses mutagenesis directed at changing the optimal pH of enzymes. In general, the proposed strategies focus on modifying the surface charges of the molecule (Yang et al. 1993), changing the values of the acid dissociation constants of the catalytic residues (Dey et al. 2018; Li et al. 2019), and cavity filling (Nielsen et al. 2000). In particular, Shi et al. (2022) replaced amino acids near catalytic residues to modify the optimal pH of the  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. For this, it was taken into

account that in enzymes with acid–base catalysis, such as sucrose isomerases (Mu et al. 2014), the residues of the active center are required to be in a catalytically adequate protonation state. Thus, a possible explanation of the behavior observed in Fig. 4c is the fact that the substitutions made (K174Q and L202E) are far from the catalytic residues (Glu277, proton donor, and Asp223, nucleophile) without affecting their protonation state.

Figure 4c shows that only at pH higher than 8 or lower than 5 considerable activity losses occur. This behavior, together with the observed improvement in thermostability, gives the PalI NX-5 mutants great flexibility in industrial applications. Be it the case in the context of a sugar mill, where operating fluctuations demand flexible biocatalysts, or in mitigating the risk of microbial contamination by adjusting the operating pH of an enzymatic reactor.

#### Evaluation of the kinetic parameters of the recombinant sucrose isomerase PalI NX-5 variants

The kinetic parameters of the recombinant PalI NX-5 sucrose isomerase variants were measured at 30 °C. As shown in Table 2, compared to native PalI NX-5, the  $K_m$  values of K174Q, L202E, and K174Q/L202E mutants decreased by 5.2%, 7.9%, and 9.4%, respectively. This implies that, concerning the native variant, the mutants present an increase in the affinity for

the substrate. The PalI NX-5 variants analyzed in this investigation showed  $K_m$  values in the same order of magnitude as their counterparts: wild-type (Ren et al. 2011) and recombinant (Li et al. 2011). Furthermore, regarding the report by Ren et al. (2011), the native variant and the mutants K174Q, L202E, and K174Q/L202E increased their specific activity by 14.4%, 25.3%, 20.3%, and 20.4%, respectively. Finally, the mutants showed improved catalytic constants ( $k_{cat}$ ) and catalytic efficiencies ( $k_{cat}/K_m$ ). Remarkably, the catalytic efficiency of the mutants increased by up to 16%.

The catalytic performance of the mutants was improved. Ren et al. (2020), Duan et al. (2016), Pang et al. (2020), Teng et al. (2019), and Ban et al. (2020) have shown that enzyme activity can be increased when thermostability is improved. Taking this into account, works such as that of Liu et al. (2021) have focused their attention on increasing enzyme activity using optimization strategies for thermal stability. In particular, Duan et al. (2016) justified the increase in activity of the sucrose isomerase PalI AS9 by stating that the substitutions made (E175N and K576D) were far from the catalytic center and the isomerization region. Thus, the mutations could have caused these regions to be more compact, producing a positive effect on the kinetic parameters. The hypothesis that would be applicable in this research since both the substitutions made in the PalI NX-5 (K174Q and

**Table 2** Evaluation of the kinetic parameters of sucrose isomerase PalI NX-5 variants

Variant	Specific activity (U/mg)	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1}mM^{-1}$ )	References
native PalI NX-5	483.8 ± 6.9	255.1 ± 9.6	564.5 ± 1.0	2.21 ± 0.13	This investigation
PalI NX-5 K174Q	529.9 ± 8.4	241.9 ± 6.8	618.2 ± 0.9	2.55 ± 0.15	
PalI NX-5 L202E	509.1 ± 9.9	234.9 ± 5.1	594.0 ± 0.8	2.52 ± 0.08	
PalI NX-5 K174Q/L202E	509.3 ± 8.7	231.2 ± 7.8	594.3 ± 1.1	2.57 ± 0.21	
wild-type PalI NX-5	423	222	NR	NR	Ren et al. (2011)
Recombinant PalI NX-5	NR	257	NR	NR	Li et al. (2011)
Recombinant CBS 574.77	NR	32.4	42,152.4*	1301	Lee et al. (2008)
Recombinant UQ68J	562	40	71.6*	1.79	Wu et al. (2005)
Recombinant UQ14S	351	76	47.0*	0.62	Wu et al. (2005)
Recombinant LX3	328	54.6	14.7*	0.27	Zhang et al. (2002)
Recombinant AS9	957.5	30.1	992.8	33	Duan et al. (2016)
Recombinant Ejp617	118.87	69.28	NR	NR	Zhang et al. (2021)

\*Calculated based on the data provided by the manuscripts and the  $k_{cat}/K_m$  ratio

NR not reported

L202E), and the potential sites for N-glycosylation (530NNS532 and 573NNS575) are located on the periphery of the molecule, away from the active site. As can be observed in Table 2 the designed mutants present an optimized catalysis with respect to both the native PalI NX-5 variant and the wild-type expressed in *E. rhapsontici* NX-5. These results demonstrate that the outlined comprehensive approach can improve thermostability without sacrificing catalytic activity.

As seen in Table 3, the isoforms of sucrose isomerases share considerably high sequence homologies and evolutionary proximities. For example, the variants of the sucrose isomerase PalI NX-5, analyzed in this investigation, share between 99.83 and 99.67% identity in their amino acid sequences. Likewise, the PalI NX-5 isoform shares a percentage identity of 71.33, 81.30 and 84.56% with the isoforms of *Pantoea dispersa* UQ68J (Wu et al. 2005), *Serratia plymuthica* AS9 (Huntmann et al. 2011) and *Pro-taminobacter rubrum* CBS 574.77 (Lee et al. 2008) respectively. Despite the high homologies shown in Table 3 and the highly conserved nature of the catalytically important regions in the structure of the molecule (Zhang et al. 2003; Wu et al. 2005; Duan et al. 2016; Jung et al. 2017), there are significant differences between the kinetic parameters exhibited by the isoforms of sucrose isomerases (Table 2). In this way, the number of residues that vary between sucrose isomerases has a significant influence on their kinetic behavior, as confirmed by this research. The simple substitution of a residue can alter the kinetic parameters of the biocatalyst. This variation can be more or less significant depending on the number of substitute residues, the nature of the substitute residues and the position occupied by these residues. For example, even when the PalI NX-5 K174Q/L202E isoform shares an identity of 84.20% (92% coverage) with the recombinant isoform CBS 574.77 (Lee et al. 2008), the catalytic efficiency of the latter is 506 times higher. Even more extreme is the comparison between the recombinant isoforms AS9 (Duan et al. 2016) and CBS 574.77 (Lee et al. 2008), even when they share an identity of 99.82% (Coverage 93%), the catalytic efficiency of the latter is 40 times higher.

The kinetic differences between sucrose isomerases make some isoforms more suitable for industrial applications. Thus, beyond the increase observed in the optimal temperature and half-life of the K174Q, L202E and K174Q/L202E mutants; the kinetic

**Table 3** Analysis of amino acid sequence identity and evolutionary distance between isoforms of sucrose isomerases

#	Variant/Isoform	GenBank	Pairwise distance (below*)/Protein identity (above*) <sup>b</sup>											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	Sucrose isomerase PalI NX-5	ADI56407.2	*	99.83	99.83	99.67	99.67	84.56	84.56	71.33	74.16	73.68	81.30	74.92
2	Sucrose isomerase PalI NX-5 K174Q	-	0.0017	*	99.67	99.83	99.83	84.38	84.38	71.17	73.98	73.51	81.14	74.75
3	Sucrose isomerase PalI NX-5 L202E	-	0.0017	0.0033	*	99.83	99.83	84.38	84.38	71.17	73.98	73.51	81.14	74.75
4	Sucrose isomerase PalI NX-5 K174Q/L202E	-	0.0033	0.0033	0.0017	*	84.20	84.20	71.00	73.79	73.33	80.97	74.58	
5	Sucrose isomerase CBS 574.77	3GBE_A	0.1695	0.1716	0.1716	0.1738	*	74.64	74.64	76.21	76.90	99.82	76.62	
6	Sucrose isomerase UQ68J	AAP57083.1	0.3415	0.3439	0.3439	0.3462	0.2943	*	71.75	71.89	71.09	70.88		
7	Sucrose isomerase UQ14S	AAP57085.1	0.2989	0.3014	0.3014	0.3039	0.2741	0.3320	*	99.26	76.02	73.05		
8	Sucrose isomerase LX3	IM53_A	0.3126	0.3150	0.3150	0.3174	0.2687	0.3425	0.0075	*	75.22	73.26		
9	Sucrose isomerase AS9	AEF45387.1	0.2087	0.2107	0.2107	0.2128	0.0018	0.3439	0.2766	0.2935	*	72.29		
10	Sucrose isomerase Ejp617	ADP12651.1	0.2949	0.2972	0.2972	0.2994	0.2681	0.3486	0.3192	0.3319	0.3245	*		

<sup>a</sup>Pairwise distances were made using the software MEGA11 (Tamura et al. 2021)

<sup>b</sup>Pairwise comparisons of aminoacidic sequences were made using Blast@ (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

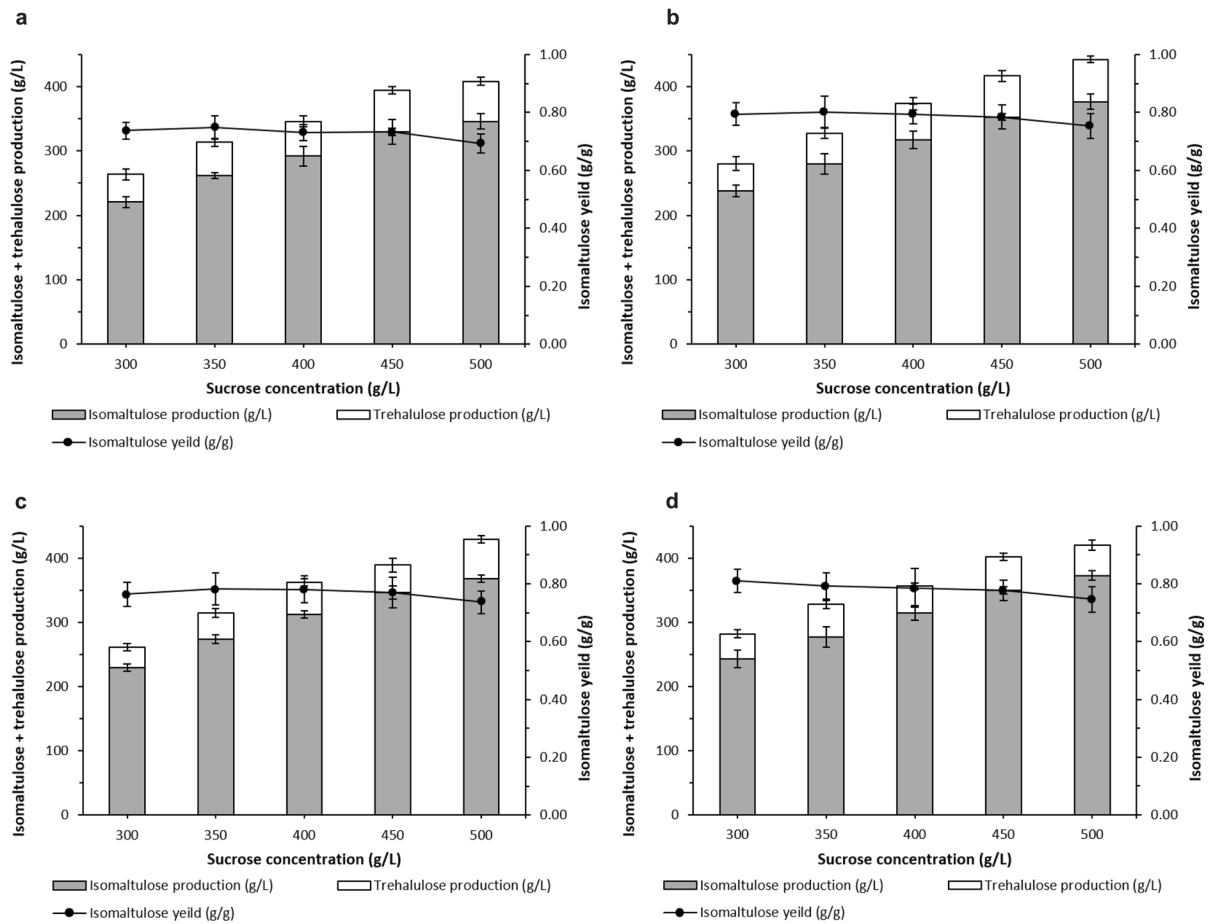
parameters of these variants were also improved. Which, together, makes these mutants more attractive for the development of industrial applications compared to their native, wild-type (Ren et al. 2011) and recombinant (Li et al. 2011) counterparts. However, from the kinetic point of view, the PalI NX-5 variants are inferior to the recombinant isoforms AS9 (Duan et al. 2016) and CBS 574.77 (Lee et al. 2008) (Table 2). For example, the  $K_m$  values of the recombinant isoforms AS9 (Duan et al. 2016) and CBS 574.77 (Lee et al. 2008) are approximately sevenfold lower than the  $K_m$  value of the K174Q/L202E mutant.  $K_m$  compares the substrate–enzyme binding and dissociation rates. Therefore, smaller values of  $K_m$  suggest a higher enzyme–substrate affinity (Bommarius et al. 2013). The catalytic efficiencies of the recombinant isoforms AS9 (Duan et al. 2016) and CBS 574.77 (Lee et al. 2008) are between 13 and 500 times higher than that shown by the K174Q/L202E mutant. Higher catalytic efficiencies suggest that the enzyme is more efficient in converting substrate to product (Chapman et al. 2018). On the other hand, the  $K_m$  values of the recombinant isoforms UQ68J (Wu et al. 2005), LX3 (Zhang et al. 2002) and UQ14S (Wu et al. 2005) are between 3 and 6 times lower than that shown by the K174Q/L202E mutant. However, the catalytic efficiencies of these isoforms are between 1.4 and 9.5 times lower than that shown by the K174Q/L202E mutant. Likewise, the mutants designed in this investigation showed higher specific activities than the recombinant isoforms UQ68J (Wu et al. 2005), LX3 (Zhang et al. 2002) and UQ14S (Wu et al. 2005). Thus, from the kinetic point of view, the designed mutants are more suitable options for industrial applications than the UQ68J (Wu et al. 2005), LX3 (Zhang et al. 2002) and UQ14S (Wu et al. 2005) isoforms.

The characteristics of the K174Q, L202E, and K174Q/L202E mutants, together with an adequate immobilization and reaction strategy, would allow the reuse of the biocatalyst and, therefore, the reduction of the costs associated with the operation (Choi et al. 2015; Cicerone et al. 2015; Kazlauskas 2018), thus influencing the stigma of costs when working with enzymes (Wu et al. 2020). In addition, an increase in the operating temperature would lead to a decrease in the viscosity of the reaction mixture, higher solubility of sucrose, and an increase in the mass transfer rate without drastically affecting the activity of sucrose

isomerase during the production of isomaltulose. Another positive consequence would be reducing the risk of microbial contamination (Singh et al. 2015; Turner et al. 2007), elements that will make the operation of an enzyme reactor more effective and efficient.

#### Comparison of isomaltulose production between the native enzyme and its variants

Sucrose concentrations of 300 to 500 g·l<sup>-1</sup> were used to investigate its effect on isomerase activity and isomaltulose production yields using the PalI NX-5 variants. The reaction conditions were established based on the optimum temperatures and pH shown by the mutants (35 °C and pH 6). For all sucrose concentrations tested, isomaltulose yields were maintained at  $0.73 \pm 0.04 \text{ g}_{\text{isomaltulose}} \text{ g}_{\text{sucrose}}^{-1}$  (native PalI NX-5),  $0.78 \pm 0.04 \text{ g}_{\text{isomaltulose}} \text{ g}_{\text{sucrose}}^{-1}$  (PalI NX-5 K174Q),  $0.77 \pm 0.05 \text{ g}_{\text{isomaltulose}} \text{ g}_{\text{sucrose}}^{-1}$  (PalI NX-5 L202E) and  $0.78 \pm 0.05 \text{ g}_{\text{isomaltulose}} \text{ g}_{\text{sucrose}}^{-1}$  (PalI NX-5 K174Q/L202E). Thus, the K174Q, L202E and K174Q/L202E mutants produced 7.5%, 5.4% and 7.1% more isomaltulose than the native variant, respectively (Fig. 5). These results confirm that the K174Q, L202E and K174Q/L202E mutants are better options for industrial applications than the native variant of PalI NX-5. One-way ANOVA analysis showed that sucrose concentration did not have a statistically significant influence on isomaltulose yield (Data not shown). However, in each of the variants of PalI NX-5, a reduction in yield was observed as a trend when the sucrose concentration was 500 g·l<sup>-1</sup>. Regarding this effect, Li et al. (2017), Zhang et al. (2021) and Zhang et al. (2019) stated that a higher substrate concentration could result in a lower product yield due to the higher viscosity of the reaction mixture, which would affect the mass transfer and catalytic efficiency of the enzyme. The yields obtained were comparable to the 80.5 and 78.4% yield reported by Zhang et al. (2021) for the recombinant isoform of *Erwinia sp.* Ejp617, after 180 min of reaction using the free enzyme. Likewise, similar yields (78.4 – 76.3%) were obtained by Duan et al. (2016) for the recombinant isoform of *Serratia plymuthica* AS9, after 480 min of reaction using the free enzyme. The yield of up to 75% obtained by Kawaguti et al. (2010) from the use of immobilized cells of *Erwinia sp.* D12 is also comparable. In particular, Li et al. (2011)



**Fig. 5** Comparison of isomaltulose production by the native enzyme and its variants versus sucrose concentration. **a** Effects of sucrose concentration on isomaltulose production by the sucrose isomerase PalI NX-5 native. **b** Effects of sucrose concentration on isomaltulose production by the sucrose isomer-

ase PalI NX-5 K174Q. **c** Effects of sucrose concentration on isomaltulose production by the sucrose isomerase PalI NX-5 L202E. **d** Effects of sucrose concentration on isomaltulose production by the sucrose isomerase PalI NX-5 K174Q/L202E

evaluated the isomaltulose yields of the wild-type and recombinant PalI NX-5 isoform using immobilized *E. rhapsodica* NX-5 and *E. coli* BL21(DE3) cells, respectively. Under this experimental strategy, the yield obtained by Li et al. (2011) is 87%, which is 11% higher than the highest yield obtained in this research. For their part, Zhan et al. (2020) optimized the biotransformation of sucrose to isomaltulose using the PalI NX-5 isoform anchored to *Bacillus subtilis* 168 spores. Thus, Zhan et al. (2020) reported a 92% yield in the production of isomaltulose, the maximum value that has been reported so far for the PalI NX-5 isoform. In the context of the use of immobilized sucrose isomerases, either anchored to the

cell surface or entrapped in alginate, Li et al. (2017) and Zhang et al. (2019) report isomaltulose yields for the *Pantoea dispersa* isoform UQ68J of 0.93 and 0.96  $\text{g}_{\text{isomaltulose}} \text{g}^{-1}_{\text{sucrose}}$ , respectively. Precisely, these values correspond to the maximum that have been reported so far for any isoform of sucrose isomerase.

Regarding the proportion of trehalulose in the final mixture of the reactions, it was observed that on average these were 13%. This value is comparable to the 15% trehalulose reported by Li et al. (2011) after the enzymatic action of the PalI NX-5 isoform. In general, the proportion of sugars in the final reaction mixture varies depending on the enzyme isoform and the reaction conditions (Mu et al. 2014). Therefore



the proportion of isomaltulose can vary between 63 and 90% (Cho et al. 2007; Tsuyuki et al. 1992), while that of trehalulose usually varies between 4 and 30% (Wu et al., 2004; Tsuyuki et al. 1992), although the sucrose isomerases from *Agrobacterium radiobacter* MX-232 (Nagai-Miyata et al. 1993) and *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 (Miyata et al. 1992) produce up to 88% trehalulose.

## Conclusion

In this study, a comprehensive strategy that combines different thermostabilizing elements was designed. Residues mutated in the sucrose isomerase PalI NX-5 were identified based on B factor analysis, hydrogen bond prediction, and molecular docking. In addition, the possible presence of post-translational modifications that influence the thermostability of the target protein was evaluated in silico. Based on this, sucrose isomerase from *Erwinia rhapsontici* NX-5 was expressed in *Pichia pastoris* X33. This research constitutes the first report on expression and characterization of glycosylated sucrose isomerases. The designed mutants K174Q, L202E, and K174Q/L202E, showed an increase in their optimal temperature of 5 °C, while their half-lives increased 2.21, 1.73 and 2.89 times, respectively. The catalytic efficiency of the mutants increased by up to 16%. From the point of view of thermostability, engineered mutants are more suitable options for industrial applications than their counterparts: native (this research), wild-type (from *Erwinia rhapsontici* NX-5), and recombinant (from *Escherichia coli* BL21(DE3)). The integrative strategy followed was successful and its execution did not compromise the catalytic activity of the molecule. In addition, given the holistic nature of this strategy, it could be used in the thermostabilization of other enzymes, with a positive impact in various industries and processes, such as: bakeries, beverage production, detergents, food, pharmaceuticals, and textiles.

**Supplementary Information** **Supplementary Table 1** Amino acid residues with B factors between 2.5 and 3.5 times the average value for sucrose isomerase PalI NX5 (Crystal structure: 4hox.1) and their substitutions recommended by ROSETTA DESING.

**Supplementary Figure 1** Genetic constructions pSINX5n, pSINX5-L202E, pSINX5-K174Q and pSINX5-L202E-K174Q.

**Acknowledgements** AJSP thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the Ph.D. studies grant.

## References

- Adney WS, Jeoh T, Beckham GT, Chou Y-C, Baker JO, Michener W, Himmel ME (2009) Probing the role of N-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis. *Cellulose* 16(4):699–709
- Aroonanal A, Nihira T, Seki T, Panbangred WJE, Technology M (2007) Role of several key residues in the catalytic activity of sucrose isomerase from *Klebsiella pneumoniae* NK33–98–8. *Enzyme Microb Technol* 40(5):1221–1227
- Ban X, Wu J, Kaustubh B, Lahiri P, Dhoble AS, Gu Z, Tong Y (2020) Additional salt bridges improve the thermostability of 1, 4- $\alpha$ -glucan branching enzyme. *Food Chem* 316:126348
- Barrero JJ, Casler JC, Valero F, Ferrer P, Glick BS (2018) An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* 17(1):1–13
- Bashirova A, Pramanik S, Volkov P, Rozhkova A, Nemashkova V, Zorov I, Davari MD (2019) Disulfide bond engineering of an endoglucanase from *Penicillium veruculosum* to improve its thermostability. *Int J Mol Sci* 20(7):1602
- Benoit I, Asther M, Sulzenbacher G, Record E, Marmuse L, Parsiegla G, Bignon C (2006) Respective importance of protein folding and glycosylation in the thermal stability of recombinant feruloyl esterase A. *FEBS Lett* 580(25):5815–5821
- Bi J, Chen S, Zhao X, Nie Y, Xu YJ (2020) Computation-aided engineering of starch-debranching pullulanase from *Bacillus thermoleovorans* for enhanced thermostability. *Appl Microbiol Biotechnol* 104(17):7551–7562
- Bian F, Yue S, Peng Z, Zhang X, Chen G, Yu J, Bi YJPO (2015) A comprehensive alanine-scanning mutagenesis study reveals roles for salt bridges in the structure and activity of *pseudomonas aeruginosa* elastase. *PLoS ONE* 10(3):e0121108
- Bommarius AS, Paye MF (2013) Stabilizing biocatalysts. *Chem Soc Rev* 42(15):6534–6565
- BöRnke F, Hajirezaei M, Sonnewald UJJO, B. (2001) Cloning and characterization of the gene cluster for palatinose metabolism from the phytopathogenic bacterium *Erwinia rhapsontici*. *J Bacteriol* 183(8):2425–2430
- Cha J, Jung J, Park S, Cho M, Seo D, Ha S, Park CJ (2009) Molecular cloning and functional characterization of a sucrose isomerase (isomaltulose synthase) gene from *Enterobacter* sp. FMB-1. *J Appl Microbiol* 107(4):1119–1130

- Chakravorty D, Khan MF, Patra SJE (2017) Multifactorial level of extremostability of proteins: can they be exploited for protein engineering? *Extremophiles* 21(3):419–444
- Chapman J, Ismail AE, Dinu CZ (2018) Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts* 8(6): 238. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4344/8/6/238>
- Chicco A, D'alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC, Lombardo YB (2003) Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J Nutr* 133(1):127–133
- Cho M-H, Park S-E, Lim JK, Kim J-S, Kim JH, Kwon DY, Park C-S (2007) Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food. *Biotech Lett* 29:453–458
- Choi J-M, Han S-S, Kim H-SJB (2015) Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. *Biotechnol Adv* 33(7):1443–1454
- Cicerone M, Giri J, Shaked ZE, Roberts CJ (2015) Protein stability—an underappreciated but critical need for drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 93:1
- Colley KJ, Varki A, Kinoshita T (2015) Cellular organization of glycosylation, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Cregg JM, Russell KA (1998) Transformation. *Pichia protocols*. Springer, Berlin, pp 27–39
- De Castro E, Sigrist CJ, Gattiker A, Bulliard V, Langendijk-Genevaux PS, Gasteiger E, Hulo N (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* 34(2):W362–W365
- De Groot E, Schweitzer L, Theis S (2020) Efficacy of isomaltulose compared to sucrose in modulating endothelial function in overweight adults. *Nutrients* 12(1):141
- Dey P, Roy A (2018) Molecular structure and catalytic mechanism of fungal family G acidophilic xylanases. *3 Biotech* 8(2):1–13
- Dotsenko AS, Gusakov AV, Volkov PV, Rozhkova AM, Sinitsyn AP (2016) N-linked glycosylation of recombinant cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Penicillium verruculosum* and its effect on the enzyme activity. *Biotechnol Bioeng* 113(2):283–291
- Dotsenko AS, Rozhkova AM, Zorov IN, Sinitsyn APJB, T. (2020) Protein surface engineering of endoglucanase *Penicillium verruculosum* for improvement in thermostability and stability in the presence of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid. *Bioresour Technol* 296:122370
- Duan X, Cheng S, Ai Y, Wu JJPO (2016) Enhancing the thermostability of *Serratia plymuthica* sucrose isomerase using B-factor-directed mutagenesis. *PLoS ONE* 11(2):e0149208
- Eijsink VG, Gåseidnes S, Borchert TV, Van Den Burg B (2005) Directed evolution of enzyme stability. *Biomol Eng* 22(1–3):21–30
- Fágáin CÓ (1995) Understanding and increasing protein stability. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol* 1252(1):1–14
- Gong X-M, Qin Z, Li F-L, Zeng B-B, Zheng G-W, Xu J-HJ (2018) Development of an engineered ketoreductase with simultaneously improved thermostability and activity for making a bulky atorvastatin precursor. *ACS Catal* 9(1):147–153
- Han M, Wang W, Jiang G, Wang X, Liu X, Cao H, Yu X (2014a) Enhanced expression of recombinant elastase in *Pichia pastoris* through addition of N-glycosylation sites to the propeptide. *Biotech Lett* 36(12):2467–2471
- Han M, Wang X, Ding H, Jin M, Yu L, Wang J, Yu X (2014b) The role of N-glycosylation sites in the activity, stability, and expression of the recombinant elastase expressed by *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* 54:32–37
- Han N, Ma Y, Mu Y, Tang X, Li J, Huang ZJE, Technology M (2019) Enhancing thermal tolerance of a fungal GH11 xylanase guided by B-factor analysis and multiple sequence alignment. *Enzyme Microbial Technol* 131:109422
- Han C, Wang Q, Sun Y, Yang R, Liu M, Wang S, Li DJBF (2020) Improvement of the catalytic activity and thermostability of a hyperthermostable endoglucanase by optimizing N-glycosylation sites. *Biotechnol Biofuels* 13(1):1–11
- He J, Tang F, Chen D, Yu B, Luo Y, Zheng P, Yu FJPO (2019) Design, expression and functional characterization of a thermostable xylanase from *Trichoderma reesei*. *PLoS ONE* 14(1):e0210548
- Helenius A, Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73(1):1019–1049
- Hoisington D, Khairallah M, Gonzalez-De-Leon D (1998) CIMMYT applied molecular genetics laboratory. In: MexicoDF: CIMMYT
- Hu X, Yuan X, He N, Zhuang TZ, Wu P, Zhang G (2019) Expression of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase in *Pichia pastoris* without antibiotics-resistant gene and effects of glycosylation on the enzymic thermostability. *Biotech* 9(11):1–9
- Hua L, Gao X, Yang X, Wan D, He C, Cao J, Song H (2014) Highly efficient production of peptides: N-glycosidase F for N-glycomics analysis. *Protein Expr Purif* 97:17–22
- Huang HL, Su YJ (1998) Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. *J Ind Microbiol Biotechnol* 21(1–2):22–27
- Huntemann M, Lu M, Nolan M, Lapidus A, Lucas S, Hammon N, Han C (2011) Complete genome sequence of the thermophilic sulfur-reducer *Hipaea maritima* type strain (MH2T). *Standards Genom Sci* 4(3):303–311
- Jiang T, Chen L, Jia S, Chen L, Ma YJDS (2008) High-level expression and production of human lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Dairy Sci Technol* 88(2):173–181
- Jung J-H, Kim M-J, Jeong W-S, Seo D-H, Ha S-J, Kim YW, Park C-S (2017) Characterization of divergent pseudo-sucrose isomerase from *Azotobacter vinelandii*: deciphering the absence of sucrose isomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 483(1):115–121
- Katla S, Yoganand K, Hingane S, Kumar CR, Anand B, Sivaprakasam S (2019) Novel glycosylated human interferon alpha 2b expressed in glycoengineered *Pichia pastoris* and its biological activity: N-linked glycoengineering approach. *Enzyme Microb Technol* 128:49–58

- Kawaguti (2007) Palatinose production by free and Ca-alginate gel immobilized cells of *Erwinia* sp. *Biochem Eng J* 36(3):202–208
- Kawaguti HY, Harumi SH (2010) Effect of concentration and substrate flow rate on isomaltulose production from sucrose by *Erwinia* sp. cells immobilized in calcium-alginate using packed bed reactor. *Appl Biochem Biotechnol* 162:89–102
- Kawaguti HY, Celestino ÉM, Moraes AL, Yim DK, Yamamoto LK, Sato HH (2010) Characterization of a glucosyltransferase from *Erwinia* sp. D12 and the conversion of sucrose into isomaltulose by immobilized cells. *Biochem Eng J* 48(2):211–217
- Kazlauskas RJCSR (2018) Engineering more stable proteins. *Chem Soc Rev* 47(24):9026–9045
- Khan MF, Kundu D, Hazra C, Patra SJJ (2019) A strategic approach of enzyme engineering by attribute ranking and enzyme immobilization on zinc oxide nanoparticles to attain thermostability in mesophilic *Bacillus subtilis* lipase for detergent formulation. *Int J Biol Macromol* 136:66–82
- Laemmli UKJN (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685
- Lee HC, Kim JH, Kim SY, Lee JK (2008) Isomaltulose production by modification of the fructose-binding site on the basis of the predicted structure of sucrose isomerase from “*Protaminobacter rubrum*.” *Appl Environ Microbiol* 74(16):5183–5194
- Lee G-Y, Jung J-H, Seo D-H, Hansin J, Ha S-J, Cha J, Park C-S (2011) Isomaltulose production via yeast surface display of sucrose isomerase from *Enterobacter* sp FMB-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* 102(19):9179–9184
- Li S, Cai H, Qing Y, Ren B, Xu H, Zhu H (2011) Cloning and characterization of a sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5 for isomaltulose hyperproduction. *Appl Biochem Biotechnol* 163(1):52–63
- Li L, Wang H, Cheng H, Deng Z (2017) Isomaltulose production by yeast surface display of sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* on *Yarrowia lipolytica*. *J Funct Foods* 32:208–217
- Li Q, Jiang T, Liu R, Feng X, Li C (2019) Tuning the pH profile of  $\beta$ -glucuronidase by rational site-directed mutagenesis for efficient transformation of glycyrrhizin. *Appl Microbiol Biotechnol* 103(12):4813–4823
- Liu L, Yu S, Zhao W (2021) A novel sucrose isomerase producing isomaltulose from *Raoultella terrigena*. *Appl Sci* 11(12):5521
- Masakari Y, Hara C, Araki Y, Gomi K, Ito KJE, Technology M (2020) Improvement in the thermal stability of mucor Prainii-derived FAD-dependent glucose dehydrogenase via protein chimerization. *Enzyme Microbiol Technol* 132:109387
- Miyata Y, Sugitani T, Tsuyuki K-I, Ebashi T, Nakajima Y (1992) Isolation and characterization of *Pseudomonas mesoacidophila* producing trehalulose. *Biosci Biotechnol Biochem* 56(10):1680–1681
- Mu W, Li W, Wang X, Zhang T, Jiang B (2014) Current studies on sucrose isomerase and biological isomaltulose production using sucrose isomerase. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(15):6569–6582
- Nagai-Miyata Y, Tsuyuki K-I, Sugitani T, Ebashi T, Nakajima Y (1993) Isolation and characterization of a trehalulose-producing strain of *Agrobacterium*. *Biosci Biotechnol Biochem* 57(12):2049–2053
- Nielsen JE, Borchert TV (2000) Protein engineering of bacterial  $\alpha$ -amylases. *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol* 1543(2):253–274
- Pack SP, Yoo YJ (2004) Protein thermostability: structure-based difference of amino acid between thermophilic and mesophilic proteins. *J Biotechnol* 111(3):269–277
- Pagliassotti MJ, Kang J, Thresher JS, Sung CK, Bizeau ME (2002) Elevated basal PI 3-kinase activity and reduced insulin signaling in sucrose-induced hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(1):E170–E176
- Pang B, Zhou L, Cui W, Liu Z, Zhou Z (2020) Improvement of the thermostability and activity of pullulanase from *Anoxybacillus* sp. WB42. *Appl Biochem Biotechnol* 191(3):942–954
- Parthasarathy S, Murthy M (2000) Protein thermal stability: insights from atomic displacement parameters (B values). *Protein Eng* 13(1):9–13
- Pauling L (1960) The nature of the chemical bond, vol 260. Cornell University Press, Ithaca
- Petrescu A-J, Milac A-L, Petrescu SM, Dwek RA, Wormald MR (2004) Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology* 14(2):103–114
- Qiao Z, Xu M, Shao M, Zhao Y, Long M, Yang T, Rao ZJ (2020) Engineered disulfide bonds improve thermostability and activity of L-isoleucine hydroxylase for efficient 4-HIL production in *Bacillus subtilis*. *Eng Life Sci* 168:7–16
- Querol E, Perez-Pons JA, Mozo-Villarias AJPE (1996) Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *Protein Eng Des Select* 9(3):265–271
- Ravaud S, Robert X, Watzlawick H, Haser R, Mattes R, Aghajari NJFL (2009) Structural determinants of product specificity of sucrose isomerases. *FEBS Lett* 583(12):1964–1968
- Reetz MT, Carballeira JD, Vogel AJ (2006) Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew Chem* 118(46):7909–7915
- Ren B, Li S, Xu H, Feng X-H, Cai H, Ye QJB, Engineering B (2011) Purification and characterization of a highly selective sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5. *Bioprocess Biosyst Eng* 34(5):629–637
- Ren Y, Luo H, Huang H, Hakulinen N, Wang Y, Wang Y, Yao B (2020) Improving the catalytic performance of Proteinase K from *Paronygodontium album* for use in feather degradation. *Int J Biol Macromol* 154:1586–1595
- Rubio-Arreaez S, Ferrer C, Capella JV, Ortolá MD, Castelló ML (2017) Development of lemon marmalade formulated with new sweeteners (isomaltulose and tagatose): effect on antioxidant, rheological and optical properties. *J Food Process Eng* 40(2):e12371
- Salvucci MEJCB, Biochemistry PPB, Biology M (2003) Distinct sucrose isomerases catalyze trehalulose synthesis

- in whiteflies *Bemisia Argentifolii*, and *Erwinia Rhapontici*. *Comparat Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 135(2):385–395
- Shental-Bechor D, Levy Y (2008) Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proc Natl Acad Sci* 105(24):8256–8261
- Shi X, Wu D, Xu Y, Yu X (2022) Engineering the optimum pH of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* for efficient hydrolysis of lactose. *J Dairy Sci* 105(6):4772–4782
- Singh S, Bajaj BKJC (2015) Medium optimization for enhanced production of protease with industrially desirable attributes from *Bacillus subtilis* K-1. *Chem Eng Commun* 202(8):1051–1060
- Sokotowska E, Sadowska A, Sawicka D, Kotulska-Bąblińska I, Car H (2022) A head-to-head comparison review of biological and toxicological studies of isomaltulose, d-tagatose, and trehalose on glycemic control. *Crit Rev Food Sci Nutr* 62(21):5679–5704
- Stothard PJB (2000) The sequence manipulation suite: javascript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28(6):1102–1104
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38(7):3022–3027
- Teng C, Jiang Y, Xu Y, Li Q, Li X, Fan G, Ma RJJ, O. B. M. (2019) Improving the thermostability and catalytic efficiency of GH11 xylanase PjxA by adding disulfide bridges. *Int J Biol Macromol* 128:354–362
- Tompa DR, Gromiha MM, Saraboji KJJO (2016) Contribution of main chain and side chain atoms and their locations to the stability of thermophilic proteins. *J Mol Gr Model* 64:85–93
- Tsuyuki KI, Sugitani T, Miyata Y, Ebashi T, Nakajima Y (1992) Isolation and characterization of isomaltulose- and trehalulose-producing bacteria from Thailand soil. *J Gen Appl Microbiol* 38(5):483–490
- Turner P, Mamo G, Karlsson ENJM (2007) Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Fact* 6(1):9
- Véronèse T, Perlot P (1998) Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site. *FEBS Lett* 441(3):348–352
- Véronèse T, Perlot P (1999) Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. *Microbial Technol* 24(5–6):263–269
- Vicente AI, Viña-Gonzalez J, Mateljak I, Monza E, Lucas F, Guallar V, Alcalde MJ (2020) Enhancing thermostability by modifying flexible surface loops in an evolved high-redox potential laccase. *AIChE J* 66(3):e16747
- Wang R, Wang S, Xu Y, Yu XJJJ (2020) Enhancing the thermostability of *Rhizopus chinensis* lipase by rational design and MD simulations. *Int J Biol Macromol* 160:1189–1200
- Warren GL, Petsko GA (1995) Composition analysis of  $\alpha$ -helices in thermophilic organisms. *Protein Eng Des Sel* 8(9):905–913
- Wu L, Birch RGJA, Microbiology E (2005) Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. *Appl Environ Microbiol* 71(3):1581–1590
- Wu S, Snajdrova R, Moore JC, Baldenius K, Bornscheuer UTJ (2020) Biocatalysis: enzymatic synthesis for industrial applications
- Wylie-Rosett J, Segal-Isaacson C, Segal-Isaacson A (2004) Carbohydrates and increases in obesity: does the type of carbohydrate make a difference? *Obes Res* 12(S11):124S–129S
- Xu Z, Li S, Li J, Li Y, Feng X, Wang R, Zhou JJPO (2013) The structural basis of *erwinia rhapontici* isomaltulose synthase. *PLoS ONE* 8(9):e74788
- Xu Z, Xue Y-P, Zou S-P, Zheng Y-GJB (2020) Enzyme engineering strategies to confer thermostability. *Biofuels Biochem* 2:67–89
- Yang A-S, Honig B (1993) On the pH dependence of protein stability. *J Mol Biol* 231(2):459–474
- You S, Xie C, Ma R, Huang H-Q, Herman RA, Su X-Y, Wang JBBF (2019) Improvement in catalytic activity and thermostability of a GH10 xylanase and its synergistic degradation of biomass with cellulase. *Biotechnol Biofuels* 12(1):1–15
- Yuan Z, Zhao J, Wang Z-XJP (2003) Flexibility analysis of enzyme active sites by crystallographic temperature factors. *Protein Eng* 16(2):109–114
- Zhan Y, Zhu P, Liang J, Xu Z, Feng X, Liu Y, Li S (2020) Economical production of isomaltulose from agricultural residues in a system with sucrose isomerase displayed on *Bacillus subtilis* spores. *Bioprocess Biosyst Eng* 43(1):75–84
- Zhang D, Li X, Zhang L-H (2002) Isomaltulose synthase from *Klebsiella* sp. strain LX3: gene cloning and characterization and engineering of thermostability. *Appl Environ Microbiol* 68(6):2676–2682
- Zhang D, Li N, Lok S-M, Zhang L-H, Swaminathan K (2003) Isomaltulose synthase (PalI) of *Klebsiella* sp. LX3 crystal structure and implication of mechanism. *J Biol Chem* 278(37):35428–35434
- Zhang P, Wang Z-P, Sheng J, Zheng Y, Ji X-F, Zhou H-X, Chi Z-M (2018) High and efficient isomaltulose production using an engineered *Yarrowia lipolytica* strain. *Biores Technol* 265:577–580
- Zhang P, Wang Z-P, Liu S, Wang Y-L, Zhang Z-F, Liu X-M, Yuan X-L (2019) Overexpression of secreted sucrose isomerase in *Yarrowia lipolytica* and its application in isomaltulose production after immobilization. *Int J Biol Macromol* 121:97–103
- Zhang F, Cheng F, Jia D-X, Gu Y-H, Liu Z-Q, Zheng Y-G (2021) Characterization of a recombinant sucrose isomerase and its application to enzymatic production of isomaltulose. *Biotech Lett* 43:261–269
- Zheng F, Vermaas JV, Zheng J, Wang Y, Tu T, Wang X, Microbiology E (2019) Activity and thermostability of GH5 endoglucanase chimeras from mesophilic and thermophilic parents. *Appl Environ Microbiol* 85(5):e02079-e12018
- Zheng Y-Z, Zhou Y, Deng G, Guo R, Chen D-F, Spectroscopy B (2020) A combination of FTIR and DFT to study the microscopic structure and hydrogen-bonding interaction properties of the [BMIM][BF4] and water. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 226:117624
- Zou S, Huang S, Kaleem I, Li C (2013) N-Glycosylation enhances functional and structural stability of

---

recombinant  $\beta$ -glucuronidase expressed in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 164(1):75–81

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



Review

# Analyzing Current Trends and Possible Strategies to Improve Sucrose Isomerases' Thermostability

Amado Javier Sardiña-Peña <sup>1</sup>, Liber Mesa-Ramos <sup>2</sup>, Blanca Flor Iglesias-Figueroa <sup>1</sup>,  
Lourdes Ballinas-Casarrubias <sup>1</sup>, Tania Samanta Siqueiros-Cendón <sup>1</sup>, Edward Alexander Espinoza-Sánchez <sup>1</sup>,  
Norma Rosario Flores-Holguín <sup>3</sup>, Sigifredo Arévalo-Gallegos <sup>1</sup> and Quintín Rascón-Cruz <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito Universitarios s/n Nuevo Campus Universitario, Chihuahua 31125, Mexico; p324974@uach.mx (A.J.S.-P.); bfigueroa@uach.mx (B.F.I.-F.); mballinas@uach.mx (L.B.-C.); tsiqueiros@uach.mx (T.S.S.-C.); eaespinoza@uach.mx (E.A.E.-S.); sareval@uach.mx (S.A.-G.)
- <sup>2</sup> Laboratorio de Microbiología III, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito Universitarios s/n Nuevo Campus Universitario, Chihuahua 31125, Mexico; p324973@uach.mx
- <sup>3</sup> Laboratorio Virtual NANOCOSMOS, Departamento de Medio Ambiente y Energía, Centro de Investigación en Materiales Avanzados, Chihuahua 31136, Mexico; norma.flores@cimav.edu.mx
- \* Correspondence: qrascon@uach.mx

**Abstract:** Due to their ability to produce isomaltulose, sucrose isomerases are enzymes that have caught the attention of researchers and entrepreneurs since the 1950s. However, their low activity and stability at temperatures above 40 °C have been a bottleneck for their industrial application. Specifically, the instability of these enzymes has been a challenge when it comes to their use for the synthesis and manufacturing of chemicals on a practical scale. This is because industrial processes often require biocatalysts that can withstand harsh reaction conditions, like high temperatures. Since the 1980s, there have been significant advancements in the thermal stabilization engineering of enzymes. Based on the literature from the past few decades and the latest achievements in protein engineering, this article systematically describes the strategies used to enhance the thermal stability of sucrose isomerases. Additionally, from a theoretical perspective, we discuss other potential mechanisms that could be used for this purpose.

**Keywords:** sucrose isomerases; protein structure; GH13 family; protein engineering; thermostability; thermostabilization



**Citation:** Sardiña-Peña, A.J.; Mesa-Ramos, L.; Iglesias-Figueroa, B.F.; Ballinas-Casarrubias, L.; Siqueiros-Cendón, T.S.; Espinoza-Sánchez, E.A.; Flores-Holguín, N.R.; Arévalo-Gallegos, S.; Rascón-Cruz, Q. Analyzing Current Trends and Possible Strategies to Improve Sucrose Isomerases' Thermostability. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14513. <https://doi.org/10.3390/ijms241914513>

Academic Editors: Csaba Magyar and Istvan Simon

Received: 1 September 2023  
Revised: 10 September 2023  
Accepted: 10 September 2023  
Published: 25 September 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Enzymes are significant macromolecular biological catalysts, and much like conventional chemical catalysts, these biomolecules considerably accelerate chemical reactions by reducing their activation energy [1]. However, in contrast to chemical catalysts, enzymes offer appealing synthetic advantages, such as high selectivity, efficiency, sustainability [2–4], low catalyst loads [5], and the mild operating conditions required in some processes [1]. For these reasons, biocatalysis has emerged as a mature technology [6], transitioning from being of pure academic interest to a vital tool in the synthesis and manufacturing of chemicals [5,7,8].

Since the beginning of the 21st century, biocatalytic applications have seen an increase across many industrial sectors, ranging from fine and pharmaceutical chemistry to the manufacturing of chemical products and foods [9–17]. For instance, with a production of nearly 10 million tons of HFCS (High Fructose Corn Syrup) annually, immobilized glucose isomerase enzyme has been a commercial success [18]. Similarly, the enzymatic conversion of sucrose to isomaltulose using sucrose isomerases (EC 5.4.99.11) has emerged as a commercially attractive technology [19], currently reaching a production scale of more than 10,000 tons globally each year [20].

As isomaltulose (or Palatinose) stands as one of the potential candidates to replace sucrose as a food additive, its production has garnered significant attention worldwide [21,22]. Both sucrose and isomaltulose share similar physical and organoleptic properties; however, isomaltulose has about 50% of the relative sweetness of sucrose [23,24]. Compared to sucrose, isomaltulose is less labile under extreme pH conditions, demonstrating (in a 10% solution) stability for more than 30 min when incubated at pH 1.0 and 95 °C, while sucrose (in a 10% solution) nearly completely hydrolyzes under the same conditions [25]. In vivo studies indicate that isomaltulose is fully hydrolyzed and absorbed in the small intestine [26], meaning there are intestinal enzymes capable of fully hydrolyzing this carbohydrate. The hydrolysis rate, however, is much slower compared to sucrose and maltose [27–29]. Therefore, following the oral administration of isomaltulose, blood insulin, and glucose levels exhibit a slower rise and more prolonged and balanced residence times [27,30–32]. Moreover, isomaltulose intake is associated with enhanced fat oxidation compared to regular dietary carbohydrates. Thus, isomaltulose can increase the amount of fats utilized as an energy source, proving beneficial in preventing weight gain [26,32–34]. This suite of properties makes isomaltulose unique among the spectrum of alternative sweeteners currently marketed [25]. Nevertheless, isomaltulose occurs in extremely small amounts in nature, found only at about 1% in honey [35] and in sugarcane extracts [36]. Additionally, its synthesis through conventional chemistry is challenging [37]. Thus, sucrose isomerases (SIase), also known as isomaltulose synthase, sucrose  $\alpha$ -glucosyltransferase, or trehalulose synthase, are pivotal for isomaltulose production [38].

Several microorganisms have been recognized for their SIase-producing capabilities. Among the microbial enzymes producing isomaltulose that have been purified and characterized are the isoforms from: *Erwinia* sp. [39,40], *Serratia plymuthica* sp. [41], *Protaminobacter rubrum* sp. [42], *Pantoea dispersa* sp. [43], *Klebsiella* sp. [44], *Enterobacter* sp. [45], *Agrobacterium radiobacter* sp. [46], *Pseudomonas mesoacidophila* sp. [47], and *Raoultella terrigena* sp. [48]. The genes encoding SIase have been designated as *palI* [39,41,49,50], *pal-2* [48], *smuA* [42], *sim* [51], and *mutB* [52]. Specifically, the exponential development in genetic engineering has facilitated the recombinant expression of enzyme isoforms [39,42,49–53], with *Escherichia coli* being the most commonly employed host. Today, the availability of SIase expressed in food-grade strains is not a limitation in developing isomaltulose production processes. In fact, the low activity and stability of most SIase at temperatures above 40 °C is the bottleneck for their industrial application [54,55]. Precisely based on literature from recent decades and the latest advances in protein engineering, this article systematically outlines the strategies employed to increase the thermal stability of sucrose isomerases. Furthermore, from a theoretical standpoint, we discuss other mechanisms that might be employed for this purpose.

## 2. Sucrose Isomerases, Structure and Reaction Mechanism

The study of SIase began in the 1950s when the bacteria *Protaminobacter rubrum* CBS 574.77, which produces the SmuA isoform, was isolated and analyzed [42]. Today, in the Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>, accessed on 13 June 2023), 28 crystal structures of SIase have been reported and resolved through X-ray diffraction (Table 1). Of these structures, 20 correspond to variants of the isoform from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45 [56–58], 5 to variants of the isoform from *Erwinia rhapontici* NX-5 [59], 2 to variants of the isoform from *P. rubrum* CBS574.77 [60], and 1 to the isoform from *Klebsiella* sp. LX3 [61]. These crystallographic data have elucidated that SIase are single-subunit molecules (Figure 1), with a central catalytic domain comprised of a ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> barrel similar to triose phosphate isomerases [56]. Furthermore, the architecture of the active site of SIase places them within the glycoside hydrolase family, family 13 (GH13) [61].

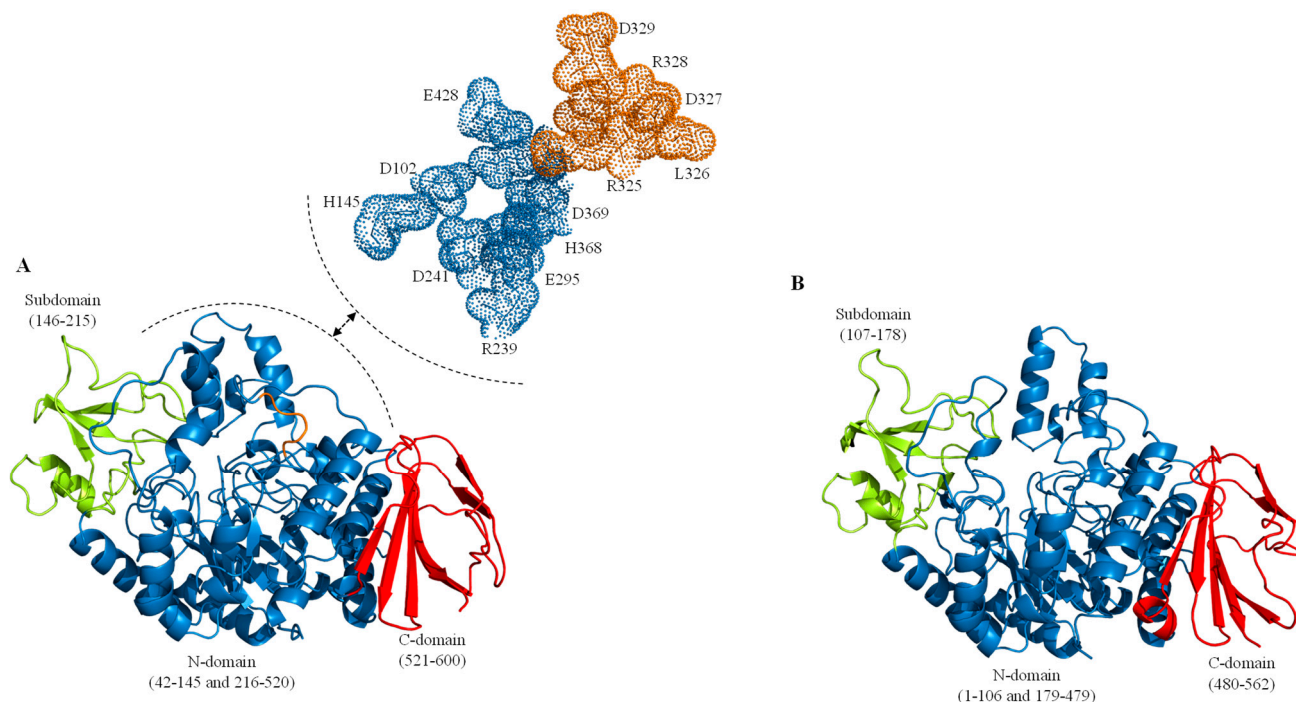
**Table 1.** Information on reported Slase crystal structures.

Microbial Source	Sucrose Isomerase	Mutation	PDB ID	Interacted Chemical	Resolution (Å)	References
<i>Pseudomonas mesoacidophila</i> MX-45 ( <i>Rhizobium</i> sp. MX-45)	MutB	Non-mutant	2PWH	native	2.0	[56]
		Non-mutant	1ZJA	MutB-Tris	1.6	
		Non-mutant	2PWD	MutB-deoxynojirimycin	1.8	
		Non-mutant	2PWG	MutB-castanospermine	2.2	
		D200A	2PWF	MutB-glucose	1.8	
		E254Q	2PWE	MutB-sucrose	2.0	
		Non-mutant	1ZJB	MutB-Tris	1.8	[57]
		A258V	4GO8	MutB-Tris	2.15	
		D415N	4GO9	MutB-Tris	2.2	
		D200A-D415N (inactive enzyme)	4HA1	MutB-isomaltulose-glucose-Ca <sup>2+</sup>	2.2	
		Non-mutant	4H8V	MutB-trehalulose-Ca <sup>2+</sup>	1.95	[58]
		D200A-D415N (inactive enzyme)	4H8U	MutB-trehalulose-glycerol-Ca <sup>2+</sup>	2.0	
		E254Q-D415N (inactive enzyme)	4H8H	MutB-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -glycerol-Ca <sup>2+</sup>	2.0	
		D200A-D415N (inactive enzyme)	4H7V	MutB-glycerol-glucose-Ca <sup>2+</sup>	1.8	
		R284C	4H2C	MutB-glycerol-Ca <sup>2+</sup>	1.7	
		R284C	4GIN	MutB-glycerol-Ca <sup>2+</sup>	1.9	
		F164L	4GIA	MutB-Tris-glycerol-Ca <sup>2+</sup>	2.01	
		F164L	4GI9	MutB-Tris-glycerol-Ca <sup>2+</sup>	2.15	
		F164L	4GI8	MutB-Tris-glycerol-Ca <sup>2+</sup>	1.95	
		F164L	4GI6	MutB-Tris-glycerol-glucose-Ca <sup>2+</sup>	2.15	
<i>Erwinia rhapontici</i> NX-5	NX-5	Non-mutant	4HOW	(NX-5)-glycerol-Ca <sup>2+</sup>	1.7	[59]
		Non-mutant	4HOX	(NX-5)-Tris-glycerol-Ca <sup>2+</sup>	2.0	
		D241A	4HOZ	(NX-5)-glucose-glycerol-Ca <sup>2+</sup>	2.0	
		E295A	4HP5	(NX-5)-glucose-glycerol-Ca <sup>2+</sup>	2.0	
		E295Q	4HPH	(NX-5)-sucrose-glycerol-Ca <sup>2+</sup>	1.7	
<i>Protaminobacter rubrum</i> CBS574.77	SmuA	Non-mutant	3GBD	SmuA-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup> -ethylene glycol	1.95	[60]
		Non-mutant	3GBE	SmuA-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup> -ethylene glycol-deoxynojirimycin	1.7	
<i>Klebsiella</i> sp. LX3	PalI	Non-mutant	1M53	No information	2.2	[61]

Established in the early 1990s, the GH13 family [62] represents the largest family of polysaccharide metabolizing enzymes [63,64], grouping enzymes with hydrolytic [65], transferase [66,67], and isomerase activities [68]. Specifically, differences in substrate specificity and/or enzymatic activities among the GH13 family members led to its subdivision into subfamilies. Today, according to the Carbohydrate-Active enZymes database (CAZy, <http://www.cazy.org/>, accessed on 13 June 2023), the GH13 family consists of 46 subfamilies [69]; however, this number continues to rise [70,71]. These subfamilies exhibit a clearer relationship between their sequences, enzymatic specificities, and phylogeny [72], which would facilitate predicting the catalytic function of enzymes with significant industrial potential from novel genes or microorganisms. Despite this apparent heterogeneity, GH13 enzymes are characterized by having three domains designated A, B, and C [61,73,74] (Figure 1). Specifically, for the NX-5 Slase, domain A (N-terminal catalytic) is located between residues 42–145 and 216–520 [59]. Likewise, the PalI isoform, the N-terminal

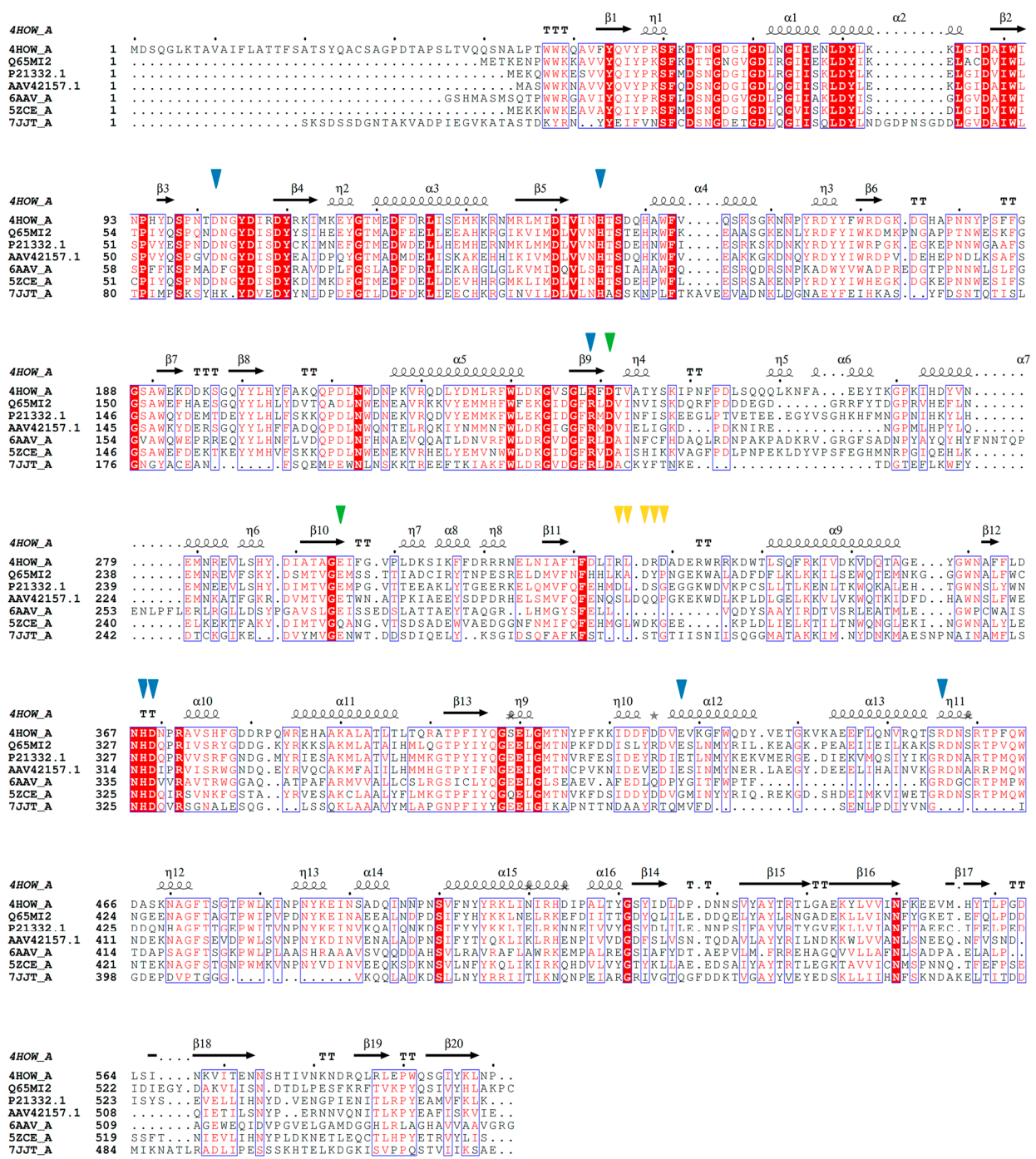


catalytic domain, is located between residues 3–146 and 216–521 [61]. The N-terminal domain is a supersecondary ( $\beta/\alpha$ ) structure of eight barrels, which is the main body of the Slase (the enzyme's catalytic center). The subdomain (domain B) between residues 146–215 (positions in the NX-5 and PalI isoforms) is a structure rich in short loops, with no known function in PalI or other GH13 family members. Lastly, the C-terminal domain located between residues 521–600 (position in the NX-5 isoform) consists of two antiparallel  $\beta$ -sheets; this domain interacts with the N-terminal domain through the formation of salt bridges and hydrogen bonds. Thus, domain C is associated with the structural stability of Slase [59,61].



**Figure 1.** General structure of the GH13 family. (A) structure of the sucrose isomerase PalI NX-5. (B) structure of the trehalose-6-phosphate hydrolase. In (A,B), the molecules are displayed in the same orientation; the N-terminal catalytic ( $\beta/\alpha$ )8 barrel is illustrated in blue, the subdomain in lime green, and the C-terminal domain in red. In (A), the isomerization region (residues 325–329) in PalI NX-5 is depicted in orange. The residues involved in the binding, hydrolysis, and isomerization of sucrose are shown enlarged.

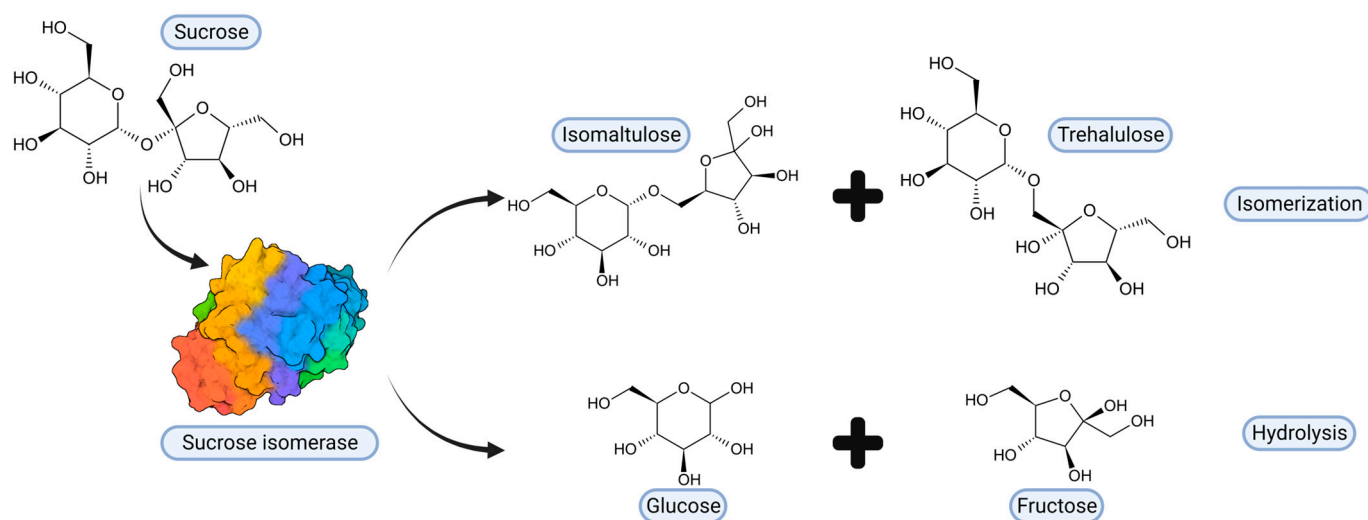
Among the GH13 enzymes, those most structurally similar to Slase include: the oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus cereus* ATCC7064 [75], the 1,6- $\alpha$ -glucosidase from *Lactobacillus acidophilus* NCFM [76], the trehalose-6-phosphate hydrolase from *Bacillus licheniformis* [77], the  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme XgtA from *Xanthomonas campestris* WU-9701 [78], the  $\alpha$ -glucosidase BspAG13\_31A from *Bacillus* sp. AHU2216 [79], and even the  $\alpha$ -amylase from *Ruminococcus bromii* [80] (Figures 1 and 2). This structural similarity suggests a similar substrate binding and catalysis mechanism among GH13 enzymes. Specifically, GH13 enzymes share the same double displacement catalytic mechanism, proceeding via the accumulation and subsequent decomposition of a glycosyl-enzyme intermediate [81]. Additionally, the catalytic machinery of the GH13 family comprises a triad of residues: a catalytic nucleophile (aspartic acid), a proton donor (glutamic acid), and a transition state stabilizer (aspartic acid) [82].



**Figure 2.** Multiple sequence alignment of the sucrose isomerase PaII NX-5 (Swiss-Prot: 4HOW\_A) and other enzymes from the GH13 family. Amino acid sequences of the trehalose-6-phosphate hydrolase from *Bacillus licheniformis* (Swiss-Prot: Q65MI2), the oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus cereus* ATCC7064 (Swiss-Prot: P21332.1), the 1,6- $\alpha$ -glucosidase from *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Swiss-Prot: AAV42157.1), the  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme XgtA from *Xanthomonas campestris* WU-9701 (Swiss-Prot: 6AAV\_A), the  $\alpha$ -glucosidase BspAG13\_31A from *Bacillus* sp. AHU2216 (Swiss-Prot: 5ZCE\_A), and the  $\alpha$ -amylase from *Ruminococcus bromii* (Swiss-Prot: 7JTT\_A) are displayed. The residues from PaII NX-5 involved in sucrose binding are indicated with a blue triangle, residues crucial for sucrose hydrolysis are highlighted with a green triangle, while residues involved in isomerization and specificity towards isomaltulose formation are denoted with an orange triangle. Sequence alignments were generated using the software MEGA 11 Version 11.0.13 [83] and ESPript [84]. Secondary structures are designated according to the crystal structure

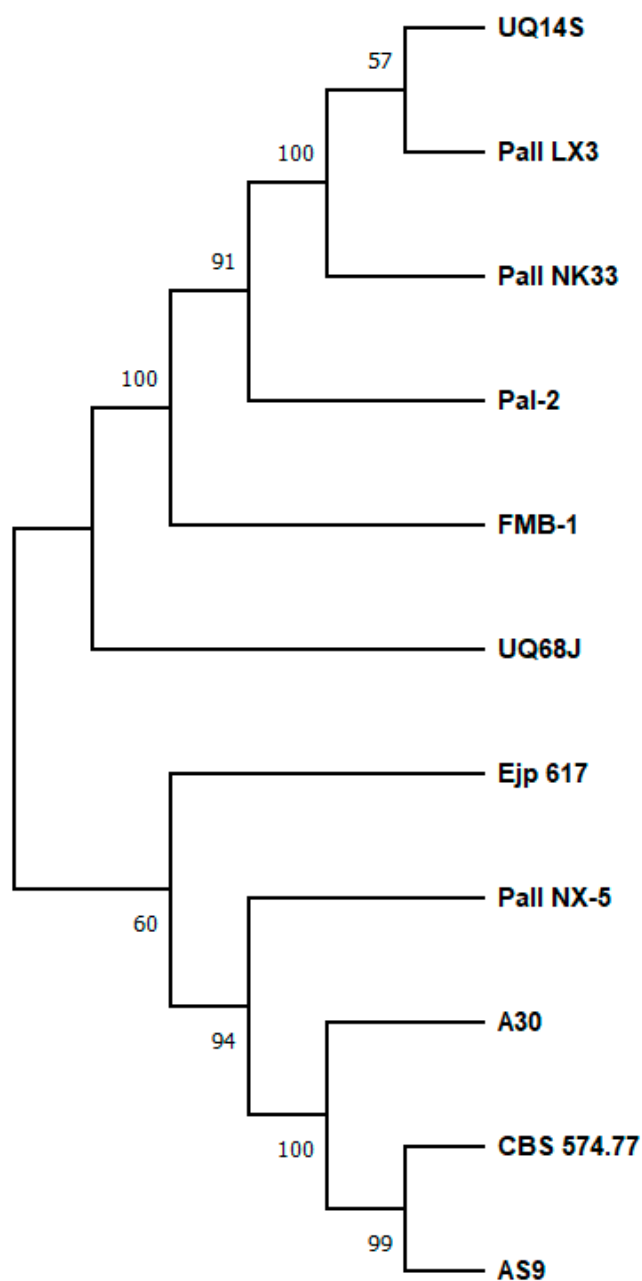
of PalI NX-5 and are presented on top: helices with squiggles, beta strands with arrows, turns with TTT letters. Residues depicted or highlighted in red within the blue blocks represent conserved residues.

Among Slase, five highly conserved residues present in the catalytic N-terminal domain stand out. Zhang et al. [61] point to Asp241, Glu295, and Asp369 (position in the PalI isoform) as the potential catalytic triad, while His145 and His368 are highly conserved in  $\alpha$ -amylases and glycosyltransferases [85]. In PalI Slase, Glu295 acts as a general acid by protonating the oxygen of the glycosidic bond and producing substrate hydrolysis; then, the O $\delta$ 2 of Asp241 acts as a nucleophile and attacks the C1 of D-glycosyl, forming the  $\beta$ -glycosyl-enzyme intermediate, while Asp369 forms hydrogen bonds with O2 and O3. His145 forms a hydrogen bond with O6 and His368 with O2. Isomaltulose is produced when the O6 of D-fructose (hydrolysis product) nucleophilically binds to the C1 of the D-glycosyl group [61]. Unlike the GH13 enzyme family, among Slase, the RLDRD motif (RYDRA, in the MutB isoform) is highly conserved. The sequence 325RLDRD329 (position in the PalI isoform) is adjacent to the active site cleft. Through directed mutagenesis analysis of this sequence, its indispensable and determinant role in enzymatic kinetics and specificity towards isomaltulose formation has been confirmed [61,86]. Based on modeling studies, it is suggested that the RLDRD sequence, especially the two arginines, is involved in binding to fructose [86]. In this way, Slase possesses both isomerase and hydrolase activities, although the amounts of D-glucose and D-fructose are minimal [43]. Thus, isomaltulose and trehalulose are the primary products of the enzyme's catalytic action [29] (Figure 3).



**Figure 3.** Hydrolysis and isomerization of sucrose catalyzed by Slase.

Despite the high homology and structural similarity among Slase, their catalytic behavior varies considerably depending on the analyzed isoform, pH, and reaction temperature (Figure 4, Table 2). For instance, the isoform from *P. dispersa* UQ68J produces up to 91% isomaltulose and 3% trehalulose (30–35 °C) [43], while the Slase from *A. radiobacter* MX-232 [46] and *P. mesoacidophila* MX-45 [47] yield up to 88% trehalulose. Significant differences also exist in the Michaelis–Menten constants ( $K_m$ ) and catalytic efficiencies of various Slase (Table 2). Thus,  $K_m$  is estimated in the range of 30.1 mM (recombinant isoform from *Serratia plymuthica* AS9) [55] to 255.1 mM (recombinant isoform from *E. rhapsontici* NX-5) [54]. Meanwhile, catalytic efficiencies ( $k_{cat}/K_m$ ) have been reported in the range of 1301  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (recombinant isoform from *P. rubrum* CBS 574.77) [86] to 0.27  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (recombinant isoform from *Klebsiella* sp. LX3) [85].



**Figure 4.** Phylogenetic tree of sucrose isomerase isoforms. A consensus phylogenetic tree was constructed using the the software MEGA 11 Version 11.0.13 [83]. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method and the JTT matrix-based model. The tree with the highest log likelihood ( $-5484.74$ ) is displayed. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is indicated next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were automatically obtained by applying the Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances, which were estimated using the JTT model. Then, the topology with the superior log likelihood value was selected. This analysis included 11 amino acid sequences. The final dataset comprised 600 positions. The sequences used belong to the isoforms: Pall NX-5 (GenBank: ADJ56407), CBS 574.77 (GenBank: 3GBE\_A), Pall NK33 (GenBank: AAM96902.1), UQ68J (GenBank: AAP57083.1), UQ14S (GenBank: AAP57085.1), Pall LX3 (GenBank: 1M53\_A), A30 (GenBank: EKF64560.1), AS9 (GenBank: ALS09706.1), Ejp617 (GenBank: ADP12651.1), FMB-1 (GenBank: ACF42098.1), and Pal-2 (GenBank: VUC84579.1).

**Table 2.** Slase with different general characteristics.

Isoform	T <sub>op</sub> (°C)	pH	Specific Activity (U/mg)	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (mM <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	Isomaltulose Ratio (%)	References
Wild-type Pall NX-5	30	6	423	222	NR	83	[87]
Recombinant Pall NX-5	30	5	NR	257	NR	87	[39]
Recombinant Pall NX-5	30	6	483.8	255.1	2.2	78	[54]
Wild-type Pall D12	40	6	19.8	138	NR	65.7	[40]
Wild-type NCPPB 1578	30	NR	4.11 <sup>a</sup>	280	NR	85	[88]
Recombinant CBS 574.77	35	NR	NR	32.4	1301	88.5	[86]
Recombinant Pall NK33	35	6	2362	42.7	NR	76.8	[49]
Recombinant UQ68J	35	5	562	39.9	17.9	91	[51]
Recombinant UQ14S	35	6	351	76	6.2	66	[51]
Recombinant Pall LX3	35	6	328	54.6	0.27	83	[85]
Wild-type ATCC15928	30	6.2	120	65	NR	72.6	[41]
Recombinant AS9	30	6	957.5	30.1	33	76.3	[55]
Recombinant Ejp617	40	6	118.87	69.28	NR	80.5	[89]
Recombinant FMB-1	50	5–6	49	NR	NR	78	[50]
Recombinant Pal-2	40	5.5	286.4	62.9	NR	81.7	[48]

<sup>a</sup> Activity refers to total proteins, using osmotic shock as an extraction method. NR—Not reported.

### 3. Thermolability of Sucrose Isomerases

With the exception of the isoform from *Enterobacter* sp. FMB-1 (T<sub>op</sub> 50 °C) [50], most Slase exhibit their peak activity between 20 and 40 °C [89,90] (Table 2). Even so, the isoform from *Enterobacter* sp. FMB-1 dramatically loses its activity at temperatures exceeding 50 °C [50]. Similarly, the recombinant isoform from *E. rhapsodicus* NX-5 displayed no activity after being incubated for 30 min at 60 °C [87], while the wild-type variant has a half-life of 5 min at the same temperature [39]. For its part, the isoform from *Erwinia* sp. Ejp617 retained only 1.7% of its peak activity after 1 h of incubation at 50 °C [89]. Likewise, the recombinant isoform from *Pantoea dispersa* lost up to 71% of its activity after 1 h of incubation at 45 °C [91]. Thus, the high thermolability of Slase presents a challenge in the industrial production of isomaltulose [55].

The issue of enzyme instability has posed a fundamental challenge in their use for productive-scale synthesis and chemical production [92]. Often, harsh reaction conditions are required, such as elevated temperatures and exposure to organic solvents [3]. Reaction rates increase exponentially with temperature, reaching a point of enzyme denaturation [93]. Thus, their thermal stability becomes a desirable attribute in the development of an industrial process. Additionally, enhanced thermostability is also associated with longer half-lives under mild conditions and greater retention of activity in non-aqueous solvents [94]. These properties, combined with a suitable reaction strategy, would facilitate the reuse of the biocatalyst and thereby reduce the costs associated with the operation of the process [95–97]. This approach also addresses the cost stigma associated with enzyme use [98]. Specifically, the utilization of thermally stable Slase enzymes would offer benefits; as temperature increases, there is a decrease in the viscosity of the reaction mixture, enhanced substrate solubility, increased mass transfer rates, and a reduction in the risk of microbial contamination [55,99,100].

Several structural elements contribute to the thermal stability of enzymes. Numerous studies addressing the crystal structures of mesophilic and thermophilic proteins have demonstrated the pivotal relationship between structure and thermostability [92], further identifying key factors affecting enzyme thermostability [101]. Among these, the composition of amino acids forming their helices stands out [102,103]. For instance, when comparing the prevalence of Tyr, Gly, and Gln in helices of thermally stable proteins, these amino acids appear in greater abundance than in mesophilic proteins, whereas the opposite

is true for Val [104]. Substitutions such as Lys → Arg and Ser → Ala have also been observed to be common when comparing mesophilic to thermophilic proteins [105]. Other core determinants of protein thermal stability include increased hydrogen bonding [106–108], the introduction of disulfide bonds [109–111], salt bridges [112,113], loop shortening [114,115], optimization of electrostatic surfaces [116,117], enhanced solvation in specific protein regions [118], and augmented intramolecular hydrophobic packing [119,120]. The factors mentioned previously largely share a similar basis, aiming to reduce the molecule's entropy; that is, enzyme rigidity is required for higher thermostability [108]. It should be noted that the enhancement of thermal stability is achieved through the cooperative optimization of various factors rather than a single dominant interaction [121].

#### 4. Protein Engineering, Thermostabilization of Sucrose Isomerases

Protein engineering is a widely used method in the stabilization of mesophilic enzymes [92,122]. In this sense, the use of protein engineering tools accumulates several industrial successes, some of which date back to the 1980s when Genencor designed bleach-tolerant proteases for laundry detergents [123]. Numerous strategies have been developed to enhance protein thermostability, which typically falls into three approaches: rational design; directed evolution; and semi-rational design [55,124–126]. The choice of strategy will depend on both the availability of a robust screening method and information about the enzyme's structure and function [127]. Broadly speaking, engineering to enhance an enzyme's properties follows three steps: initially, changes to be made in the protein are defined using one of the engineering strategies; subsequently, the proposed changes (mutagenesis) are implemented; and finally, protein variants are evaluated to select mutants with superior properties [128] (Figure 5).

##### 4.1. Directed Evolution

Directed evolution, proposed by Arnold in the 1990s, mimics the process of natural evolution. This strategy encompasses genetic diversification, screening, and the selection of valuable mutants from a vast array of mutant libraries [129,130]. The error-prone PCR (epPCR) technique, vital within the context of directed evolution, is a highly effective method for generating mutants with enhanced thermostability [92]. In this method, during the replication process, a modified DNA polymerase introduces random mutations into the gene of interest [131,132]. Hence, practicing directed evolution takes on a *quid pro quo* nature, as its execution does not necessitate prior knowledge of the target enzyme's structure and function or the various amino acid substitutions generated [133]. This strategy's primary challenge lies in the vast number of mutant colonies produced (typically around  $10^4$ ) [124]. A robust screening and selection method for mutants with desired characteristics is required, rendering the process time-consuming and costly [134]. There are also limitations in constructing highly diverse mutant libraries, such as the commonly low mutagenic frequency, the redundancy of the genetic code, and mutagenic "hot spots" caused by the propensity of polymerases [135].

Rational design mandatorily requires detailed structural information that might not yet be available for all enzymes [92]. In this way, directed evolution could be applied to proteins lacking structural research, and the effectiveness of this strategy has ensured its popularity, even as computer-assisted engineering plays a significant role in enzyme thermostabilization. Pertinently, enzymatic engineering through directed evolution, although not applied to sucrose isomerases, has successfully enhanced the thermostability of GH13 enzymes such as the  $\alpha$ -glucosidase from *Thermus thermophilus* TC11 [136] and the  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* [137].

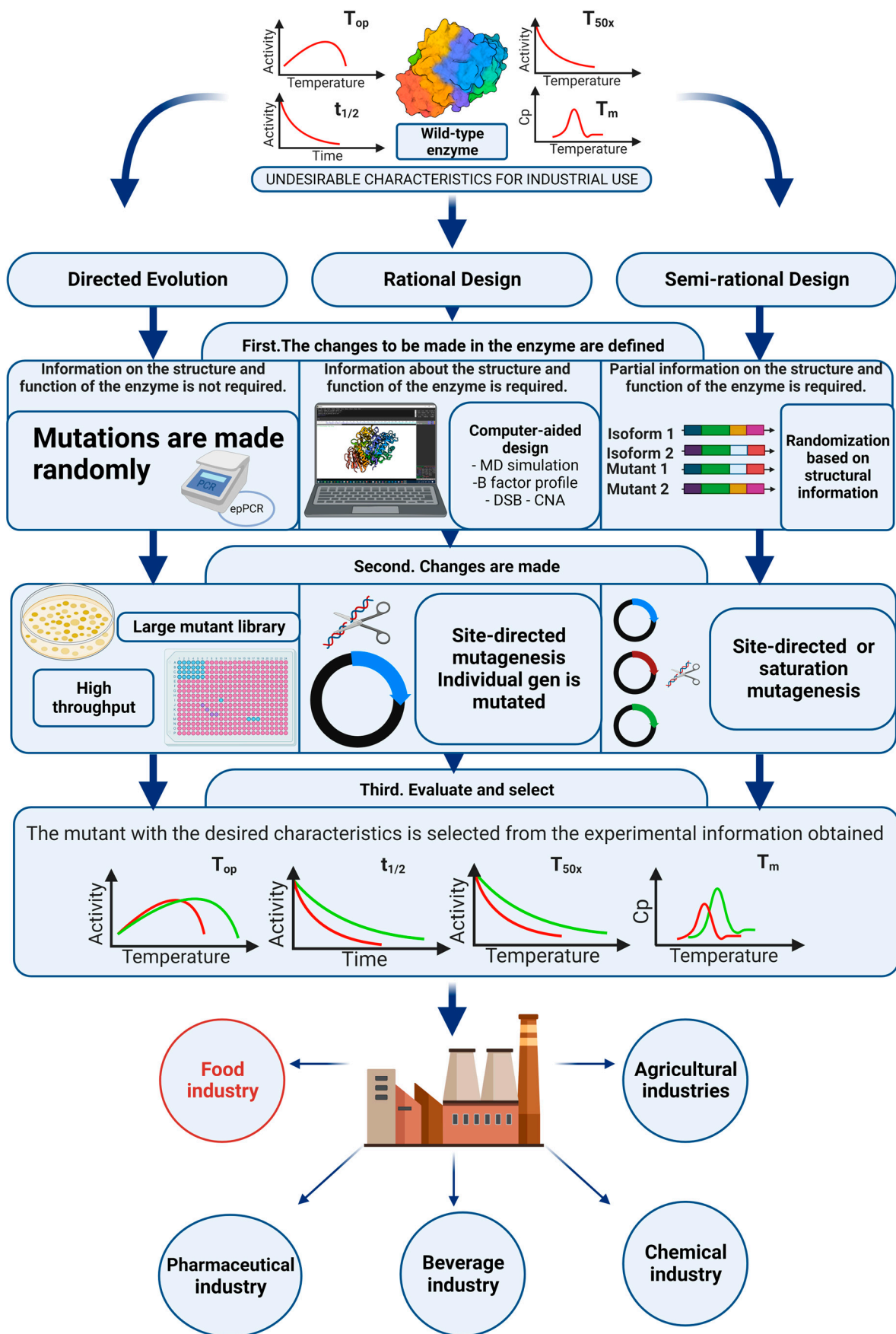


Figure 5. Protein engineering strategies in the thermostabilization of enzymes.

#### 4.2. Rational Design

Rational design is rooted in understanding the relationship between a protein's structure and function [138]. Based on this relationship, precise changes are introduced into the amino acid sequence through site-directed mutagenesis [133]. In this regard, rational design and understanding of the structure–function relationship have evolved synergistically, thus opening new perspectives for modulating enzymatic function and de novo prediction [139]. These attributes give rational design the potential to drastically reduce the size of the mutant library and the associated screening costs [92]. In recent years, with the development of bioinformatics, numerous algorithms and computational tools have emerged that allow the monitoring of flexible regions in protein molecules, as well as predicting thermostabilization [140,141]. Precisely, computer-assisted rational design is an attractive alternative that speeds up the process of enzymatic engineering [142]. Commonly, in the *in silico* stabilization of enzymes, strategies are followed such as comparison with homologous sequences of greater thermostability [143], analysis of the B-factor [144,145], molecular dynamics (MD) simulations [113,146], constraint network analysis (CNA) [147], designing disulfide bonds (DSB) [142,148,149], engineering glycosylation sites [150], designing stabilizing salt bridges based on enzyme sequence and structure [151], and calculations to minimize effective energy that mimics Gibbs free energy [152,153]. During the application of these strategies, substitutions made should not belong to a stabilization center or the active site cavity. Thus, mutations are often observed in loop regions or exposed surface areas [110,115].

#### 4.3. Semi-Rational Design

Using the primary structure of a protein to predict biochemical and biophysical parameters is an attractive field of research. This is because information on genomic sequencing is expanding much more rapidly than structural or biochemical data [154]. For this reason, semi-rational design has emerged as a highly attractive strategy in which directed evolution and rational design are combined. This combination allows for the reduction of mutant library sizes [133]. Additionally, considering evolutionary variability, mechanical features, and topological limitations for amino acid identification can result in libraries having a higher functional content [155].

#### 4.4. Characterization of Thermostability

Frequently, the thermostability of an enzyme is characterized by quantifying the physical parameters: optimal temperature ( $T_{op}$ ) and its associated activity range [120], melting point temperature ( $T_m$ ) [119], the  $T_{50x}$ , and the half-life time ( $t_{1/2}$ ) [156].  $T_m$  characterizes the irreversible unfolding of the protein's secondary or tertiary structure, being one of the most informative parameters of thermostability [157]. On the other hand,  $T_{50x}$  represents the temperature at which half of the residual activity remains after a time "x" (min); this parameter is an indicator of temperature-dependent deactivation. The  $t_{1/2}$  parameter represents the time the enzyme retains half of its residual activity at a specified temperature. Thus, it is a kinetic parameter of stability [120]. Figure 5 provides a summarized depiction of the aforementioned aspects.

#### 4.5. Thermostabilization of Sucrose Isomerases

Protein engineering techniques applied to SIase have targeted three primary goals: enhancing enzyme thermostability, boosting enzyme activity, and increasing the isomaltulose production ratio (Table 3). Zhang et al. [85] honed in on improving thermostability by identifying potential sites for proline substitution. It is recognized that the presence of proline in the second position of a  $\beta$ -turn makes a protein more stable by reducing its entropy [158,159]; this concept has been extensively applied for enhancing thermostability in  $\alpha$ -amylases [159,160]. Zhang et al. [85] chose the residues Arg310 and Glu498 for proline substitution. Resulting from the mutations, the optimal temperature of Pali increased from 35 °C to 40 °C and 45 °C for Pali:Glu<sup>498</sup>Pro and Pali:Glu<sup>498</sup>Pro/Arg<sup>310</sup>Pro, respectively.



The half-lives of PalI, PalI:Glu<sup>498</sup>Pro, and PalI:Glu<sup>498</sup>Pro/Arg<sup>310</sup>Pro were 1.81, 9.45, and 13.61 min at 50 °C, respectively. Thus, the half-life of PalI:Glu<sup>498</sup>Pro/Arg<sup>310</sup>Pro at 50 °C was approximately 11 times higher than that of PalI. Similarly, to enhance the stability of the *S. plymuthica* AS9 isoform, Duan et al. [55] identified amino acid residues with high B-factors for site-directed mutagenesis. The mutants E<sup>175</sup>N, K<sup>576</sup>D, and E<sup>175</sup>N/K<sup>576</sup>D were designed using the Rosetta Design database. As a thermostability enhancement result, the mutants displayed a slightly increased optimal temperature (35 °C) compared to the wild-type enzyme (30 °C). The half-lives of mutants E<sup>175</sup>N, K<sup>576</sup>D, and E<sup>175</sup>N/K<sup>576</sup>D were 2.30, 1.78, and 7.65 times longer than the wild-type enzyme at 45 °C, respectively. Meanwhile, Sardiña-Peña et al. [54] enhanced the thermal stability of the *Erwinia rhapsontici* NX-5 isoform. The authors aimed to enhance the presence of thermostabilizing interactions, such as hydrogen bonds and glycosylation, in the molecule's flexible regions. The engineered mutants K<sup>174</sup>Q, L<sup>202</sup>E, and K<sup>174</sup>Q/L<sup>202</sup>E were expressed as glycoproteins and exhibited an increase in their optimal temperature by 5 °C, while their half-lives at 40 °C increased by factors of 2.21, 1.73, and 2.89, respectively.

**Table 3.** Characteristics of mutant sucrose isomerases with improved thermostability.

Isoform	Modification	Strategy for Thermostabilization	Stabilizing Interaction	T <sub>op</sub> (°C)	Half-Life (min)	Specific Activity (U/mg)	K <sub>m</sub> (mM)	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (mM <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	References
PalI NX-5	Glycosylation	B-factor analysis and glycosylation site engineering.	Strengthening of the hydrogen-bonding network and glycosylation of the flexible terminal C region.	30	10.1 <sup>a</sup>	483.8	255.1	2.21	[54]
PalI NX-5	Glycosylation—K174Q			35	22.3 <sup>a</sup>	529.9	241.9	2.55	
PalI NX-5	Glycosylation—L202E			35	17.5 <sup>a</sup>	509.1	234.9	2.52	
PalI NX-5	Glycosylation—K174Q/L202E			35	29.2 <sup>a</sup>	509.3	231.2	2.57	
PalI AS9	Native	B-factor analysis	Strengthening of the hydrogen bridge network	30	39.2 <sup>b</sup>	957.5	30.1	33	[55]
PalI AS9	E175N			35	90.2 <sup>b</sup>	1017.6	28.1	45.6	
PalI AS9	K576D			35	69.8 <sup>b</sup>	1045.7	29.5	34.4	
PalI AS9	E175N/K576D			35	300 <sup>b</sup>	1218.9	26.8	39.4	
PalI LX3	Native	Proline theory	Loop stabilization	35	1.81 <sup>c</sup>	328	54.6	0.27	[85]
PalI LX3	E498P			40	9.45 <sup>c</sup>	350	NR	0.29	
PalI LX3	E498P/R310P			40	13.61 <sup>c</sup>	340	NR	0.31	

<sup>a</sup> The enzymes were incubated in 50 mM citric acid/sodium phosphate buffer (pH 6.0) at 40 °C. <sup>b</sup> The enzymes were incubated in 50 mM citric acid/sodium phosphate buffer (pH 6.0) at 45 °C. <sup>c</sup> The enzymes were incubated in 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 6.0) at 50 °C.

When collectively analyzing the preceding reports, the following similarities stand out. Firstly, mutation sites (substituted residues) were located on the molecules' periphery (surface), which is undoubtedly associated with this region being the most susceptible to changes in the enzyme's microenvironment. Secondly, target sites corresponded to loop regions with significant flexibility. Duan et al. [55] and Sardiña-Peña et al. [54] laid the foundation for their strategies by interpreting the B-factor profile of the crystal structures 3GBD (Resolution 1.95 Å) and 4HOW (Resolution 1.7 Å, Table 1), respectively. These profiles are a practical and helpful tool for identifying flexible regions (hotspots) in any enzyme. However, regarding B-factors as a sufficient foundation for flexibility conclusions could pose risks and errors [161]. Merritt [162] argues that the crystal structure's resolution is a pivotal parameter when using the B-factor. A low resolution (3–5 Å) correlates with disproportionate B-factors, which should not be used for specific conclusions. Even if the resolutions of the SIase crystal structures are relatively high, drawing factual conclusions from the B-factor might remain limited [163].

The strategies delineated by Zhang et al. [85], Duan et al. [55], and Sardiña-Peña et al. [54] were not aimed at enhancing the enzymes from a kinetic standpoint. However (Table 3), as reported by Zhang et al. [85], compared to PalI, the maximum specific activity increased by 7% for PalI:Glu<sup>498</sup>Pro and by 16% for PalI:Glu<sup>498</sup>Pro/Arg<sup>310</sup>Pro. Duan et al. [55] report that

in comparison to Pali AS9, the  $K_m$  values for the mutants E<sup>175</sup>N, K<sup>576</sup>D, and E<sup>175</sup>N/K<sup>576</sup>D decreased by 6.6%, 2.0%, and 11.0%, respectively, and their catalytic efficiency values increased by 38.2%, 4.2%, and 19.4%, respectively. Similarly, as reported by Sardiña-Peña et al. [54], the  $K_m$  values for the mutants K<sup>174</sup>Q, L<sup>202</sup>E, and K<sup>174</sup>Q/L<sup>202</sup>E decreased by 5.1%, 7.9%, and 9.4%, respectively; additionally, the catalytic efficiency increased by up to 16%. Furthermore, the mutants exhibited an increase in activity from 20.3% to 25.3%. Both Duan et al. [55] and Sardiña-Peña et al. [54] justified the increased activity by stating that the substitutions made were distanced from the catalytic center and isomerization region. Therefore, the mutations might have caused these regions to be more compact, exerting a positive impact on kinetic parameters. In light of this, Liu et al. [48] enhanced the enzymatic activity of the *Raoultella terrigena* isoform using a thermal stability optimization strategy. For this purpose, they employed the Hotspot Wizard tool (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard/>, accessed on 15 May 2021) [164], which enabled the identification of hotspots through multiple sequence alignment. Compared to the wild-type Pali-2, the enzymatic activities of the mutants N<sup>498</sup>P and Q<sup>275</sup>R increased by 89.2% and 42.2%, respectively, while the isomaltulose production efficiencies of the mutants Y<sup>246</sup>L, H<sup>287</sup>R, and H<sup>481</sup>P improved up to 89.1%, 90.7%, and 92.4%, respectively.

### 5. Glycosylation of Sucrose Isomerases

Slase are molecules naturally produced in prokaryotes. Due to this, the potential effects of post-translational modifications, such as glycosylation, on the structure, function, and stability of Slase have not been deeply studied. However, if a protein naturally produced in prokaryotes possesses potential sites for N-glycosylation, its expression in a eukaryotic host could result in a glycoprotein. As shown in Figure 6, Slase isoforms such as Pali NX-5, CBS 574.77, Pali LX3, and MutB display potential sites for N-glycosylation. Specifically, Sardiña-Peña et al. [54] took this into account during the thermostabilization of the Pali NX-5 isoform by choosing *Pichia pastoris* as the expression system. Both the non-transformed variant and the mutants developed by Sardiña-Peña et al. [54] were expressed as glycoproteins. Nevertheless, Sardiña-Peña et al. [54] did not deeply analyze the effect that glycosylation might have had on the molecule's thermostability and kinetic behavior. However, it can be noted that in the case of the Pali NX-5 mutant variants (K174Q, L202E, and K174Q/L202E), the observed increase in thermostability could have resulted from the simple effect of the introduced mutations or their combination with the molecule's glycosylation. While the non-mutated but glycosylated variant showed the same  $T_{op}$  as reported by Ren et al. [87] (Tables 2 and 3), the apparent effect of glycosylation on the  $T_{op}$  was null. Yet, from a kinetic perspective, the glycosylated Pali NX-5 displayed enhanced enzymatic activity.

N-glycosylation is one of the most common co- and post-translational modifications in eukaryotes [165]. This modification usually occurs in asparagine residues within the consensus sequence Asn-X-Ser/Thr, where X cannot be proline because the pyrrol ring structure of proline increases the rigidity of the peptide chain and inhibits glycosylation [166]. In this sense, Knauer and Lehle [167] estimate that between 70–90% of the consensus sequences present in secreted proteins have glycans. However, when the folding of the polypeptide chain occurs in the cytosol, not necessarily all consensus sequences are accessible to the action of glycosyltransferases to start glycosylation [168], which would happen among the Slase. As seen in Figures 1A, 2 and 6, potentially glycosylate regions like the one located in the enzyme's catalytic cavity (N144 in Pali NX5, N102 in CBS574.77, N116 in Pali LX3, and N102 in MutB) would be discarded if the action of glycosyltransferases occurred after enzyme folding. It should be noted that N-glycosylation begins when the oligosaccharide precursor (Glc3Man9GlcNAc2) is transferred, through oligosaccharide transferase, to the consensus sequence present in the nascent polypeptide [169]. The N-glycans of proteins are subsequently processed by a series of glucosidases and glycosyltransferases in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus [170].

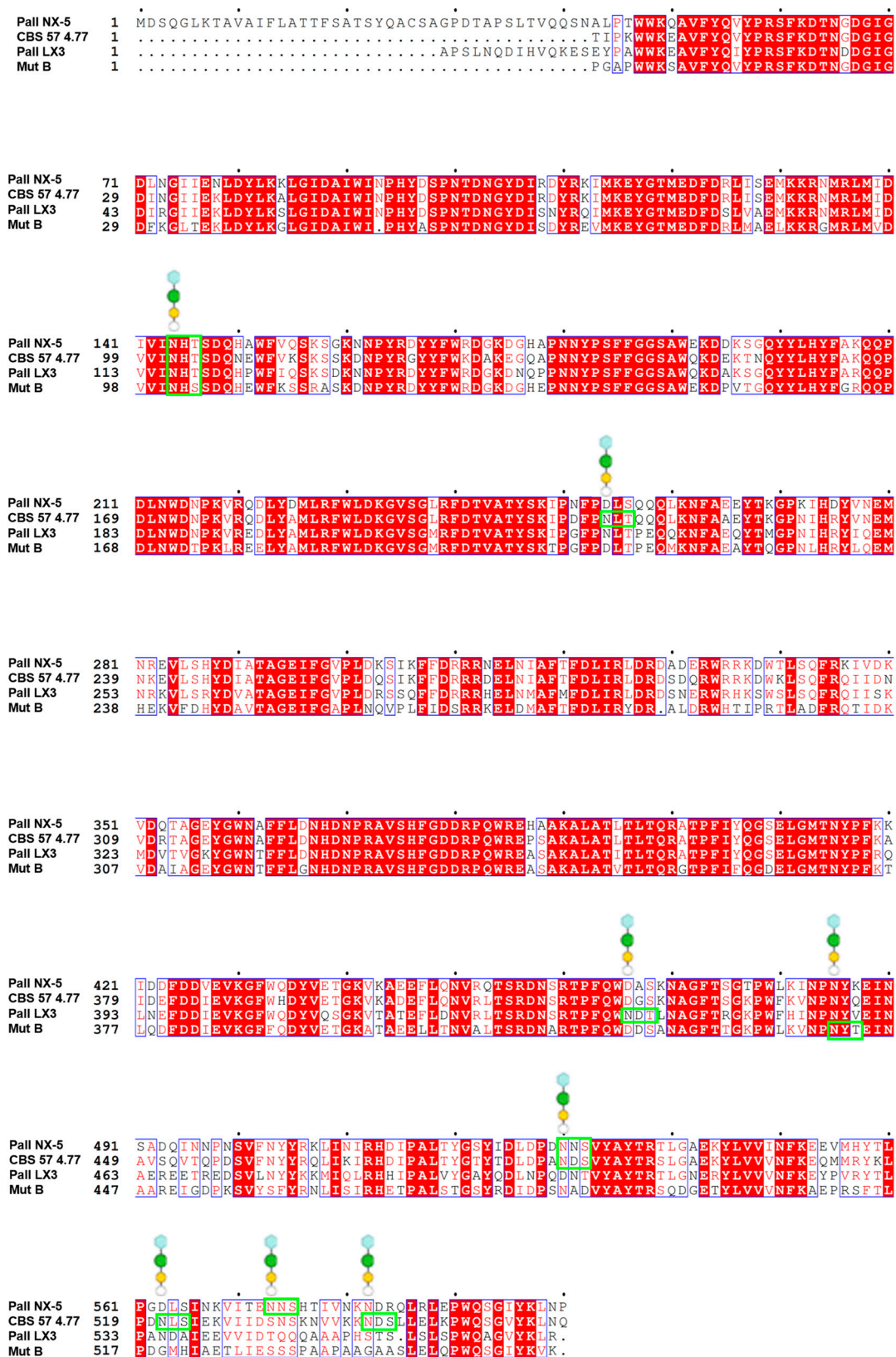


Figure 6. Indicated in green boxes are the potential sites for N-glycosylation present in the Pall NX-5, CBS 574.77, Pall LX3, and MutB isoforms. Monosaccharides point to the glycosylable asparagine residue, monosaccharide symbols follow the SNFG system. Residues depicted or highlighted in red within the blue blocks represent conserved residues. Sequence alignments were generated using the software MEGA 11 Version 11.0.13 [83] and ESPript [84].

Protein glycosylation typically constitutes a stabilizing interaction against temperature, pH, the presence of proteases, and physiological stress [171–174]. In this regard, Hu et al. [175] suggest that glycosylation reduces the flexibility of the protein structure, thereby enhancing its structural and thermal stability. Furthermore, studies by Ryu et al. [168] and Maksimainen et al. [176] indicate extensive interactions of immature N-glycans with their carrier proteins. Moreover, glucose residues on the non-reducing end exhibit extensive interactions with the protein surface [177]. Interactions have even been observed between glycans and residues located 30 Å from the N-glycosylated Asn [178]. Thus, N-glycosylation might affect the protein's stability [150,179], activity [144], and specificity [180].

The effect of glycosylation is complex and not always predictable or beneficial [150,175]. Such behavior has been noted within the GH13 family. For instance, Hu et al. [175] observed that the glycosylation of  $\alpha$ -amylase BLA from *Bacillus licheniformis* had no significant impact on the molecule's thermal stability since the inherent stability of BLA overshadowed the glycosylation effect on its thermal stability. Assessing the effect of glycosylation on enzyme thermal stability becomes even more complex when considering the various glycosylation patterns obtainable in eukaryotic hosts. In yeasts, protein N-glycans undergo processing to form structures rich in mannose. However, the fully processed forms of the N-glycan vary depending on the species [181]. Moreover, for a given microorganism, the glycosylation process might be influenced by environmental factors such as fermentation duration, the expression level of glucosidases/glycosyltransferases, and culture medium composition [182]. Additionally, intrinsic structural factors associated with the nascent protein also affect glycan processing, maturation, and subsequent interaction with the side chain [183]. Given the aforementioned discussions, analyzing the effect of N-glycosylation on sucrose isomerases is intriguing, especially considering that they naturally possess multiple consensus sequences (Figure 6).

## 6. Future Perspectives

Even though the thermostability of SIase is a limiting factor and multiple reports have deeply examined their structure–function relationship [56,59–61,86,184], research focused on enhancing the thermal stability of SIase using protein engineering is quite limited and leaves questions regarding potential strategies that could be employed in this direction. Therefore, the following discussion, from a theoretical perspective, considers other mechanisms that might be used for this purpose.

### 6.1. Thermostable Sucrose Isomerases Based on Homology Models and Chimerization

In contrast to SIase, some members of the GH13 family exhibit elevated optimal temperatures, often exceeding 70 °C. Hence, these enzymes have been widely used in the formulation of detergents, the baking industry, beer production, alcohol manufacture, and starch sugar production [175]. For example, the thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423 displays an optimal temperature of 100 °C. This enzyme can maintain more than 70% activity in the 80–140 °C range. Likewise, this  $\alpha$ -amylase retained over 50% of its enzymatic activity after incubation at 80 °C for 110 min [185]. Also noteworthy are the  $\alpha$ -amylases from *Pyrococcus furiosus* [186] and *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 [187], with optimal temperatures of 100 °C and 70 °C, respectively. In both cases, they exhibited half-lives of 12 h at their optimal temperatures. The 1,4- $\alpha$ -glucan branching enzyme from *Bacillus licheniformis* ATCC14580 displays peak activity at 80 °C and retains 90% of its enzymatic activity at 70 °C over 16 h. Similarly, the trehalose synthase from *Thermobaculum terrenum* ATCCBAA-798 presents an optimal temperature of 45 °C, also retaining 80% of its peak activity after treatment at 70 °C for 30 min [188].

The characteristics of the thermostable GH13 enzymes make them an unexplored niche for designing SIase with novel properties. Consider that the GH13 family displays a highly conserved structure and mechanism among its members. Moreover, the structure–function relationship of SIase has been thoroughly examined. In this context, both homology models (sequence-based) and structure-based designs could serve as alternatives for detecting

“hotspots” affecting thermal stability. Such rational design approaches, followed by *in silico* structural analysis, would facilitate the creation of mutant and chimeric SIase with enhanced hydrogen bonding and hydrophobic interactions. For instance, Cui et al. [143] employed a sequence-based design to enhance the specific activity and thermal stability of the  $\alpha$ -amylase BLA from *Bacillus licheniformis*. Using this approach, Cui et al. [143] designed the Q<sup>360</sup>C mutant, which exhibited a residual activity 1.27 times higher than the wild-type variant after pre-incubation at 70 °C for 30 min. This result suggests that an approach grounded in multiple sequence alignment is feasible for the thermo-stabilization of other GH13 family enzymes, like SIase.

#### 6.2. Thermostable Sucrose Isomerases Based on Improving the Entropy of the Folded State

It has been observed that modifications enhancing the entropy of the folded state can also lead to stabilization [189]. Specifically, strategies such as truncation or cyclization of mesophilic enzymes have employed this paradigm. In this context, it has been reported that the removal of exposed loop regions can enhance stability. Studies on flexible loop areas have shown that the entropic effect of ordering a loop upon folding is analogous to the energetic outcomes obtained after loop truncation [190]. Furthermore, when comparing mesophilic or thermophilic structures, an inverse correlation has been observed between loop length and stability, and additionally, increased stability through loop shortening [191]. Although truncation has not yet been implemented for SIase thermostabilization, this approach has been pursued with some members of the GH13 family, such as the alkaline  $\alpha$ -amylase (Amy703) from *Bacillus pseudofirmus* 703. This enzyme was truncated in the N-terminal domain by Lu et al. [192], who developed the N-Amy mutant. This mutant displayed a  $T_{op}$  of 50 °C, 10 °C higher than Amy703. Thus, the potential thermostabilization of SIase by truncating segments of domain B (loop-rich) becomes highly intriguing for future work. Beyond this, conducting protein engineering activities on domain B might assist in discerning its function within the SIase. In this regard, studies like those by Feller et al. [193] and Rhimi et al. [194] have employed truncation of segments with flexible loops in GH13 enzymes to elucidate their role in inhibitor tolerance and enhancement of enzymatic activity.

Cyclization is another strategy to enhance the entropy of a protein's folded state. Broadly speaking, cyclization aims to connect the N and C termini of a protein's amino acid chain. Typically, the N and C-terminal regions are often the most flexible parts of the protein's backbone [195]. Protein backbone cyclization can be achieved through chemical ligation, the introduction of disulfide bonds, and peptide ligation [156]. Particularly, protein cyclization using biological conjugation approaches like the SpyTag/SpyCatcher and SnoopTag/SnoopCatcher systems has been a highly effective strategy for creating thermostable enzymes [196]. The Tag/Catcher system leads to specific covalent conjugation of the protein backbone through two short polypeptide tags via the formation of an isopeptide bond between two amino acid side chains [197]. In the context of the GH13 family, enzymatic cyclization has been successfully developed, as seen in the research conducted by Chen et al. [146] on the thermostability of trehalose synthase (TreS) from *Thermomonospora curvata*. In their study, Chen et al. [146] noted that in the case of TreS, cyclization led to a much greater increase in thermostability than was achieved through site-directed mutagenesis. It is worth noting that, to date, approaches to SIase thermostabilization have primarily focused on site-directed mutagenesis. Thus, it would be interesting to evaluate the effect of a cyclization-based approach. However, it should be emphasized that in protein engineering, there are no universal strategies. The introduction of inteins can destabilize a protein due to steric constraints in the folded conformation, limiting the broad application of protein cyclization [157].

Whether within the framework of cyclization or as an independent strategy, disulfide bond engineering is also a successful approach for enzyme stabilization [149]. However, the reasons behind the stabilizing effect of this bond are not well characterized, and contrary to expectations, many designed disulfide bonds have resulted in reduced stability

of the modified protein [198]. In some cases of GH13 enzymes, such as Slase, the C-terminal domain is associated with structural stability [59,61]. Precisely with this in mind, Li et al. [199] introduced a disulfide bridge in the C-terminal domain of the  $\alpha$ -amylase (FSA) from *Flavobacteriaceae sinomicrobium*. They achieved this by making the S<sup>450</sup>C and K<sup>415</sup>C substitutions, leading to a significant improvement in enzyme activity and thermostability. Thus, introducing disulfide bridges in the C-terminal domain, or even in the loop-rich domain, might be a feasible strategy in the thermostabilization of Slase.

### 6.3. Thermostable Sucrose Isomerases, Other Alternative Strategies

Beyond protein engineering, strategies based on chemical modifications also allow for the enhancement of enzyme stability. For instance, PEGylation has been used to improve the stability of *Saccharomycopsis fibuligera*  $\alpha$ -amylase [200], enabling a 5 °C increase in the enzyme's optimal temperature. Srivastava [201] and Klibanov [202] propose that polysaccharides attached to enzymes during conjugation provide rigidity and hydration, thereby improving their stability. In this regard, Villalonga et al. [203] conjugated porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1) with carboxymethylcellulose. As a result, the specific activity of the conjugate decreased by 54% compared to the native enzyme. However, the thermostability of the conjugated  $\alpha$ -amylase improved significantly. While the native enzyme became inactive at 55 °C, the conjugate exhibited a complete loss of activity from 70 °C onwards. According to Villalonga et al. [203], the conjugate showed greater resistance to denaturing agents such as urea and sodium dodecyl sulfate. It is worth noting that such improvements are not typically achieved using traditional protein engineering techniques. However, to date, no chemical modification-based strategy has been employed in the thermostabilization of Slase.

**Author Contributions:** A.J.S.-P. and L.M.-R. wrote the manuscript. N.R.F.-H., B.F.I.-F. and S.A.-G., edition. L.B.-C., T.S.S.-C. and E.A.E.-S. critically reviewed the manuscript. Q.R.-C. project administration, supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** A.J. Sardiña-Peña thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONA-CyT) for the Ph.D. studies grant.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Kumar, A.; Gudiukaite, R.; Gricajeva, A.; Sadauskas, M.; Malunavicius, V.; Kamyab, H.; Sharma, S.; Sharma, T.; Pant, D. Microbial lipolytic enzymes—promising energy-efficient biocatalysts in bioremediation. *Energy* **2020**, *192*, 116674. [\[CrossRef\]](#)
2. Lu, L.; Guo, L.; Wang, K.; Liu, Y.; Xiao, M.  $\beta$ -Galactosidases: A great tool for synthesizing galactose-containing carbohydrates. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *39*, 107465. [\[CrossRef\]](#)
3. Bornscheuer, U.T.; Huisman, G.W.; Kazlauskas, R.J.; Lutz, S.; Moore, J.C.; Robins, K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **2012**, *485*, 185–194. [\[CrossRef\]](#)
4. Clouthier, C.M.; Pelletier, J.N. Expanding the organic toolbox: A guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585–1605. [\[CrossRef\]](#)
5. Sandoval, B.A.; Hyster, T.K. Emerging strategies for expanding the toolbox of enzymes in biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 45–51. [\[CrossRef\]](#)
6. Sheldon, R.A.; Brady, D. Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis. *ChemSusChem* **2019**, *12*, 2859–2881. [\[CrossRef\]](#)
7. Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Keßler, M.; Stürmer, R.; Zelinski, T. Industrielle Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Zwischenprodukten. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 806–843. [\[CrossRef\]](#)
8. Xue, Y.-P.; Cao, C.-H.; Zheng, Y.-G. Enzymatic asymmetric synthesis of chiral amino acids. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 1516–1561. [\[CrossRef\]](#)

9. Thompson, M.P.; Peñafiel, I.; Cosgrove, S.C.; Turner, N.J. Biocatalysis Using Immobilized Enzymes in Continuous Flow for the Synthesis of Fine Chemicals. *Org. Process. Res. Dev.* **2018**, *23*, 9–18. [CrossRef]
10. Bezbradica, D.; Covic, M.; JTanaskovic, S.; Lukovic, N.; Carevic, M.; Milivojevic, A.; Knezevic-Jugovic, Z. Enzymatic syntheses of esters—Green chemistry for valuable food, fuel and fine chemicals. *Curr. Org. Chem.* **2017**, *21*, 104–138. [CrossRef]
11. Schoemaker, H.E.; Mink, D.; Wubbolts, M.G. Dispelling the Myths—Biocatalysis in Industrial Synthesis. *Science* **2003**, *299*, 1694–1697. [CrossRef]
12. Serra, S.; Fuganti, C.; Brenna, E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 193–198. [CrossRef]
13. Aravindan, R.; Anbumathi, P.; Viruthagiri, T. Lipase Applications in Food Industry. 2007. Available online: <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/3016> (accessed on 21 November 2022).
14. Tan, T.; Lu, J.; Nie, K.; Deng, L.; Wang, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 628–634. [CrossRef]
15. Gog, A.; Roman, M.; Toşa, M.; Paizs, C.; Irimie, F.D. Biodiesel production using enzymatic transesterification—Current state and perspectives. *Renew. Energy* **2012**, *39*, 10–16. [CrossRef]
16. Volpato, G.; CRodrigues, R.; Fernandez-Lafuente, R. Use of enzymes in the production of semi-synthetic penicillins and cephalosporins: Drawbacks and perspectives. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3855–3873. [CrossRef]
17. Fei, Q.; Guarnieri, M.T.; Tao, L.; Laurens, L.M.; Dowe, N.; Pienkos, P.T. Bioconversion of natural gas to liquid fuel: Opportunities and challenges. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 596–614. [CrossRef]
18. Basso, A.; Serban, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Mol. Catal.* **2019**, *479*, 110607. [CrossRef]
19. de Souza, W.F.C.; Almeida, F.L.C.; de Castro, R.J.S.; Sato, H.H. Isomaltulose: From origin to application and its beneficial properties—A bibliometric approach. *Food Res. Int.* **2022**, *155*, 111061. [CrossRef]
20. Liu, L.; Bilal, M.; Luo, H.; Zhao, Y.; Duan, X. Studies on Biological Production of Isomaltulose Using Sucrose Isomerase: Current Status and Future Perspectives. *Catal. Lett.* **2020**, *151*, 1868–1881. [CrossRef]
21. Shyam, S.; Ramadas, A.; Chang, S.K. Isomaltulose: Recent evidence for health benefits. *J. Funct. Foods* **2018**, *48*, 173–178. [CrossRef]
22. Sawale, P.D.; Shendurse, A.M.; Mohan, M.S.; Patil, G.R. Isomaltulose (palatinose)—An emerging carbohydrate. *Food Biosci.* **2017**, *18*, 46–52. [CrossRef]
23. Schiweck, H.; Munir, M.; Rapp, K.M.; Schneider, B.; Vogel, M. New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. *Zuckerindustrie* **1990**, *115*, 555–565.
24. Holub, I.; Gostner, A.; Theis, S.; Nosek, L.; Kudlich, T.; Melcher, R.; Scheppach, W. Novel findings on the metabolic effects of the low glycaemic carbohydrate isomaltulose (Palatinose™). *Br. J. Nutr.* **2010**, *103*, 1730–1737. [CrossRef]
25. Sentko, A.B.J. Isomaltulose. In *Alternative Sweeteners*; O'Brien-Nabors, L., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2011.
26. Maresch, C.C.; Petry, S.F.; Theis, S.; Bosy-Westphal, A.; Linn, T. Low Glycemic Index Prototype Isomaltulose—Update of Clinical Trials. *Nutrients* **2017**, *9*, 381. [CrossRef]
27. Kawai, K.; Okuda, Y.; Yamashita, K. Changes in blood glucose and insulin after an oral palatinose administration in normal subjects. *Endocrinol. Jpn.* **1985**, *32*, 933–936. [CrossRef]
28. Lina, B.A.R.; Jonker, D.; Kozianowski, G. Isomaltulose (Palatinose®): A review of biological and toxicological studies. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1375–1381. [CrossRef]
29. Mu, W.; Li, W.; Wang, X.; Zhang, T.; Jiang, B. Current studies on sucrose isomerase and biological isomaltulose production using sucrose isomerase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 6569–6582. [CrossRef]
30. Häberer, D.; Thibault, L.; Langhans, W.; Geary, N. Beneficial Effects on Glucose Metabolism of Chronic Feeding of Isomaltulose versus Sucrose in Rats. *Ann. Nutr. Metab.* **2009**, *54*, 75–82. [CrossRef]
31. Kawai, K.; Yoshikawa, H.; Murayama, Y.; Okuda, Y.; Yamashita, K. Usefulness of Palatinose as a Caloric Sweetener for Diabetic Patients. *Horm. Metab. Res.* **1989**, *21*, 338–340. [CrossRef]
32. König, D.; Theis, S.; Kozianowski, G.; Berg, A. Postprandial substrate use in overweight subjects with the metabolic syndrome after isomaltulose (Palatinose™) ingestion. *Nutrition* **2012**, *28*, 651–656. [CrossRef]
33. Achten, J.; Jentjens, R.L.; Brouns, F.; Jeukendrup, A.E. Exogenous Oxidation of Isomaltulose Is Lower than That of Sucrose during Exercise in Men. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 1143–1148. [CrossRef]
34. van Can, J.G.; van Loon, L.J.; Brouns, F.; Blaak, E.E. Reduced glycaemic and insulinaemic responses following trehalose and isomaltulose ingestion: Implications for postprandial substrate use in impaired glucose-tolerant subjects. *Br. J. Nutr.* **2012**, *108*, 1210–1217. [CrossRef]
35. Siddiqui, I.R.; Furgala, B. Isolation and Characterization of Oligosaccharides from Honey. Part I. Disaccharides. *J. Apic. Res.* **1967**, *6*, 139–145. [CrossRef]
36. Eggleston, G.; Grisham, M. *Oligosaccharides in Cane and Their Formation on Cane Deterioration*; ACS Symposium Series; ACS Publications: Washington, DC, USA, 2003; pp. 211–234.
37. Kawaguti, H.Y.; Sato, H.H. Palatinose production by free and Ca-alginate gel immobilized cells of *Erwinia* sp. *Biochem. Eng. J.* **2007**, *36*, 202–208. [CrossRef]
38. Lee, G.-Y.; Jung, J.-H.; Seo, D.-H.; Hansin, J.; Ha, S.-J.; Cha, J.; Kim, Y.-S.; Park, C.-S. Isomaltulose production via yeast surface display of sucrose isomerase from *Enterobacter* sp. FMB-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 9179–9184. [CrossRef]

39. Li, S.; Cai, H.; Qing, Y.; Ren, B.; Xu, H.; Zhu, H.; Yao, J. Cloning and Characterization of a Sucrose Isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5 for Isomaltulose Hyperproduction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *163*, 52–63. [[CrossRef](#)]
40. Kawaguti, H.Y.; Celestino, M.; Moraes, A.L.; Yim, D.K.; Yamamoto, L.K.; Sato, H.H. Characterization of a glucosyltransferase from *Erwinia* sp. D12 and the conversion of sucrose into isomaltulose by immobilized cells. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *48*, 211–217. [[CrossRef](#)]
41. Véronèse, T.; Perlot, P. Mechanism of sucrose conversion by the sucrose isomerase of *Serratia plymuthica* ATCC 15928. *Enzym. Microb. Technol.* **1999**, *24*, 263–269. [[CrossRef](#)]
42. Ravaud, S.; Watzlawick, H.; Haser, R.; Mattes, R.; Aghajari, N. Overexpression, purification, crystallization and preliminary diffraction studies of the *Protaminobacter rubrum* sucrose isomerase SmuA. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2006**, *62*, 74–76. [[CrossRef](#)]
43. Wu, L.; Birch, R. Characterization of *Pantoea dispersa* UQ68J: Producer of a highly efficient sucrose isomerase for isomaltulose biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *97*, 93–103. [[CrossRef](#)]
44. Huang, J.-H.; Hsu, L.-H.; Su, Y.-C. Conversion of sucrose to isomaltulose by *Klebsiella planticola* CCRC 19112. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *21*, 22–27. [[CrossRef](#)]
45. Cho, M.-H.; Park, S.-E.; Lim, J.K.; Kim, J.-S.; Kim, J.H.; Kwon, D.Y.; Park, C.-S. Conversion of sucrose into isomaltulose by *Enterobacter* sp. FMB1, an isomaltulose-producing microorganism isolated from traditional Korean food. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 453–458. [[CrossRef](#)]
46. Nagai-Miyata, Y.; Tsuyuki, K.-I.; Sugitani, T.; Ebashi, T.; Nakajima, Y. Isolation and Characterization of a Trehalulose-producing Strain of *Agrobacterium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 2049–2053. [[CrossRef](#)]
47. Miyata, Y.; Sugitani, T.; Tsuyuki, K.-I.; Ebashi, T.; Nakajima, Y. Isolation and Characterization of *Pseudomonas mesoacidophila* Producing Trehalulose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56*, 1680–1681. [[CrossRef](#)]
48. Liu, L.; Yu, S.; Zhao, W. A Novel Sucrose Isomerase Producing Isomaltulose from *Raoultella terrigena*. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 5521. [[CrossRef](#)]
49. Aroonnu, A.; Nihira, T.; Seki, T.; Panbangred, W. Role of several key residues in the catalytic activity of sucrose isomerase from *Klebsiella pneumoniae* NK33-98-8. *Enzym. Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1221–1227. [[CrossRef](#)]
50. Cha, J.; Jung, J.; Park, S.; Cho, M.; Seo, D.; Ha, S.; Yoon, J.; Lee, O.; Kim, Y.; Park, C. Molecular cloning and functional characterization of a sucrose isomerase (isomaltulose synthase) gene from *Enterobacter* sp. FMB-1. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *107*, 1119–1130. [[CrossRef](#)]
51. Wu, L.; Birch, R.G. Characterization of the Highly Efficient Sucrose Isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and Cloning of the Sucrose Isomerase Gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1581–1590. [[CrossRef](#)]
52. Watzlawick, H.; Mattes, R. Gene cloning, protein characterization, and alteration of product selectivity for the trehalulose hydrolase and trehalulose synthase from “*Pseudomonas mesoacidophila*” MX-45. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7026–7036. [[CrossRef](#)]
53. Börnke, F.; Hajirezaei, M.; Sonnewald, U. Cloning and characterization of the gene cluster for palatinose metabolism from the phytopathogenic bacterium *Erwinia rhapontici*. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2425–2430. [[CrossRef](#)]
54. Sardiña-Peña, A.J.; Ballinas-Casarrubias, L.; Siqueiros-Cendón, T.S.; Espinoza-Sánchez, E.A.; Flores-Holguín, N.R.; Iglesias-Figueroa, B.F.; Rascón-Cruz, Q. Thermostability improvement of sucrose isomerase PalI NX-5: A comprehensive strategy. *Biotechnol. Lett.* **2023**, *45*, 885–904. [[CrossRef](#)]
55. Duan, X.; Cheng, S.; Ai, Y.; Wu, J. Enhancing the thermostability of *Serratia plymuthica* sucrose isomerase using B-factor-directed mutagenesis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0149208. [[CrossRef](#)]
56. Ravaud, S.; Robert, X.; Watzlawick, H.; Haser, R.; Mattes, R.; Aghajari, N. Trehalulose Synthase Native and Carbohydrate Complexed Structures Provide Insights into Sucrose Isomerization. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28126–28136. [[CrossRef](#)]
57. Ravaud, S.; Watzlawick, H.; Haser, R.; Mattes, R.; Aghajari, N. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the trehalulose synthase MutB from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2005**, *61*, 100–103. [[CrossRef](#)]
58. Lipski, A.; Watzlawick, H.; Ravaud, S.; Robert, X.; Rhimi, M.; Haser, R.; Mattes, R.; Aghajari, N. Mutations inducing an active-site aperture in *Rhizobium* sp. sucrose isomerase confer hydrolytic activity. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2013**, *69*, 298–307. [[CrossRef](#)]
59. Xu, Z.; Li, S.; Li, J.; Li, Y.; Feng, X.; Wang, R.; Xu, H.; Zhou, J. The Structural Basis of *Erwinia rhapontici* Isomaltulose Synthase. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74788. [[CrossRef](#)]
60. Ravaud, S.; Robert, X.; Watzlawick, H.; Haser, R.; Mattes, R.; Aghajari, N. Structural determinants of product specificity of sucrose isomerases. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1964–1968. [[CrossRef](#)]
61. Zhang, D.; Li, N.; Lok, S.-M.; Zhang, L.-H.; Swaminathan, K. Isomaltulose synthase (PalI) of *Klebsiella* sp. LX3: Crystal structure and implication of mechanism. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35428–35434. [[CrossRef](#)]
62. Janeček, Š.; Zámocká, B. A new GH13 subfamily represented by the  $\alpha$ -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles* **2020**, *24*, 207–217. [[CrossRef](#)]
63. Chen, L.; Qu, Z.; Yu, W.; Zheng, L.; Qiao, H.; Wang, D.; Wei, B.; Zhao, Z. Comparative genomic and transcriptome analysis of *Bacillus velezensis* CL-4 fermented corn germ meal. *AMB Express* **2023**, *13*, 1–12. [[CrossRef](#)]



64. Han, S.-R.; Kim, D.W.; Kim, B.; Chi, Y.M.; Kang, S.; Park, H.; Jung, S.-H.; Lee, J.H.; Oh, T.-J. Complete genome sequencing of *Shigella* sp. PAMC 28760: Identification of CAZyme genes and analysis of their potential role in glycogen metabolism for cold survival adaptation. *Microb. Pathog.* **2019**, *137*, 103759. [[CrossRef](#)]
65. Plaza-Vinuesa, L.; Hernandez-Hernandez, O.; Moreno, F.J.; Rivas, B.d.L.; Muñoz, R. Unravelling the diversity of glycoside hydrolase family 13  $\alpha$ -amylases from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microb. Cell Factories* **2019**, *18*, 1–11. [[CrossRef](#)]
66. Franceus, J.; Desmet, T. Sucrose Phosphorylase and Related Enzymes in Glycoside Hydrolase Family 13: Discovery, Application and Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2526. [[CrossRef](#)]
67. Yang, W.; Su, L.; Wang, L.; Wu, J.; Chen, S. Alpha-glucanotransferase from the glycoside hydrolase family synthesizes  $\alpha$ (1–6)-linked products from starch: Features and synthesis pathways of the products. *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *128*, 160–172. [[CrossRef](#)]
68. Samanta, S. Structural and Catalytic Features of Different Amylases and their Potential Applications. *Jordan J. Biol. Sci.* **2022**, *15*, 311–337.
69. Lombard, V.; Golaconda Ramulu, H.; Drula, E.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D490–D495. [[CrossRef](#)]
70. Janeček, Š.; Kuchtová, A.; Petrovičová, S. A novel GH13 subfamily of  $\alpha$ -amylases with a pair of tryptophans in the helix  $\alpha$ 3 of the catalytic TIM-barrel, the LPDlx signature in the conserved sequence region V and a conserved aromatic motif at the C-terminus. *Biologia* **2015**, *70*, 1284–1294. [[CrossRef](#)]
71. Sarian, F.D.; Janeček, Š.; Pijning, T.; Ihsanawati; Nurachman, Z.; Radjasa, O.K.; Dijkhuizen, L.; Natalia, D.; van der Maarel, M.J.E.C. A new group of glycoside hydrolase family 13  $\alpha$ -amylases with an aberrant catalytic triad. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, srep44230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Stam, M.R.; Danchin, E.G.; Rancurel, C.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: Towards improved functional annotations of  $\alpha$ -amylase-related proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* **2006**, *19*, 555–562. [[CrossRef](#)]
73. Janičková, Z.; Janeček, Š. Fungal  $\alpha$ -amylases from three GH13 subfamilies: Their sequence-structural features and evolutionary relationships. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *159*, 763–772. [[CrossRef](#)]
74. Marengo, M.; Pezzilli, D.; Gianquinto, E.; Fissore, A.; Oliaro-Bosso, S.; Sgorbini, B.; Spyrikis, F.; Adinolfi, S. Evaluation of Porcine and *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -Amylases as Possible Model for the Human Enzyme. *Processes* **2022**, *10*, 780. [[CrossRef](#)]
75. Watanabe, K.; Hata, Y.; Kizaki, H.; Katsube, Y.; Suzuki, Y. The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1, 6-glucosidase at 2.0 Å resolution: Structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization. *J. Mol. Biol.* **1997**, *269*, 142–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Møller, M.S.; Fredslund, F.; Majumder, A.; Nakai, H.; Poulsen, J.-C.N.; Lo Leggio, L.; Svensson, B.; Abou Hachem, M. Enzymology and structure of the GH13\_31 glucan 1, 6- $\alpha$ -glucosidase that confers isomaltooligosaccharide utilization in the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 4249–4259. [[CrossRef](#)]
77. Lin, M.-G.; Chi, M.-C.; Naveen, V.; Li, Y.-C.; Lin, L.-L.; Hsiao, C.-D. *Bacillus licheniformis* trehalose-6-phosphate hydrolase structures suggest keys to substrate specificity. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **2016**, *72*, 59–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Watanabe, R.; Arimura, Y.; Ishii, Y.; Kirimura, K. Crystal structure of  $\alpha$ -glucosyl transfer enzyme XgtA from *Xanthomonas campestris* WU-9701. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *526*, 580–585. [[CrossRef](#)]
79. Auiewiriyankul, W.; Saburi, W.; Kato, K.; Yao, M.; Mori, H. Function and structure of GH 13\_31  $\alpha$ -glucosidase with high  $\alpha$ -(1→4)-glucosidic linkage specificity and transglucosylation activity. *FEBS Lett.* **2018**, *592*, 2268–2281. [[CrossRef](#)]
80. Cockburn, D.W.; Cerqueira, F.M.; Bahr, C.; Koropatkin, N.M. The structures of the GH13\_36 amylases from *Eubacterium rectale* and *Ruminococcus bromii* reveal subsite architectures that favor maltose production. *Amylase* **2020**, *4*, 24–44. [[CrossRef](#)]
81. Janeček, Š. How many conserved sequence regions are there in the  $\alpha$ -amylase family. *Biologia* **2002**, *57* (Suppl. 11), 29–41.
82. Janeček, Š.; Svensson, B.; MacGregor, E.A.  $\alpha$ -Amylase: An enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, *71*, 1149–1170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027. [[CrossRef](#)]
84. Robert, X.; Gouet, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W320–W324. [[CrossRef](#)]
85. Zhang, D.; Li, X.; Zhang, L.-H. Isomaltulose Synthase from *Klebsiella* sp. Strain LX3: Gene Cloning and Characterization and Engineering of Thermostability. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 2676–2682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Lee, H.C.; Kim, J.H.; Kim, S.Y.; Lee, J.K. Isomaltose Production by Modification of the Fructose-Binding Site on the Basis of the Predicted Structure of Sucrose Isomerase from “*Protaminobacter rubrum*”. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 5183–5194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Ren, B.; Li, S.; Xu, H.; Feng, X.-H.; Cai, H.; Ye, Q. Purification and characterization of a highly selective sucrose isomerase from *Erwinia rhapontici* NX-5. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2011**, *34*, 629–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Cheetham, P.S.J. The extraction and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici*. *Biochem. J.* **1984**, *220*, 213–220. [[CrossRef](#)]
89. Zhang, F.; Cheng, F.; Jia, D.-X.; Gu, Y.-H.; Liu, Z.-Q.; Zheng, Y.-G. Characterization of a recombinant sucrose isomerase and its application to enzymatic production of isomaltulose. *Biotechnol. Lett.* **2021**, *43*, 261–269. [[CrossRef](#)]

90. Guo, D.; Li, M.; Jiang, M.; Cong, G.; Liu, Y.; Wang, C.; Li, X. Enhanced Extracellular Production and Characterization of Sucrose Isomerase in *Bacillus subtilis* with Optimized Signal Peptides. *Foods* **2022**, *11*, 2468. [[CrossRef](#)]
91. Zheng, Y.; Wang, Z.; Ji, X.; Sheng, J. Display of a sucrose isomerase on the cell surface of *Yarrowia lipolytica* for synthesis of isomaltulose from sugar cane by-products. *3 Biotech* **2019**, *9*, 1–7. [[CrossRef](#)]
92. Xu, Z.; Xue, Y.-P.; Zou, S.-P.; Zheng, Y.-G. Enzyme engineering strategies to confer thermostability. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 67–89.
93. Bruins, M.E.; Janssen, A.E.M.; Boom, R.M. Thermozyymes and Their Applications: A Review of Recent Literature and Patents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2001**, *90*, 155–186. [[CrossRef](#)]
94. Ferdjani, S.; Ionita, M.; Roy, B.; Dion, M.; Djeghaba, Z.; Rabiller, C.; Tellier, C. Correlation between thermostability and stability of glycosidases in ionic liquid. *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 1215–1219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Kazlauskas, R. Engineering more stable proteins. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 9026–9045. [[CrossRef](#)]
96. Cicerone, M.; Giri, J.; Shaked, Z.; Roberts, C. Protein stability—An underappreciated but critical need for drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *93*, 1. [[CrossRef](#)]
97. Choi, J.-M.; Han, S.-S.; Kim, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1443–1454. [[CrossRef](#)]
98. Wu, S.; Snajdrova, R.; Moore, J.C.; Baldenius, K.; Bornscheuer, U.T. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *60*, 88–119. [[CrossRef](#)]
99. Turner, P.; Mamo, G.; Karlsson, E.N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Factories* **2007**, *6*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Singh, S.; Bajaj, B.K. Medium Optimization for Enhanced Production of Protease with Industrially Desirable Attributes from *Bacillus subtilis* K-1. *Chem. Eng. Commun.* **2014**, *202*, 1051–1060. [[CrossRef](#)]
101. Böttcher, D.; Bornscheuer, U.T. Protein engineering of microbial enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13*, 274–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Matsumura, M.; Signor, G.; Matthews, B.W. Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature* **1989**, *342*, 291–293. [[CrossRef](#)]
103. Sapag, A.; Wouters, J.; Lambert, C.; de Ioannes, P.; Eyzaguirre, J.; Depiereux, E. The endoxylanases from family 11: Computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. *J. Biotechnol.* **2002**, *95*, 109–131. [[CrossRef](#)]
104. Warren, G.L.; Petsko, G.A. Composition analysis of  $\alpha$ -helices in thermophilic organisms. *Protein Eng. Des. Sel.* **1995**, *8*, 905–913. [[CrossRef](#)]
105. Menéndez-Arias, L.; Argosf, P. Engineering protein thermal stability: Sequence statistics point to residue substitutions in  $\alpha$ -helices. *J. Mol. Biol.* **1989**, *206*, 397–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Bi, J.; Chen, S.; Zhao, X.; Nie, Y.; Xu, Y. Computation-aided engineering of starch-debranching pullulanase from *Bacillus thermoleovorans* for enhanced thermostability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 7551–7562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Masakari, Y.; Hara, C.; Araki, Y.; Gomi, K.; Ito, K. Improvement in the thermal stability of *Mucor prainii*-derived FAD-dependent glucose dehydrogenase via protein chimerization. *Enzym. Microb. Technol.* **2020**, *132*, 109387. [[CrossRef](#)]
108. You, S.; Xie, C.; Ma, R.; Huang, H.-Q.; Herman, R.A.; Su, X.-Y.; Ge, Y.; Cai, H.-Y.; Yao, B.; Wang, J.; et al. Improvement in catalytic activity and thermostability of a GH10 xylanase and its synergistic degradation of biomass with cellulase. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 1–15. [[CrossRef](#)]
109. Li, G.; Fang, X.; Su, F.; Chen, Y.; Xu, L.; Yan, Y. Enhancing the Thermostability of *Rhizomucor miehei* Lipase with a Limited Screening Library by Rational-Design Point Mutations and Disulfide Bonds. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e02129-17. [[CrossRef](#)]
110. Pang, B.; Zhou, L.; Cui, W.; Liu, Z.; Zhou, Z. Improvement of the Thermostability and Activity of Pullulanase from *Anoxybacillus* sp. WB42. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2020**, *191*, 942–954. [[CrossRef](#)]
111. Teng, C.; Jiang, Y.; Xu, Y.; Li, Q.; Li, X.; Fan, G.; Xiong, K.; Yang, R.; Zhang, C.; Ma, R.; et al. Improving the thermostability and catalytic efficiency of GH11 xylanase PjxA by adding disulfide bridges. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *128*, 354–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Bian, F.; Yue, S.; Peng, Z.; Zhang, X.; Chen, G.; Yu, J.; Xuan, N.; Bi, Y. A Comprehensive Alanine-Scanning Mutagenesis Study Reveals Roles for Salt Bridges in the Structure and Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Elastase. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121108. [[CrossRef](#)]
113. Wang, R.; Wang, S.; Xu, Y.; Yu, X. Enhancing the thermostability of *Rhizopus chinensis* lipase by rational design and MD simulations. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *160*, 1189–1200. [[CrossRef](#)]
114. Kim, T.; Joo, J.C.; Yoo, Y.J. Hydrophobic interaction network analysis for thermostabilization of a mesophilic xylanase. *J. Biotechnol.* **2012**, *161*, 49–59. [[CrossRef](#)]
115. Farnoosh, G.; Khajeh, K.; Mohammadi, M.; Hassanpour, K.; Latifi, A.M.; Aghamollaei, H. Catalytic and structural effects of flexible loop deletion in organophosphorus hydrolase enzyme: A thermostability improvement mechanism. *J. Biosci.* **2020**, *45*, 1–10. [[CrossRef](#)]
116. Kumar, S.; Ma, B.; Tsai, C.-J.; Nussinov, R. Electrostatic strengths of salt bridges in thermophilic and mesophilic glutamate dehydrogenase monomers. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.* **2000**, *38*, 368–383. [[CrossRef](#)]

117. Xue, H.; Zhou, J.; You, C.; Huang, Q.; Lu, H. Amino acid substitutions in the N-terminus, cord and  $\alpha$ -helix domains improved the thermostability of a family 11 xylanase XynR8. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *39*, 1279–1288. [[CrossRef](#)]
118. McCarthy, A.A.; Morris, D.D.; Bergquist, P.L.; Baker, E.N. Structure of XynB, a highly thermostable  $\beta$ -1, 4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B. 1, at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2000**, *56*, 1367–1375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Maenpuen, S.; Pongsupasa, V.; Pensook, W.; Anuwat, P.; Kraivisitkul, N.; Pinthong, C.; Phonbuppha, J.; Luanloet, T.; Wijma, H.J.; Fraaije, M.W.; et al. Creating Flavin Reductase Variants with Thermostable and Solvent-Tolerant Properties by Rational-Design Engineering. *ChemBioChem* **2020**, *21*, 1481–1491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Zheng, F.; Vermaas, J.V.; Zheng, J.; Wang, Y.; Tu, T.; Wang, X.; Xie, X.; Yao, B.; Beckham, G.T.; Luo, H. Activity and Thermostability of GH5 Endoglucanase Chimeras from Mesophilic and Thermophilic Parents. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e02079-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Parthasarathy, S.; Murthy, M. Protein thermal stability: Insights from atomic displacement parameters (B values). *Protein Eng. Des. Sel.* **2000**, *13*, 9–13. [[CrossRef](#)]
122. Sheldon, R.A.; Pereira, P.C. Biocatalysis engineering: The big picture. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2678–2691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Estell, D.A.; Graycar, T.P.; Wells, J.A. Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *Pediatrics* **1985**, *260*, 6518–6521. [[CrossRef](#)]
124. Zhang, H.; Sang, J.; Zhang, Y.; Sun, T.; Liu, H.; Yue, R.; Zhang, J.; Wang, H.; Dai, Y.; Lu, F.; et al. Rational design of a *Yarrowia lipolytica* derived lipase for improved thermostability. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *137*, 1190–1198. [[CrossRef](#)]
125. Zhang, J.; Shi, H.; Xu, L.; Zhu, X.; Li, X. Site-directed mutagenesis of a hyperthermophilic endoglucanase Cel12B from *Thermotoga maritima* based on rational design. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133824. [[CrossRef](#)]
126. Basheer, S.M.; Chellappan, S. Enzyme engineering. In *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2017; pp. 151–168.
127. Lutz, S. Beyond directed evolution—Semi-rational protein engineering and design. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 734–743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Kazlauskas, R.J.; Bornscheuer, U.T. Finding better protein engineering strategies. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 526–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Moore, J.C.; Jin, H.-M.; Kuchner, O.; Arnold, F.H. Strategies for the in vitro evolution of protein function: Enzyme evolution by random recombination of improved sequences. *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 336–347. [[CrossRef](#)]
130. Chen, K.; Arnold, F.H. Enzyme Engineering for Nonaqueous Solvents: Random Mutagenesis to Enhance Activity of Subtilisin E in Polar Organic Media. *Bio/Technology* **1991**, *9*, 1073–1077. [[CrossRef](#)]
131. Tizei, P.A.; Csibra, E.; Torres, L.; Pinheiro, V.B. Selection platforms for directed evolution in synthetic biology. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44*, 1165–1175. [[CrossRef](#)]
132. Cirino, P.C.; Mayer, K.M.; Umeno, D. Generating mutant libraries using error-prone PCR. In *Directed Evolution Library Creation*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2003; pp. 3–9.
133. Sharma, A.; Gupta, G.; Ahmad, T.; Mansoor, S.; Kaur, B. Enzyme Engineering: Current Trends and Future Perspectives. *Food Rev. Int.* **2019**, *37*, 121–154. [[CrossRef](#)]
134. Khan, M.F.; Kundu, D.; Hazra, C.; Patra, S. A strategic approach of enzyme engineering by attribute ranking and enzyme immobilization on zinc oxide nanoparticles to attain thermostability in mesophilic *Bacillus subtilis* lipase for detergent formulation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *136*, 66–82. [[CrossRef](#)]
135. Packer, M.S.; Liu, D.R. Methods for the directed evolution of proteins. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 379–394. [[CrossRef](#)]
136. Zhou, C.; Xue, Y.; Ma, Y. Evaluation and directed evolution for thermostability improvement of a GH 13 thermostable  $\alpha$ -glucosidase from *Thermus thermophilus* TC11. *BMC Biotechnol.* **2015**, *15*, 97. [[CrossRef](#)]
137. Huang, L.; Shan, M.; Ma, J.; Li, Y.; Xu, Z.; Shao, S.; Wang, X.; Wang, K.; Xiao, D.; Lu, F.; et al. Directed evolution of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* to enhance its acid-stable performance. *Biologia* **2019**, *74*, 1363–1372. [[CrossRef](#)]
138. Chen, C.; Su, L.; Xu, F.; Xia, Y.; Wu, J. Improved Thermostability of Maltooligosyltrehalose Synthase from *Arthrobacter ramosus* by Directed Evolution and Site-Directed Mutagenesis. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 5587–5595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Steiner, K.; Schwab, H. Recent advances in rational approaches for enzyme engineering. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2012**, *2*, e201209010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Liu, B.; Qu, G.; Li, J.K.; Fan, W.; Ma, J.A.; Xu, Y.; Nie, Y.; Sun, Z. Conformational dynamics-guided loop engineering of an alcohol dehydrogenase: Capture, turnover and enantioselective transformation of difficult-to-reduce ketones. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 3182–3190. [[CrossRef](#)]
141. Li, G.; Chen, Y.; Fang, X.; Su, F.; Xu, L.; Yan, Y. Identification of a hot-spot to enhance *Candida rugosa* lipase thermostability by rational design methods. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 1948–1957. [[CrossRef](#)]
142. Bashirova, A.; Pramanik, S.; Volkov, P.; Rozhkova, A.; Nemashkalov, V.; Zorov, I.; Gusakov, A.; Sinitsyn, A.; Schwaneberg, U.; Davari, M.D. Disulfide Bond Engineering of an Endoglucanase from *Penicillium verruculosum* to Improve Its Thermostability. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1602. [[CrossRef](#)]
143. Cui, X.; Yuan, X.; Li, S.; Hu, X.; Zhao, J.; Zhang, G. Simultaneously improving the specific activity and thermostability of  $\alpha$ -amylase BLA by rational design. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2022**, *45*, 1839–1848. [[CrossRef](#)]

144. He, J.; Tang, F.; Chen, D.; Yu, B.; Luo, Y.; Zheng, P.; Mao, X.; Yu, J.; Yu, F. Design, expression and functional characterization of a thermostable xylanase from *Trichoderma reesei*. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0210548. [[CrossRef](#)]
145. Chen, A.; Li, Y.; Nie, J.; McNeil, B.; Jeffrey, L.; Yang, Y.; Bai, Z. Protein engineering of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase for enhanced thermostability using in silico data driven rational design methods. *Enzym. Microb. Technol.* **2015**, *78*, 74–83. [[CrossRef](#)]
146. Chen, Y.; Zhao, Y.; Zhou, X.; Liu, N.; Ming, D.; Zhu, L.; Jiang, L. Improving the thermostability of trehalose synthase from *Thermomonospora curvata* by covalent cyclization using peptide tags and investigation of the underlying molecular mechanism. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *168*, 13–21. [[CrossRef](#)]
147. Krüger, D.M.; Rathi, P.C.; Pflieger, C.; Gohlke, H. CNA web server: Rigidity theory-based thermal unfolding simulations of proteins for linking structure, (thermo-)stability, and function. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W340–W348. [[CrossRef](#)]
148. Ban, X.; Wang, T.; Fan, W.; Li, C.; Gu, Z.; Cheng, L.; Hong, Y.; Li, Z. Thermostability and catalytic ability enhancements of 1, 4- $\alpha$ -glucan branching enzyme by introducing salt bridges at flexible amino acid sites. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *224*, 1276–1282. [[CrossRef](#)]
149. Zhang, H.; Zhai, W.; Lin, L.; Wang, P.; Xu, X.; Wei, W.; Wei, D. In Silico Rational Design and Protein Engineering of Disulfide Bridges of an  $\alpha$ -Amylase from *Geobacillus* sp. to Improve Thermostability. *Starch-Stärke* **2021**, *73*, 2000274. [[CrossRef](#)]
150. Han, C.; Wang, Q.; Sun, Y.; Yang, R.; Liu, M.; Wang, S.; Liu, Y.; Zhou, L.; Li, D. Improvement of the catalytic activity and thermostability of a hyperthermostable endoglucanase by optimizing N-glycosylation sites. *Biotechnol. Biofuels* **2020**, *13*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Vicente, A.L.; Viña-Gonzalez, J.; Mateljak, I.; Monza, E.; Lucas, F.; Guallar, V.; Alcalde, M. Enhancing thermostability by modifying flexible surface loops in an evolved high-redox potential laccase. *AIChE J.* **2019**, *66*, e16747. [[CrossRef](#)]
152. Modarres, H.P.; Mofrad, M.R.; Sanati-Nezhad, A. Protein thermostability engineering. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 115252–115270. [[CrossRef](#)]
153. Ren, X.; Wang, J.; Li, Y.; Wang, F.; Wang, R.; Li, P.; Ma, C.; Su, J. Computational and Enzymatic Analyses Unveil the Catalytic Mechanism of Thermostable Trehalose Synthase and Suggest Strategies for Improved Bioconversion. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 8177–8185. [[CrossRef](#)]
154. Peng, M.; Maier, M.; Esch, J.; Schug, A.; Rabe, K.S. Direct coupling analysis improves the identification of beneficial amino acid mutations for the functional thermostabilization of a delicate decarboxylase. *Biol. Chem.* **2019**, *400*, 1519–1527. [[CrossRef](#)]
155. Ali, M.; Ishqi, H.M.; Husain, Q. Enzyme engineering: Reshaping the biocatalytic functions. *Biotechnol. Bioeng.* **2020**, *117*, 1877–1894. [[CrossRef](#)]
156. Ban, X.; Wu, J.; Kaustubh, B.; Lahiri, P.; Dhoble, A.S.; Gu, Z.; Li, C.; Cheng, L.; Hong, Y.; Tong, Y.; et al. Additional salt bridges improve the thermostability of 1,4- $\alpha$ -glucan branching enzyme. *Food Chem.* **2020**, *316*, 126348. [[CrossRef](#)]
157. Xu, Z.; Cen, Y.-K.; Zou, S.-P.; Xue, Y.-P.; Zheng, Y.-G. Recent advances in the improvement of enzyme thermostability by structure modification. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2020**, *40*, 83–98. [[CrossRef](#)]
158. Suzuki, Y. A general principle of increasing protein thermostability. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **1989**, *65*, 146–148. [[CrossRef](#)]
159. Suzuki, Y.; Oishi, K.; Nakano, H.; Nagayama, T. A strong correlation between the increase in number of proline residues and the rise in thermostability of five *Bacillus* oligo-1,6-glucosidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1987**, *26*, 546–551. [[CrossRef](#)]
160. Igarashi, K.; Ozawa, T.; Ikawa-Kitayama, K.; Hayashi, Y.; Araki, H.; ENDo, K.; Hagihara, H.; Ozaki, K.; Kawai, S.; Ito, S. Thermostabilization by proline substitution in an alkaline, liquefying  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. strain KSM-1378. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 1535–1540. [[PubMed](#)]
161. Carugo, O. How large B-factors can be in protein crystal structures. *BMC Bioinform.* **2018**, *19*, 61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Merritt, E.A. To B or not to B: A question of resolution? *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68*, 468–477. [[CrossRef](#)]
163. Kuriyan, J.; Karplus, M.; Petsko, G.A. Estimation of uncertainties in X-ray refinement results by use of perturbed structures. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **1987**, *2*, 1–12. [[CrossRef](#)]
164. Bendl, J.; Stourac, J.; Sebestova, E.; Vavra, O.; Musil, M.; Brezovsky, J.; Damborsky, J. HotSpot Wizard 2.0: Automated design of site-specific mutations and smart libraries in protein engineering. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W479–W487. [[CrossRef](#)]
165. Helenius, A.; Aebi, M. Roles of N-Linked Glycans in the Endoplasmic Reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 1019–1049. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Gong, B.; Burnina, I.; Lynaugh, H.; Li, H. O-linked glycosylation analysis of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor produced in glycoengineered *Pichia pastoris* by liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2014**, *945–946*, 135–140. [[CrossRef](#)]
167. Knauer, R.; Lehle, L. The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gen. Subj.* **1999**, *1426*, 259–273. [[CrossRef](#)]
168. Ryu, K.-S.; Lee, J.-O.; Kwon, T.H.; Choi, H.-H.; Park, H.-S.; Hwang, S.K.; Lee, Z.-W.; Lee, K.-B.; Han, Y.H.; Choi, Y.-S.; et al. The presence of monoglucosylated N196-glycan is important for the structural stability of storage protein, arylphorin. *Biochem. J.* **2009**, *421*, 87–96. [[CrossRef](#)]
169. Aebi, M.; Bernasconi, R.; Clerc, S.; Molinari, M. N-glycan structures: Recognition and processing in the ER. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 74–82. [[CrossRef](#)]
170. Haltiwanger, R.S.; Lowe, J.B. Role of Glycosylation in Development. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 491–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Colley, K.J.; Varki, A.; Kinoshita, T. *Cellular Organization of Glycosylation*, 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 2015.

172. Katla, S.; Yoganand, K.; Hingane, S.; Kumar, C.R.; Anand, B.; Sivaprakasam, S. Novel glycosylated human interferon alpha 2b expressed in glycoengineered *Pichia pastoris* and its biological activity: N-linked glycoengineering approach. *Enzym. Microb. Technol.* **2019**, *128*, 49–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Benoit, I.; Asther, M.; Sulzenbacher, G.; Record, E.; Marmuse, L.; Parsieglia, G.; Gimbert, I.; Asther, M.; Bignon, C. Respective importance of protein folding and glycosylation in the thermal stability of recombinant feruloyl esterase A. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 5815–5821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Zou, S.; Huang, S.; Kaleem, I.; Li, C. N-glycosylation enhances functional and structural stability of recombinant  $\beta$ -glucuronidase expressed in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **2013**, *164*, 75–81. [[CrossRef](#)]
175. Hu, X.; Yuan, X.; He, N.; Zhuang, T.Z.; Wu, P.; Zhang, G. Expression of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase in *Pichia pastoris* without antibiotics-resistant gene and effects of glycosylation on the enzymic thermostability. *3 Biotech* **2019**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)]
176. Maksimainen, M.; Hakulinen, N.; Kallio, J.M.; Timoharju, T.; Turunen, O.; Rouvinen, J. Crystal structures of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -galactosidase reveal conformational changes in the active site. *J. Struct. Biol.* **2011**, *174*, 156–163. [[CrossRef](#)]
177. Nagae, M.; Yamaguchi, Y. Function and 3D Structure of the N-Glycans on Glycoproteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 8398–8429. [[CrossRef](#)]
178. Joao, H.C.; Scragg, I.G.; Dwek, R.A. Effects of glycosylation on protein conformation and amide proton exchange rates in RNase B. *FEBS Lett.* **1992**, *307*, 343–346. [[CrossRef](#)]
179. Gavel, Y.; Heijne, G.V. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: Implications for protein engineering. *Protein Eng. Des. Sel.* **1990**, *3*, 433–442. [[CrossRef](#)]
180. Trimble, R.B.; Lubowski, C.; Hauer III, C.R.; Stack, R.; McNaughton, L.; Gemmill, T.R.; Kumar, S.A. Characterization of N- and O-linked glycosylation of recombinant human bile salt-stimulated lipase secreted by *Pichia pastoris*. *Glycobiology* **2004**, *14*, 265–274. [[CrossRef](#)]
181. Wang, Z.; Guo, C.; Liu, L.; Huang, H. Effects of N-glycosylation on the biochemical properties of recombinant bEKL expressed in *Pichia pastoris*. *Enzym. Microb. Technol.* **2018**, *114*, 40–47. [[CrossRef](#)]
182. Villiger, T.K.; Scibona, E.; Stettler, M.; Broly, H.; Morbidelli, M.; Soos, M. Controlling the time evolution of mAb N-linked glycosylation - Part II: Model-based predictions. *Biotechnol. Prog.* **2016**, *32*, 1135–1148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Hang, I.; Lin, C.-W.; Grant, O.C.; Fleurkens, S.; Villiger, T.K.; Soos, M.; Morbidelli, M.; Woods, R.J.; Gauss, R.; Aebi, M. Analysis of site-specific N-glycan remodeling in the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Glycobiology* **2015**, *25*, 1335–1349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Ravaud, S.; Watzlawick, H.; Mattes, R.; Haser, R.; Aghajari, N. Towards the three-dimensional structure of a sucrose isomerase from *Pseudomonas mesoacidophila* MX-45. *Biol. Bratisl.* **2005**, *60*, 89–95.
185. Wu, X.; Wang, Y.; Tong, B.; Chen, X.; Chen, J. Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *109*, 329–337. [[CrossRef](#)]
186. Laderman, K.; Davis, B.; Krutzsch, H.; Lewis, M.; Griko, Y.; Privalov, P.; Anfinsen, C. The purification and characterization of an extremely thermostable alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *Pediatrics* **1993**, *268*, 24394–24401. [[CrossRef](#)]
187. Kikani, B.; Singh, S. Single step purification and characterization of a thermostable and calcium independent  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK1-1 isolated from Tulsi Shyam hot spring reservoir, Gujarat (India). *Int. J. Biol. Macromol.* **2011**, *48*, 676–681. [[CrossRef](#)]
188. Wang, J.; Ren, X.; Wang, R.; Su, J.; Wang, F. Structural Characteristics and Function of a New Kind of Thermostable Trehalose Synthase from *Thermobaculum terrenum*. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 7726–7735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
189. Lehmann, M.; Wyss, M. Engineering proteins for thermostability: The use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 371–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Dagan, S.; Hagai, T.; Gavrilov, Y.; Kapon, R.; Levy, Y.; Reich, Z. Stabilization of a protein conferred by an increase in folded state entropy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 10628–10633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Thompson, M.J.; Eisenberg, D. Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 595–604. [[CrossRef](#)]
192. Lu, Z.; Wang, Q.; Jiang, S.; Zhang, G.; Ma, Y. Truncation of the unique N-terminal domain improved the thermostability and specific activity of alkaline  $\alpha$ -amylase Amy703. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22465. [[CrossRef](#)]
193. Feller, G.; Bonneau, M.; Da Lage, J.L. Amyrel, a novel glucose-forming  $\alpha$ -amylase from *Drosophila* with 4- $\alpha$ -glucanotransferase activity by disproportionation and hydrolysis of maltooligosaccharides. *Glycobiology* **2021**, *31*, 1134–1144. [[CrossRef](#)]
194. Rhimi, M.; Da Lage, J.-L.; Haser, R.; Feller, G.; Aghajari, N. Structural and Functional Characterization of *Drosophila melanogaster*  $\alpha$ -Amylase. *Molecules* **2023**, *28*, 5327. [[CrossRef](#)]
195. Wang, J.; Wang, Y.; Wang, X.; Zhang, D.; Wu, S.; Zhang, G. Enhanced thermal stability of lichenase from *Bacillus subtilis* 168 by SpyTag/SpyCatcher-mediated spontaneous cyclization. *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)]
196. Sun, X.-B.; Cao, J.-W.; Wang, J.-K.; Lin, H.-Z.; Gao, D.-Y.; Qian, G.-Y.; Park, Y.-D.; Chen, Z.-F.; Wang, Q. SpyTag/SpyCatcher molecular cyclization confers protein stability and resilience to aggregation. *New Biotechnol.* **2019**, *49*, 28–36. [[CrossRef](#)]
197. Wang, Y.; Tian, J.; Xiao, Y.; Wang, Y.; Sun, H.; Chang, Y.; Luo, H. SpyTag/SpyCatcher cyclization enhances the thermostability and organic solvent tolerance of l-phenylalanine aldolase. *Biotechnol. Lett.* **2020**, *41*, 987–994. [[CrossRef](#)]

198. Dani, V.S.; Ramakrishnan, C.; Varadarajan, R. MODIP revisited: Re-evaluation and refinement of an automated procedure for modeling of disulfide bonds in proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* **2003**, *16*, 187–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
199. Li, C.; Du, M.; Cheng, B.; Wang, L.; Liu, X.; Ma, C.; Yang, C.; Xu, P. Close relationship of a novel Flavobacteriaceae  $\alpha$ -amylase with archaeal  $\alpha$ -amylases and good potentials for industrial applications. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
200. Ismaya, W.T.; Hasan, K.; Kardi, I.; Zainuri, A.; Rahmawaty, R.I.; Permanahadi, S.; El Viera, B.V.; Harinanto, G.; Gaffar, S.; Natalia, D.; et al. Chemical modification of *Saccharomycopsis fibuligera* R64  $\alpha$ -amylase to improve its stability against thermal, chelator, and proteolytic inactivation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *170*, 44–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
201. Srivastava, R.A.K. Studies on stabilization of amylase by covalent coupling to soluble polysaccharides. *Enzym. Microb. Technol.* **1991**, *13*, 164–170. [[CrossRef](#)]
202. Klibanov, A.M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. *Science* **1983**, *219*, 722–727. [[CrossRef](#)]
203. Villalonga, R.; Gómez, L.; Ramírez, H.L.; Villalonga, M.L. Stabilization of  $\alpha$ -amylase by chemical modification with carboxymethyl-cellulose. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1999**, *74*, 635–638. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.